Aus dem

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen

der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

und der

Abteilung Virologie

Paul-Ehrlich-Institut

Untersuchung von rekombinantem Vacciniavirus MVA zur Entwicklung von Impfstoffen gegen Infektionen mit Respiratorischen Synzytialviren

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)

durch die Veterinärmedizinische Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von

Yasemin Süzer

aus München

Leipzig, 2007

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan:	Prof. Dr. Karsten Fehlhaber
Betreuer:	Prof. Dr. Uwe Truyen
	Prof. Dr. Gerd Sutter
Gutachter:	Prof. Dr. Uwe Truyen, Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, Veterinärmedizinische Fakultät Universität Leipzig, An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig
	Prof. Dr. Gerd Sutter, Abteilung Virologie, Paul-Ehrlich-Institut, Paul-Ehrlich-Strasse 51-59, 63225 Langen
	PD Dr. Hermann Meyer, Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, Neuherbergstrasse 11, 80937 München
	PD Dr. Reinhard Straubinger, Institut für Immunologie, Veterinärmedizinische Fakultät Universität Leipzig, An den Tierkliniken 11, 04103 Leipzig
Tag der Verteidigung:	12.06.2007

Meinen Eltern

Monika und Erol

und meiner Schwester

Suzan

Der Zweifel ist der Beginn der Wissenschaft.

Wer nichts anzweifelt, prüft nichts.

Wer nichts prüft, entdeckt nichts.

Wer nichts entdeckt, ist blind und bleibt blind.

Teilhard de Chardin (1881-1955)

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS I

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS VII

1 EINLEITUNG 1

2 LITERATURÜBERSICHT 2

2.1 RESPIRATORISCHE SYNZYTIALVIREN 2
2.1.1 ALLGEMEINES 2
2.1.2 TAXONOMIE UND CHARAKTERISTIKA 2
2.1.3 MORPHOLOGIE 6
2.1.4 DIE RSV-OBERFLÄCHENPROTEINE 7
2.1.4.1.1 Das Attachment-/Adsorptionsprotein G 7
2.1.4.1.2 Das Fusionsprotein F 8
2.1.5 EPIDEMIOLOGIE, KLINIK UND PATHOGENESE 9
2.1.6 IMMUNITÄT NACH INFEKTIONEN MIT RSV 12
2.1.6.1 Einführung in die Grundlagen der Immunität 12
2.1.6.2 Humorale Immunantwort nach RSV-Infektion 14
2.1.6.3 Zelluläre Immunantwort nach RSV-Infektion 14
2.1.6.4 Mukosale Immunität 15
2.1.7 DIE RSV-IMMUNPATHOGENESE 16
2.1.7.1 HRSV-Impfstoff vermittelte Immunpathogenese in Kindern 17
2.1.7.2 Tiermodelle zur RSV-Impfstoff-vermittelten Immunpathogenese 17
2.1.7.2.1 Mäuse 18
2.1.7.2.2 Baumwollratten 19
2.1.7.2.3 Primaten 19
2.1.7.2.4 Rind/Kalb 19
2.2 VIRALE VEKTOREN: EINE NEUE GENERATION VON VIRUSIMPFSTOFFEN 21
2.3 DIE POCKENVIREN 21
2.3.1 DIE FAMILIE POXVIRIDAE 21
2.3.2 MOLEKULARBIOLOGIE DER POCKENVIREN 23
2.3.3 VORTEIL DER POCKENVIREN ALS VEKTORIMPFSTOFF 23
2.4 DAS VACCINIAVIRUS 24
2.4.1 ABSTAMMUNG DES VACCINIAVIRUS 24
2.4.2 VACCINIAVIRUS ALS VEKTORSYSTEM 24
2.5 DAS MODIFIZIERTE VACCINIAVIRUS ANKARA (MVA) 26
2.5.1 ABSTAMMUNG DES MODIFIZIERTEN VACCINIAVIRUS ANKARA (MVA) 26
2.5.2 MVA ALS VEKTOR FÜR FREMDGENE 27
2.5.3 SICHERHEIT UND IMMUNOGENITÄT VON MVA 30

3 MATERIAL UND METHODEN 32

3.1 MATERIAL 32
3.1.1 ZELLKULTURMEDIEN UND PUFFER 32
3.1.2 ZELLKULTURFLASCHEN UND –PLATTEN 32
3.1.3 ZELLEN 33
3.1.3.1 Primäre Zelllinie 33
3.1.3.1.1 Hühnerembryofibroblasten (HEF; Chicken embryo fibroblasts, CEF) 33
3.1.3.2 Permanente Zelllinie 34
3.1.3.2.1 Baby Hamster Kidney-Zellen (BHK-21, ATCC CCL-10) 34
3.1.3.2.2 Rabbit Kidney-Zellen (RK13, ATCC CCL-37) 34
3.1.3.2.3 Vero-Zellen (ATCC-CCL-81) 34
3.1.3.2.4 HeLa-Zellen (ATCC CCL-2) 34
3.1.3.2.5 HEp-2-Zellen (ATCC CCL-23) 34
3.1.3.2.6 Einfrieren und Auftauen von Zellen 35
3.1.3.2.7 Bestimmung der Zellzahl in 6-Loch-Platten 35
3.1.4 VIREN 36
3.1.4.1 Modifiziertes Vacciniavirus Ankara (MVA) 36
3.1.4.2 Chorioallantois Vacciniavirus Ankara (CVA) 36
3.1.4.3 MVA-HRSV-F und MVA-HRSV-G (WYATT et al. 1999) 36
3.1.4.4 Respiratorisches Synzytialvirus 36
3.1.4.4.1 RSV-Subtyp A2 36
3.1.4.4.2 Formalin-inaktiviertes RSV (FI-RSV) 37
3.1.5 SYNTHETISCHE OLIGONUKLEOTIDE (PRIMER) 37
3.1.5.1 Oligonukleotide zur Detektion von DNA-Sequenzen der Deletionsbereiche im MVA-Genom 37
3.1.5.1.1 Deletion III 37
3.1.5.1.2 Deletion VI 37
3.1.5.2 Oligonukleotide zur Detektion der K1L-Gensequenzen 37
3.1.5.3 Oligonukleotide zur Detektion der DNA-Sequenz von BRSV-F und -G-Genen 37
3.1.5.3.1 BRSV-F-Gen 37
3.1.5.3.2 BRSV-G-Gen 37
3.1.6 PLASMIDE 38
3.1.6.1 Plasmide zur Herstellung rekombinanter MVA 38
3.1.6.1.1 pIIIdhrP7.5 und pIII∆hrP7.5 38
3.1.6.1.2 pVI∆hrP7.5-sP 39
3.1.6.1.3 pLW9 (WYATT et al. 1996) 39
3.1.6.1.4 pEVNeo14 39
3.1.6.1.5 pBRSVGsyn (KUHNLE et al. 1998) 40
3.1.6.2 Plasmide für den Fusionsassay 40
3.1.6.2.1 Luziferase-Kontrollplasmid (T7Luc) 40
3.1.6.2.2 pUCIILZT7pol (SUTTER et al. 1995) 40
3.1.7 ANTIKÖRPER 41
3.1.7.1 Anti-Vaccinia-Antikörper 41
3.1.7.2 Anti-F-Antikörper (mAb 3) (SCHRIJVER et al. 1997) 41
3.1.7.3 Anti-G-Antikörper (mAb 20) (LANGEDIJK et al. 1996a) 41
3.1.7.4 Meerrettich-Peroxidase (PO)-gekoppelte Antikörper 41
3.1.7.4.1 Anti-Kaninchen PO-gekoppelter Antikörper 41
3.1.7.4.2 Anti-Maus PO-gekoppelter Antikörper 41
3.1.7.4.3 Anti-RSV PO-gekoppelter Antikörper 41
3.1.7.5 Biotinylierte Antikörper 42
3.1.7.5.1 Antikörper für den ELISPOT Assay 42
3.1.7.5.2 Antikörper für den RSV-ELISA 42
3.1.7.6 Alkalische Phosphatase-(AP)gekoppelte Antikörper 42

3.1.7.6.1 Anti-Bovine- (AP)gekoppelter Antikörper 42
3.1.8 ZYTOKINE 42
3.1.9 SONSTIGE MATERIALIEN, GERÄTE UND GEBRAUCHSGEGENSTÄNDE 42
3.2 METHODEN 43
3.2.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN 43
3.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA 43
3.2.1.1.1 Analytische Plasmid-DNA-Isolierung (=Kleine DNA-Präparation) 43
3.2.1.1.2 Präparative Plasmid-DNA-Isolierung (=Große DNA-Präparation) 43
3.2.1.1.3 Reinigung von Plasmid-DNA durch Phenolextraktion und Ethanolfällung 44
3.2.1.2 Herstellung und Aufarbeitung von DNA-Fragmenten 44
3.2.1.2.1 Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen 44
3.2.1.2.1.1 Photometrische Bestimmung 44
3.2.1.2.1.2 Konzentrationsbestimmung auf Agarosegelen 44
3.2.1.2.2 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen 44
3.2.1.2.3 Aufreinigung und Gelextraktion 45
3.2.1.2.4 Veränderungen an 3’ und 5’ Enden von DNA-Fragmenten 45
3.2.1.2.4.1 Klenow-Enzym 45
3.2.1.2.4.2 T4-DNA-Polymerase 46
3.2.1.2.4.3 Dephosphorylierung von 5’-Enden 46
3.2.1.3 Gelelektrophoretische Methoden für DNA 46
3.2.1.3.1 Analyse von DNA in Agarosegelen 46
3.2.1.4 Klonierung rekombinanter DNA-Moleküle 47
3.2.1.4.1 Präparation von Vektoren 47
3.2.1.4.2 Ligation von DNA-Fragmenten 47
3.2.1.4.3 Herstellung elektrokompetenter Bakterienzellen 47
3.2.1.5 Elektroporation von Bakterienzellen 48
3.2.1.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) 48
3.2.2 PROTEINANALYTISCHE METHODEN 49
3.2.2.1 Western-Blot 49
3.2.2.1.1 Proben für den Western-Blot 49
3.2.2.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 50
3.2.2.1.3 Elektrotransfer von Proteinen 50
3.2.2.1.4 Immunodetektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen 51
3.2.2.2 Proteinkinetik 52
3.2.2.2.1 Proben für die Proteinkinetik 52
3.2.2.2.2 Proteinbestimmung nach LOWRY et al. (1951) 52
3.2.2.3 Nachweis von [^{35}S]-markierten Proteinen 53
3.2.2.3.1 [^{35}S]-Markierung von Proteinen 53
3.2.2.3.2 SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese 54
3.2.2.3.3 Fluorographie 54
3.2.2.4 Radioimmunopräzipitationsassay (RIPA) 54
3.2.2.4.1 Proben für den RIPA 54
3.2.2.4.2 Immunpräzipitation 54
3.2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 55
3.2.2.4.4 Fluorographie 55
3.2.2.5 Fusionsassay 55
3.2.2.5.1 Proben für den Fusionsassay 56
3.2.2.5.2 Extraktherstellung zur Analyse der Luziferase-Enzymaktivität 56
3.2.2.5.3 Messung der Luziferase-Aktivität 56
3.2.3 VIROLOGISCHE METHODEN 57
3.2.3.1 Herstellung rekombinanter Viren 57
3.2.3.1.1 Infektion von Zellkulturen 57
3.2.3.1.2 Transfektionen 57
3.2.3.1.2.1 Transiente Transfektion 57

3.2.3.1.2.2 Stabile Transfektion 58
3.2.3.1.3 Ernte Virus-infizierter Zellen 58
3.2.3.1.3.1 6-Loch-oder 12-Loch-Platten 58
3.2.3.1.3.2 Zellkulturflaschen 58
3.2.3.1.4 Transiente Wirtsselektion rekombinanter Viren 59
3.2.3.1.5 Überprüfung rekombinanter Virusklone 60
3.2.3.1.5.1 Amplifikation der einzelnen Virusklone 60
3.2.3.1.5.2 Extraktion der viralen DNA 60
3.2.3.1.5.3 PCR-Analyse viraler DNA 61
3.2.3.1.6 Deletion/Entfernung des K1L-Markergens aus rekombinanten MVA 61
3.2.3.1.7 Amplifikation von rekombinanten MVA 61
3.2.3.1.8 Titration von Viren durch Immunfärbung 62
3.2.3.1.9 Herstellung von Impfstoffpräparationen 63
3.2.3.1.10 Sterilitätsprüfung von Impfstoffpräparationen 64
3.2.3.1.10.1 Sterilitätsprüfung in nicht supplementiertem Medium 64
3.2.3.1.10.2 Sterilitätsprüfung auf speziellen Agarplatten 64
3.2.3.2 Charakterisierung rekombinanter Viren 64
3.2.3.2.1 PCR-Analyse der viralen DNA 64
3.2.3.2.2 Untersuchung der Vermehrungsfähigkeit der rekombinanten Viren 64
3.2.3.2.2.1 Infektion mit hoher MOI (multiplicity of infection; Ein-Schritt-Wachstumskurve, one step growth curve) 64
3.2.3.2.2.2 Infektion mit geringer MOI (Mehr-Schritt-Wachstumskurve, multiple step growth curve) 65
3.2.3.2.2.3 Replikationsdefizienzassay 65
3.2.4 TIERMODELLE 65
3.2.4.1 Mausmodell 65
3.2.4.1.1 BALB/c-Mäuse (H-2^d) 65
3.2.4.1.1.1 Immunisierung und Infektion der Mäuse 66
3.2.4.1.2 Blutentnahme 66
3.2.4.1.3 Bronchoalveoläre Lavage (BAL) 66
3.2.4.1.4 Quantifizierung von HRSV in Lungen infektiöser Mäuse 66
3.2.4.2 Rindermodell 67
3.2.4.2.1 Aufbau des Immunisierungs- und Infektionsmodells 67
3.2.4.3 ELISA 69
3.2.4.3.1 Vaccinia-spezifischer ELISA 69
3.2.4.3.2 Zytokin-ELISA 71
3.2.4.3.3 HRSV-ELISA 71
3.2.4.3.4 BRSV-F-spezifischer ELISA 71
3.2.4.3.5 BRSV-G-spezifischer ELISA 71
3.2.4.4 ELISPOT 72

4 ERGEBNISSE 73

4.1 HERSTELLUNG DER REKOMBINANTEN VIREN MVA-BRSV-F UND MVA-BRSV-G 73
4.1.1 KLONIERUNG DES VEKTORPLASMIDES PIIIDHRP7.5-BRSV-F 73
4.1.1.1 Aufarbeitung der Vektoren pIIIdhrP7.5 und pEVNeo14 zur Herstellung des Vektorplasmides pIIIdhrp7.5-BRSV-F 73
4.1.2 KLONIERUNG DES VEKTORPLASMIDES PVIΔHRPMH5-BRSV-G ZUR HERSTELLUNG VON MVA-BRSV-G 75
4.1.2.1 Klonierung des Vektors pLW9-G 75
4.1.2.1.1 Aufarbeitung der Vektoren pLW9 und pBRSVG zur Herstellung des Vektorplasmides pLW9-G 76
4.1.2.1.2 Aufarbeitung der Plasmide pLW9-G und pVIΔhrP7.5-sP zur Herstellung des Vektorplasmides pVIΔhrPmH5-BRSV-G 77
4.1.3 HERSTELLUNG VON MVA-BRSV-F UND MVA-BRSV-G DURCH HOMOLOGE REKOMBINATION 79
4.1.3.1 Transfektion, transiente Wirtsselektion, Überprüfung rekombinanter Virusklone und anschließende Entfernung des K1L-Markergens 79
4.1.3.2 Amplifikation von MVA-BRSV-F und MVA-BRSV-G 86
4.1.4 VIROLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG VON MVA-BRSV-F UND G 86
4.1.4.1 MVA-BRSV-F und –G Virusstocks sind genetisch stabil und die BRSV-Gene sind korrekt inseriert 87
4.1.4.2 Überprüfung der Expression der rekombinanten Proteine 88
4.1.4.2.1 Nachweis der Fremdgenexpression durch Immunfärbung infizierter Zellen 88
4.1.4.2.2 Nachweis der Expression von Protein G nach Infektion von HEF-Zellen mit MVA-BRSV-G im Western-Blot 90
4.1.4.2.3 Zunahme der Protein G-Expression im zeitlichen Verlauf nach Infektion von HEF-Zellen mit MVA-BRSV-G 91
4.1.4.2.4 Nachweis der Expression des F-Proteins nach Infektion von BHK-Zellen mit MVA-BRSV-F durch radioaktive Markierung 92
4.1.4.2.5 Spezifischer Nachweis der Expression des F-Proteins von infizierten HEF-Zellen mit MVA-BRSV-F durch Radioimmunopräzipitation (RIPA) 93
4.1.4.2.6 Durch MVA-BRSV-F exprimiertes Protein F besitzt Fusionsaktivität 94
4.1.4.3 Wachstumsverhalten von MVA-BRSV-F und MVA-BRSV-G 96
4.1.4.4 Replikationsdefizienzassay von MVA-BRSV-F und MVA-BRSV-G 97
4.2 KONSTRUKTION DER REVERTANTEN VIREN MVA-ΔBRSV-F UND MVA-ΔBRSV-G 98
4.2.1 PLASMIDE ZUR DELETION INSERIERTER GENE IN DER DELETION III UND VI DES MVA-GENOMS 98
4.2.1.1 Herstellung und Aufarbeitung der Vektoren pIIIΔhr und pVIΔhr 99
4.2.2 HERSTELLUNG DER REVERTANTEN VIREN MVA-ΔBRSV-F UND MVA-ΔBRSV-G DURCH HOMOLOGE REKOMBINATION 100
4.2.2.1 Transfektion, transiente Wirtsselektion, Überprüfung rekombinanter Virusklone und Deletion des K1L-Markergens 100
4.2.3 VIROLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER REVERTANTEN VIREN MVA-ΔBRSV-F UND MVA-ΔBRSV-G 101
4.2.3.1.1 PCR-Analyse des Genoms der revertanten Viren MVA-ΔBRSV-F und MVA-ΔBRSV-G 102
4.2.3.1.2 Wachstumsuntersuchungen der revertanten Viren MVA-ΔBRSV-F und -ΔBRSV-G 103
4.3 HERSTELLUNG VON MVA-BRSV-GNEU 104
4.3.1 KLONIERUNG DES VEKTORPLASMIDES PIIIΔHRP7.5-BRSV-G ZUR HERSTELLUNG VON MVA-BRSV-GNEU 104
4.3.1.1 Aufarbeitung der Vektoren pIIIΔhrP7.5 und pBRSVGsyn zur Herstellung des Vektorplasmides pIIIΔhrP7.5-BRSV-G 105
4.3.2 HERSTELLUNG VON MVA-BRSV-GNEU DURCH HOMOLOGE REKOMBINATION 106

4.3.2.1 Transfektion, transiente Wirtsselektion, Überprüfung rekombinanter Virusklone und Deletion des K1L-Markergens 106
4.3.3 VIROLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG 107
4.3.3.1 Überprüfung der Expression des G-Proteins durch MVA-BRSV-Gneu 107
4.3.3.1.1 Immunfärbung infizierter Zellen 107
4.3.3.1.2 Nachweis der Expression des G-Proteins von MVA-infizierten HEF-Zellen durch Western-Blot-Analyse 108
4.3.3.2 Wachtumsuntersuchungen 109
4.4 TIERMODELLE 111
4.4.1 MVA-HRSV-F UND -G IMMUNISIERUNG IN BALB/C-(H-2^D)-MÄUSEN 111
4.4.1.1 Gewichtsverlust nach Infektion mit RSV 111
4.4.1.2 RSV-Eliminierung aus dem Lungegewebe 112
4.4.1.3 Spezifische Anti-RSV-Antikörperantwort durch MVA-Immunisierung 112
4.4.1.4 MVA-Immunisierung begünstigt eine T_H1-gerichtete Zytokinproduktion nach RSV-Infektion 113
4.4.1.5 Immunisierung mit MVA-Impfstoffen induziert keine Lungen-Eosinophilie 115
4.4.2 IMMUNISIERUNG VON KÄLBERN MIT NACHFOLGENDER RSV-INFEKTION 116
4.4.2.1 Rektale Körpertemperatur nach BRSV-Infektion 116
4.4.2.2 Vaccinia-spezifische Antikörperantworten in den immunisierten Kälbern 117
4.4.2.3 F-spezifische Antikörperantworten in den immunisierten Kälbern 118

5 DISKUSSION 119

5.1 MVA-BRSV REKOMBINANTE VIREN 119
5.1.1 WACHSTUMSVERHALTEN DER REKOMBINANTEN MVA-BRSV 119
5.1.2 IMMUNOGENITÄT UND SCHUTZWIRKUNG DER MVA-BRSV-IMPFSTOFFE. 121
5.1.2.1 Rindermodell 121
5.2 MVA-HRSV-REKOMBINANTE 122
5.2.1 IMMUNOGENITÄT UND SCHUTZWIRKUNG DER MVA-HRSV-IMPFSTOFFE 123
5.3 WAS SPRICHT FÜR MVA ALS RSV-IMPFSTOFF 124
5.4 SCHLUSSFOLGERUNGEN 126
5.5 AUSBLICK 127

6 ZUSAMMENFASSUNG 128

7 SUMMARY 130

8 LITERATURVERZEICHNIS 132

ANHANG 157

GERÄTE UND LABORHILFSMITTEL 157
PUFFER, LÖSUNGEN UND REAGENZIEN 164
SEQUENZEN 170

DANKSAGUNG 173

Abkürzungsverzeichnis

A

α	Anti-
A. bidest.	lat. Aqua bidestillata, zweifach destilliertes Wasser
Ab	Antikörper
AMP^+	Ampicillin-haltig
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure (n)
ATCC	engl. American Type Culture Collection

B

BHK	engl. baby hamster kidney cells
bp	Basenpaare
BRSV	Respiratorisches Synzytialvirus des Rindes (Bovines RSV)

C

°C	Grad Celsius
CAP	calf intestinal Phosphatase
CCA	engl. chimpanzee coryza agent
Ci	Curie
cpe	engl. cytopathic effect, zytopathischer Effekt
CTL	engl. cytotoxic T-lymphocyte, zytotoxische T-Zelle

D

Da	Dalton
DC	engl. dendritic cell (Dendritische Zelle)
Δ	delta, Deletionsmutante
DAS	Doppel-Antikörper-Sandwich
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. deoxyribonucleic acid bzw. Deoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxyribonukleosid-5´-Triphosphat
DTT	Ditriothreitol

E

E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure bzw. –acid
ELISA	engl. enzyme linked immuno sorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	lat. et alteri oder et alii (und andere)

F

F	Fusionsprotein
FBS	Fötales Rinderserum
FI	Formalin inaktiviert

G

g	Gramm
G	Glykoprotein
GAG	Glykosaminglykane
griech.	griechisch, griechische Sprache

H

h	Stunde
HLA	engl. human leucocyte antigen
HN	Hämagglutinin Neuraminidase
HRP	engl. horseradish peroxidase (PO, Peroxidase)
HRSV	Respiratorisches Synzytialvirus des Menschen (humanes RSV)

I

IE	Infektiöse Einheit
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
IL	Interleukin

K

kDa	Kilodalton
kbp	Kilo-Basenpaare

L

l	Liter
lat.	lingua latina, lateinische Sprache, lateinisch
LB	Luria Bertani

LB-Amp(+)	Luria Bertani Medium mit Ampicillin
L.M.P.	low melting point
log	Logarithmus

M

M	Matrixprotein
M	Molar
mAb	monoklonaler Antikörper
MCS	engl. multiple cloning site
MEM	Minimum Essential Medium
MHC	engl. major histocompatibility complex
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	engl. multiplicity of infection
MVA	Modifiziertes Vacciniavirus Ankara
MW	Molekulargewicht

N

NP	Nukleoprotein
N	Stickstoff, Amino-
NS	Nicht Struktur Protein

O

OD	optische Dichte

P

PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase Kettenreaktion
Pen-Strep	Penicillin und Streptomycin
pfu	engl. plaque forming unit (Plaque bildende Einheit)
pg	Pikogramm
pH	lat. potentia Hydrogenium
p.i.	post infectionem
PIV3	Parainfluenzavirus 3
pNPP	Paranitrophenylphosphat
PO	Peroxidase
PPRV	Peste de Petit Ruminants Virus

R

r	rekombinant oder rabbit
RIPA	Radioimmunopräzipitationsassay
RNA	engl. ribonucleic acid bzw. Ribonukleinsäure
rpm	engl. rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RSV	Respiratorisches Synzytialvirus
RSVIG	RSV-Immunglobulin
RT	Raumtemperatur

S

SPF	specific pathogen-free (spezifisch pathogen-frei)

U

U	engl. Unit (Einheit)
UV	Ultraviolett
UVP	UV-Transilluminator

V

Vol.	Volumen
v/v	engl. volume per volume, Volumenanteil pro Volumenanteil

W

w/v	engl. weight per volume, Gewichtsanteil pro Volumenanteil
wt	Wildtyp

1 Einleitung

Impfstoffe sind in der Veterinär- sowie Humanmedizin seit vielen Jahren als die wirksamsten und kostengünstigsten Arzneimittel zur Bekämpfung bakterieller und viraler Infektionskrankheiten etabliert.

In der Impfstoffentwicklung müssen jedoch auch neue Wege beschritten werden, um Infektionskrankheiten wirkungsvoll begegnen zu können, gegen welche sich die Anwendung bisher verfügbarer Impfstoffe als unzureichend erwiesen haben. Hierzu zählen wichtige chronische Virusinfektionen, wie z. B. Hepatitis C und AIDS, aber auch akute virale Erkrankungen, wie Infektionen mit Respiratorischen Synzytialviren (RSV).

Die Respiratorischen Synzytialviren haben weltweit große Bedeutung bei Infektionen der Atemwege in Kälbern (Respiratorisches Synzytialvirus des Rindes, Bovines RSV, BRSV) und Kleinkindern (Respiratorisches Synzytialvirus des Menschen, Humanes RSV, HRSV).

Das Respiratorische Synzytialvirus des Menschen ist in den ersten Lebensjahren eines Kindes eine der bedeutendsten Ursachen für stationäre Behandlungen in Folge schwerer Atemwegserkrankung und spielt auch bei der Entwicklung von Bronchialasthma im Erwachsenenalter ein große Rolle (RSV-Immunpathogenese). Erste Ansätze zur Entwicklung eines HRSV-spezifischen Impfstoffes scheiterten in den 60iger Jahren, als sich im klinischen Versuch an Impflingen kein Impfschutz, sondern z.T. sogar eine Verschlimmerung der HRSV-bedingten Atemwegserkrankung zeigte. Bis heute gibt es keinen Impfstoff gegen die HRSV-Infektion in der Humanmedizin.

Das Respiratorische Synzytialvirus des Rindes gilt als einer der wichtigsten Erreger der multifaktoriellen Rindergrippe, einer Erkrankung, die große wirtschaftliche Verluste verursacht. Zur Bekämpfung der BRSV-Infektion des Rindes stehen in der Veterinärmedizin Impfstoffe zur Verfügung, deren Schutzwirkung jedoch als unzureichend angesehen wird. Jüngste Experimente mit Formalin-inaktiviertem BRSV (FI-BRSV) als Impfstoff in Kälbern zeigten sogar eine erkrankungsverstärkende Wirkung, sehr ähnlich der, die vor Jahrzehnten bei der Entwicklung eines Humanimpfstoffes beobachtet worden war. Da auch die natürliche Infektion und Erkrankung des Kalbes große Übereinstimmungen mit der HRSV-Infektion des Kindes aufweist, gilt die BRSV-Infektion als ein vorzügliches Infektionsmodell zur Erforschung RSV-spezifischer Erkrankungen beziehungsweise deren Prophylaxe.

Vorliegende Arbeit soll neuartige experimentelle Impfstoffe gegen die Infektion von Kälbern mit BRSV untersuchen. Die *in vitro*- und *in vivo*-Charakterisierung solcher Impfstoffe auf der Basis von rekombinanten Vacciniaviren soll dazu beitragen, die möglichen Ursachen einer RSV- spezifischen Immunpathogenese besser zu verstehen und die Entwicklung eines wirksamen Impfstoffes für die Veterinär- und Humanmedizin voranzutreiben.

2 Literaturübersicht

2.1 Respiratorische Synzytialviren

2.1.1 Allgemeines

Die ***Respiratorischen Synzytialviren*** sind als weltweite Ursache von Lungenentzündung, Bronchiolitis, Tracheobronchitis und Erkrankungen des oberen Respirationstraktes bei Mensch und Tier bekannt. Das ***Respiratorische Synzytialvirus des Rindes (BRSV***) wurde erstmals 1970 aus respiratorisch erkrankten Kälbern isoliert (PACCAUD und JACQUIER 1970). Das ***Respiratorische Synzytialvirus des Menschen (HRSV)*** wurde bereits 1956 aus Schimpansen und Tierpflegern mit Schnupfen isoliert und als chimpanzee coryza agent (CCA) bezeichnet (BLOUNT, Jr. et al. 1956). CHANOCK et al. isolierten 1957 das identische Virus bei Kindern mit schweren Atemwegserkrankungen und einem Kind mit Laryngotracheobronchitis und bezeichneten es als Respiratorisches Synzytialvirus (CHANOCK et al. 1957). Der Name leitet sich von der Fähigkeit des Virus ab, nach der Infektion von Zellen typische Riesenzellen, sogenannte Synzytien, zu bilden und der Eigenschaft Erkrankungen des Respirationstraktes hervorzurufen. Es werden zwei RSV-Subtypen, A und B, unterschieden, welche sich auf Grund ihrer Reaktivität mit G-Protein-spezifischen monoklonalen Antikörpern (mAb) unterscheiden (JOHNSON et al. 1987; SULLENDER et al. 1991; STORCH et al. 1991; BAKER et al. 1992; FURZE et al. 1994; CANE und PRINGLE 1995; PROZZI et al. 1997). SCHRIJVER et al. führten für BRSV 1996 einen dritten Subtyp AB ein (SCHRIJVER et al. 1996). Die Unterschiede der Aminosäurekomposition des G-Proteins zur Einteilung der Subtypen sind bei BRSV jedoch nicht so auffällig wie bei HRSV (FURZE et al. 1997).

2.1.2 Taxonomie und Charakteristika

Die Respiratorischen Synzytialviren (RSV) gehören taxonomisch in die Familie der *Paramyxoviridae* (*para*, lat.: neben, an der Seite von; *myxa,* griech.: Schleim) (FREY et al. 1997). Sie gehören dem Genus *Pneumovirus* an, welches zusammen mit dem Genus *Metapneumovirus* die Unterfamilie *Pneumovirinae* bildet (siehe Tabelle 1). Zu den Respiratorischen Synzytialviren zählen neben dem RSV des Menschen (HRSV, Humanes RSV) und dem RSV des Rindes (BRSV, Bovines RSV), das RSV des Schafes (ORSV, Ovines RSV) und das RSV der Ziege (CRSV, Caprines RSV) (COLLINS et al. 2001). Alle diese Vertreter weisen starke Homologien in ihrer Struktur, Serologie und den Strukturproteinen auf (TRUDEL et al. 1989).

Tabelle 1: Familie *Paramyxoviridae* und deren Unterfamilie *Paramyxovirinae.*

Familie Paramyxoviridae			
	Subfamilie Pneumovirinae		
		Genus Pneumovirus	Respiratorisches Synzytialvirus des Menschen (HRSV)
			Respiratorisches Synzytialvirus des Rindes (BRSV)
			Pneumoniavirus der Maus (PMV)
		Genus Metapneumovirus	Rhinotracheitisvirus der Pute
			Humanes Metapneumovirus (VAN DEN HOOGEN et al. 2001)

Daneben umfasst die Familie *Paramyxoviridae*, die Unterfamilie *Paramyxovirinae* mit den Genera *Respirovirus* (u.a. humanes und bovines Parainfluenzavirus Typ 3, Sendaivirus), *Rubulavirus* (u.a. Mumps, canines Parainfluenzavirus Typ 2), *Avulavirus* (u.a. Newcastle-Disease-Virus), *Morbillivirus* (u.a. Masern, Hundestaupe, Rinderpest, PPRV) und *Henipavirus* (u.a Hendravirus, Nipahvirus) (COLLINS et al. 2001; MODROW et al. 2003).

Die Mitglieder der Familie *Paramyxoviridae* haben folgende gemeinsame Merkmale:

Das Genom besteht aus einzelsträngiger RNA in Negativorientierung und ist nicht segmentiert. Es befindet sich in einem RNAse-resistenten helikalen Nukleokapsid, welches auch die virale Polymerase enthält. Das *Paramyxoviridae*-Genom besteht bei allen Mitgliedern dieser Familie aus sechs Genen, wobei einzelne Vertreter ein bis fünf zusätzliche Gene enthalten können (siehe Abbildung 1). Diese sechs Gene kodieren für das RNA-bindende N-Protein des Nukleokapsids (Nukleoprotein), das Phosphoprotein P des Nukleokapsids, die große katalytische Untereinheit L der RNA-Polymerase, das nichtglykosylierte Matrixprotein M, das Attachment-Protein G, H oder HN und das Fusionsprotein F. Die Transkription des Genoms erfolgt in einem sequentiellen Stopp-Neustart-Modus, wobei subgenomische mRNAs produziert werden. Alle Abschnitte des RSV-Replikationszyklus finden im Zytoplasma der infizierten Zelle statt.

Die Virusvorläufer entstehen dadurch, dass alle Viruskomponenten, d.h. das Nukleokapsid, das M-Protein und die Oberflächen-Glykoproteine G und H zur Plasmamembran transportiert werden und durch den Prozess der Abschnürung aus der Wirtsplasmamembran ihre Lipidhülle erhalten (LAMB und KOLAKOFSKY 2001; GHILDYAL et al. 2005). Dabei hat das M-Protein eine Organisatorfunktion (GAROFF et al. 1998; CATHOMEN et al. 1998). Dem Fusionsprotein F wird ebenfalls eine essentielle Bedeutung bei der Neubildung und Abschnürung neuer Viruspartikel zugeschrieben, da die Expression des

Sendaivirus-F-Proteins zur Freisetzung von „virusähnlichen Partikeln“ („virus-like particles“) führt (TAKIMOTO et al. 2001). Wie bei anderen Viren ist auch hier zum Transport und Austritt neu gebildeter Viruspartikel die Interaktion mit den zellulären Aktin und Mikrotubulin nachgewiesen (BURKE et al. 1998; TAKIMOTO et al. 2001; BOSE et al. 2001; KALLEWAARD et al. 2005). Der Eintritt in die Wirtszelle erfolgt durch Adsorption über die HN-, H- oder G-Proteine an neuraminsäurehaltige Oberflächenkomponenten der Zelle und über Fusion des F-Proteins der Virushülle mit der Wirtszellmembran, was zur Aufnahme des Nukleokapsids in die Zelle führt (TAKIMOTO und PORTNER 2004).

Die Vertreter der Unterfamilie *Pneumovirinae* (Pneumoviren) sind nur entfernt verwandt mit den Mitgliedern der Unterfamilie *Paramyxovirinae* (Paramyxoviren). Die entfernte Verwandtschaft zwischen den beiden Unterfamilien zeigt sich bei der Untersuchung der Aminosäuresequenzen verschiedener Proteine. Beim Vergleich des Fusionsproteins F und der Polymeraseuntereinheit L zeigte sich eine nachweisbare, wenn auch geringradige Verwandtschaft (SPRIGGS et al. 1986; CHAMBERS et al. 1990; STEC et al. 1991; BARR et al. 1991; RANDHAWA et al. 1996). Ein weiterer Unterschied der beiden Unterfamilien zeigt sich bei der Analyse des Genoms. Dieses kodiert bei den Pneumoviren für acht bis zehn mRNAs, bei den Paramyxoviren jedoch nur für sechs oder sieben Genprodukte
(siehe Abbildung 1). Die Pneumoviren synthetisieren zusätzliche folgende Proteine: die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2 und die Matrixproteine M2-1 und M2-2. BUCHHOLZ et al. konnten 1999 zeigen, dass das NS2-Gen nicht essentiell für die Virusreplikation von bovinem RSV ist, jedoch hat das Entfernen dieser kodierenden Sequenz geringere Virustiter zur Folge, was auf eine unterstützende Rolle des NS2-Proteins bei der Replikation hinweisen könnte (BUCHHOLZ et al. 1999). Außerdem konnten SCHLENDER et al. 2000 nachweisen, dass die NS-Proteine von BRSV Typ 1-Interferone, d.h. IFN-α und IFN-β, antagonisieren (SCHLENDER et al. 2000). Und 2002 konnten BOSSERT et al. die Rolle der RSV-NS-Proteine als Determinante für die Wirtsspezifität aufzeigen (BOSSERT und CONZELMANN 2002). Das M2-2-Protein ist essentiell für die Replikation, da die Entfernung dieses Gens geringere Titer zur Folge hat (JIN et al. 2000; CHENG et al. 2005). Das M2-1-Gen stellt einen Transkriptions-Elongations-Faktor dar; es reguliert die Transkription, Replikation und ist $Zn2^{+}$-bindend (FEARNS und COLLINS 1999; MASON et al. 2003; MODROW et al. 2003). Den Pneumoviren fehlen allerdings die V-, D- und C-Proteine einiger Paramyxoviren. Alle Pneumoviren besitzen außerdem ein außergewöhnliches Muzin-ähnliches G-Attachment-/-Adsorptionsprotein, welches sich strukturell deutlich von den Hämagglutinin-Neuraminidase- (HN-) oder den Hämagglutinin- (H-) Proteinen der Paramyxoviren unterscheidet. Pneumoviren haben somit, im Gegensatz zu ihren Verwandten, keine hämagglutinierenden Eigenschaften und keine

Neuraminidase-Aktivität. Eine Ausnahme bildet das Pneumoniavirus der Maus (PVM), dessen G-Protein Hämagglutinationsaktivität zu besitzen scheint (LING und PRINGLE 1989).

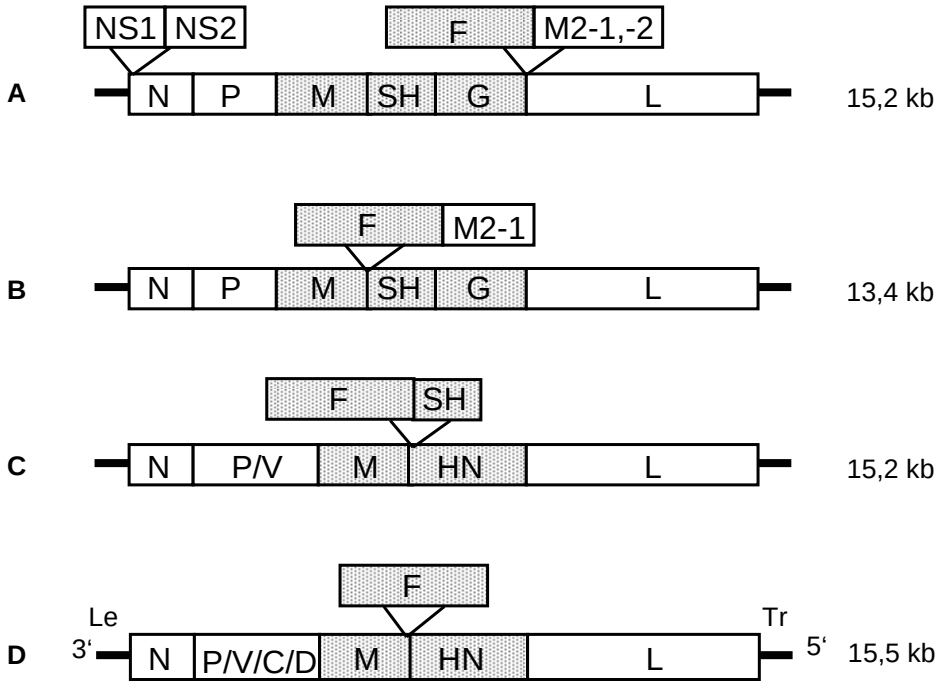


Abbildung 1: Vergleich des RSV-Genoms mit dem Genom anderer Mitglieder der Familie Paramyxoviridae. Le = Leader-Sequenz, Tr = Trailer-Sequenz, A = Pneumovirus (RSV), B = Metapneumovirus (APV), C = Rubulavirus (SV5), D = Respirovirus (PIV39). A und B repräsentieren die Unterfamilie Pneumovirus, C und D repräsentieren die Unterfamilie Paramyxovirus. Die mit der Virushülle assoziierten Proteine sind grau schattiert. Dargestellt sind die gemeinsamen Proteine N, P, M, F, HN oder G und L und die Spezies-spezifischen Proteine NS1, NS2, SH, M2-1, M2-2 und die Unterschiede in der Anordnung der Gene.

Die Mitglieder des Genus *Pneumovirus*, das BRSV und HRSV, haben dieselbe Genanordnung und ihre Nukleotidsequenzen sind bis zu 41% identisch (ELVANDER et al. 1998). Antikörper gegen BRSV oder RSV erkennen das N-, P-, M- und F-Protein des heterologen Virus (LERCH et al. 1991; AMANN et al. 1992). In einer Studie zeigten 9 von 16 F-spezifischen murinen Antikörpern gegen HRSV auch signifikante neutralisierende Aktivität gegen das bovine Virus (BRSV) (BEELER und VAN WYKE COELINGH 1989). HRSV und BRSV besitzen überlappende Wirtspezifitäten; wobei HRSV besser auf Zellen von Primaten und BRSV effizienter auf Zellen bovinen Ursprungs repliziert (PACCAUD und JACQUIER 1970; MATUMOTO et al. 1974).

Auch aufgrund dieser sehr großen Ähnlichkeiten wird die RSV-Infektion des Rindes als ein gut geeignetes Modell für die RSV-Infektion des Menschen angesehen (KIMMAN et al. 1987).

2.1.3 Morphologie

Das RSV-Virion (siehe Abbildung 2) besteht in seiner Basisstruktur aus einem Nukleokapsid in einer Lipidhülle. Die Viruspartikel haben eine unregelmäßige sphärische Gestalt und sind im Durchmesser ungefähr 150 bis 300 nm groß. Viruspartikel aus der Zellkultur können einen hohen Anteil an fadenförmigen Virionen enthalten. Diese fadenförmigen Partikel haben einen Durchmesser von ungefähr 60 bis 100 nm und können bis zu 10 µm lang sein. Die Bedeutung dieser fadenförmigen Virionen ist jedoch noch unklar (BERTHIAUME et al. 1974; ROBERTS et al. 1995; BUCHHOLZ et al. 2000). Die Hülle besteht aus einer Lipiddoppelmembran, welche aus der Wirtszellmembran stammt und enthält virale, mit einer transmembranen Domäne verankerte Oberflächenproteine. Hierzu zählen das Attachment-/ Adsorptionsprotein G, das Fusionsprotein F und das kleine hydrophobe (engl. small hydrophobic) Protein SH. Diese Proteine bilden die in elektronenmikroskopischen Bildern sichtbaren, sogenannte „Spikes“, welche auf der Virushülle einzelnen angeordnet sind (siehe Abbildung 2). Das RSV-Nukleokapsid ist eine symmetrische Helix mit einem Durchmesser von 12 bis 15 nm. Sie setzt sich aus der viralen RNA und den Proteinen N, L und P zusammen. Das L-Protein stellt die Hauptuntereinheit der Polymerase und das P-Protein einen Polymerase-Kofaktor dar. Die Bindung der genomischen und antigenomischen RNA erfolgt über das N-Protein.

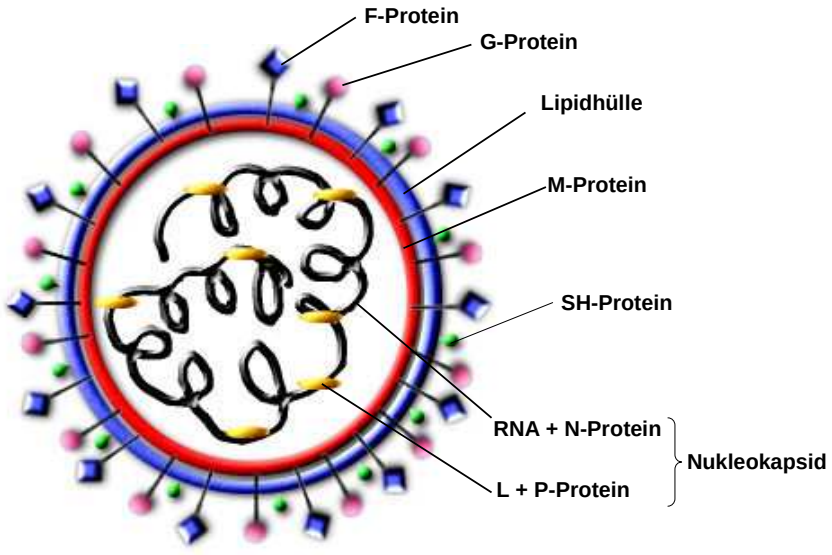


Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Pneumoviruspartikels. Das einzelsträngige RNA-Genom bildet zusammen mit dem RNA-bindenden N-Protein (Nukleoprotein), dem Phosphoprotein P und der großen katalytischen Untereinheit L der RNA-Polymerase das Nukleokapsid. Die Hülle besteht aus einer Lipiddoppelschicht in der die Oberflächenproteine F, G und SH mit einer transmembranen Domäne verankert sind. Das M-Protein ist mit der Innenseite der Lipidhülle assoziiert.

2.1.4 Die RSV-Oberflächenproteine

Alle Paramyxoviren besitzen zwei Oberflächenproteine, zusätzlich verfügen manche Rubulaviren und alle Pneumoviren noch über ein drittes Membranprotein (SH). Ein Glykoprotein (HN, H oder G) ist für die Adsorption an die Zelle verantwortlich und das andere Glykoprotein (F) vermittelt die pH-unabhängige Fusion der viralen Hülle mit der Plasmamembran der Wirtszelle (COLLINS et al. 2001).

2.1.4.1.1 Das Attachment-/Adsorptionsprotein G

Das G-Protein ist in der Membran der Pneumoviren verankert und für das Anheften bzw. Adsorbieren der Viruspartikel an die Zelloberfläche verantwortlich; hierbei werden die Oberflächen der Virus- und Zellmembran in sehr enge räumliche Nähe gebracht. Das G-Protein ist ein Membranprotein des Typs II, welches sich mit einer aminoterminalen, zytoplasmatischen Domäne, einer hydrophoben Ankerdomäne und einer C-terminalen Ektodomäne darstellt (COLLINS et al. 2001).

Das Pneumovirus-(Unterfamilie *Pneumovirinae*)-G-Protein unterscheidet sich strukturell deutlich von den Hämagglutinin-Neuraminidase- (HN)- oder den Hämagglutinin- (H)-Proteinen der Paramyxoviren (Unterfamilie *Paramyxovirinae*) und hat weder Hämagglutinations- noch Neuraminidase-Aktivität (GRUBER und LEVINE 1983). Es konnte als das RSV-Attachment-/-Adsorptionsprotein identifiziert werden, da die Verwendung spezifisch gegen das G-Protein-gerichteter Antikörper die Bindung von RSV an HeLa-Zellen verhinderte. Diese Funktion bestätigte sich durch die Verwendung von Antikörpern gegen das Fusionsprotein F, welche nur die Fusion der Lipidmembranen, aber nicht die Bindung des Virus an die Zelle verhinderten (WALSH und HRUSKA 1983; LEVINE et al. 1987).

Die Besonderheit des RSV-G-Proteins, zeigt sich in den Modifikationen der Zuckergruppen. Es weist einen sehr hohen Gehalt an Zuckergruppen auf, die N-glykosidisch und zu einem hohen Anteil, besonders an der Ektodomäne, O-glykosidisch an Serin- oder Threoninreste gebunden sind (WERTZ et al. 1985). Durch die Aminosäurekomposition, zusammen mit dem hohen Gehalt O-glykosidisch gebundener Zucker, erhält die Ektodomäne eine starke Ähnlichkeit mit Muzinen. Zwei Muzin-ähnliche Domänen, welche durch 13 Aminosäuren unterbrochen werden und vier Cystein-Reste enthalten, weisen bei allen RSV-Stämmen eine sehr konservierte Struktur auf (siehe Abbildung 3). Der als sogenannte „Cystein-Nase“ bezeichneten Struktur wird eine potenziell wichtige Rolle bei der Adsorption zugeschrieben (LANGEDIJK et al. 1996b; VALARCHER et al. 2000). Erst vor kurzem konnte *in vitro* die Bindung des G-Proteins an bestimmte zelluläre Glykosaminglykane (GAGs) gezeigt werden. Diese zellulären langen unverzweigten Polysaccharide aus sich wiederholenden Dissacharidintereinheiten der Extrazellularmatrix enthalten Heparansulfat und Chondroitinsulfat (FELDMAN et al. 1999; MARTINEZ und MELERO 2000;

HALLAK et al. 2000a; HALLAK et al. 2000b). Neueste Studien zeigen allerdings, dass die Deletion dieser konservierten Gensequenz („Cystein-Nase“) *in vitro* zwar die Infektiosität des Virus in HEp-2-Zellen vermindert, aber auf die Kinetik und Effizienz der intrazellulären Virusreplikation keine Auswirkung hat (TENG und COLLINS 2002). Auch war die *in vivo*-Infektiosität solcher Virusmutanten zumindest bei Versuchen im Mausmodell nicht eingeschränkt (TENG und COLLINS 2002). Erstaunlicherweise scheint das RSV-G-Protein auch nicht essentiell für die Zusammensetzung der Viruspartikel zu sein. Obwohl das Glykoprotein G dem Virus einen Wachstumsvorteil verschaffen kann (KARRON et al. 1997; TECHAARPORNKUL et al. 2001). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass RSV-Virionen sich auch unabhängig vom G-Protein an Zellen anheften können.

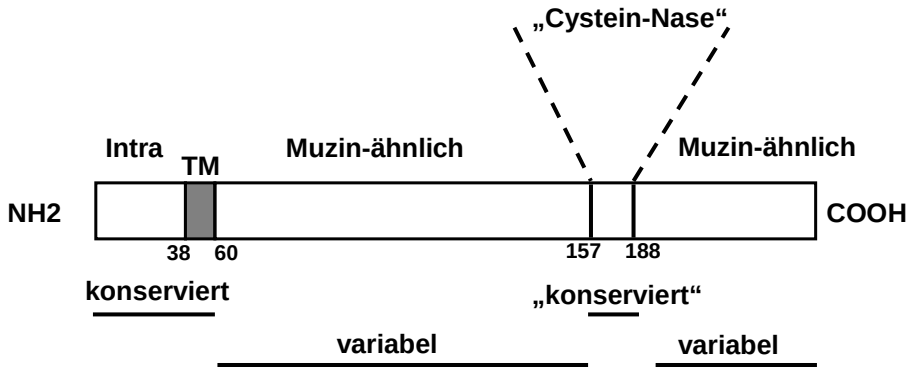


Abbildung 3: Struktur des RSV-G-Proteins (modifiziert nach (LARSEN 2000)) Intra= intrazellulärer Bereich, TM= Transmembran-Bereich, Muzin-ähnlich= extrazellulärer Bereich. Die „Cystein-Nase“ ist eine stark konservierte Struktur, welcher auch bei der Adsorption eine wichtige Rolle zugesprochen wird. Dieser Abschnitt, wie auch der intrazelluläre und der transmembrane Bereich des G-Proteins, stellen den konservierten Teil des Proteins dar.

2.1.4.1.2 Das Fusionsprotein F

Das Paramyxovirus-Fusionsprotein F vermittelt bei der Infektion das Eindringen des Virus in die Wirtszelle durch Fusion zwischen der Virushülle und der Wirtszellmembran. Untersuchungen zeigten, dass die RSV-Infektion eher durch Fusion an der Plasmamembran als durch Endozytose erfolgt (SRINIVASAKUMAR et al. 1991). Dabei wird das Nukleokapsid in das Zytoplasma eingeschleust. Im späteren Infektionsverlauf führen F-Proteine, die auf der Plasmamembran infizierter Zellen exprimiert werden, zur Fusion mit Membranen benachbarten Zellen und zur Bildung sogenannte Riesenzellen bzw. Synzytien. Die Riesenzellen sind ein typischer zytopathischer Effekt der RSV-Infektion in der Zellkultur und trugen zur Namensgebung dieser Viren als Synzytialviren bei. Die RSV-Fusion wird unter 18°C gehemmt und ist bei einem pH-Wert zwischen 5,5 und 8,5 effizient, also weitgehend pH-unabhängig. Experimente mit den Oberflächenproteinen von RSV zeigten, dass sowohl das F-Protein, wie auch das G-Protein an Heparin bindet (FELDMAN et al. 2001; KARGER et al. 2001).

Die F-Proteine der Pneumoviren und Paramyxoviren besitzen dieselbe Aminosäurenanzahl, sie werden ähnlich prozessiert, haben die gleichen biologischen Eigenschaften und weisen eine geringe aber signifikante Sequenzverwandtschaft auf (COLLINS et al. 1984; SRINIVASAKUMAR et al. 1991). Auch in ihrer Sequenz sind die F-Proteine der Pneumoviren sehr stark konserviert. Das F-Protein wird als Vorläuferprotein F_o synthetisiert und besitzt am aminoterminalen Ende ein typisches Signalpeptid für den Transport des Translokationskomplexes zur Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) (siehe Abbildung 4). Dort bewirkt eine hydrophobe Sequenzfolge am carboxyterminalen Ende die Verankerung des F_0-Proteins in der Membran und das Signalpeptid wird abgespalten. Das F_0-Protein wird beim Transport durch den Golgi-Apparat glykosyliert. Die Prozessierung des F_0-Proteins in den aminoterminalen Anteil F_2- und das F_1-Protein erfolgt durch eine Protease der Wirtszelle, die im Golgi-Bereich lokalisiert ist. Der F_2-Anteil bleibt mit dem F_1-Protein über eine Disulfidbrücke verbunden. Durch die Proteolyse des F_0-Proteins wird am Aminoterminus des F_1-Teils, ein stark hydrophober Bereich von zirka 25 Aminosäuren exponiert (COLLINS und MOTTET 1991). Dieser hydrophobe Bereich des F_1-Proteins kann nun im Verlauf des Infektions- und Adsorptionsvorgangs die Verschmelzung der viralen mit der zellulären Membran vermitteln. Antikörper, die gegen das F_1-Protein gerichtet sind, können diesen Fusionsvorgang unterbinden und verhindern die Aufnahme des Virus in die Zelle (WEST et al. 1994; MATHEISE et al. 1995).

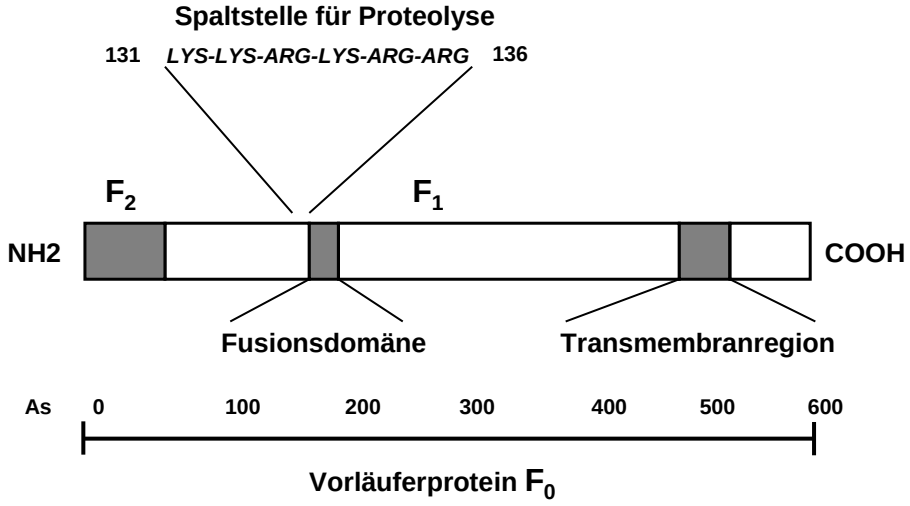


Abbildung 4: Lineare Struktur des Vorläuferproteins F_0 von BRSV (modifiziert nach (LARSEN 2000)) Hydrophobe Regionen innerhalb des Proteins sind grau dargestellt. Die Sequenz der Spaltstelle ist im oberen Teil der Abbildung dargestellt. Durch Proteolyse dieser Spaltstelle entstehen die F_1- und F_2-Proteinuntereinheiten, wobei die hydrophobe Fusionsdomäne am N-Terminus des F_1-Proteins freigesetzt wird.

2.1.5 Epidemiologie, Klinik und Pathogenese

Die Infektion mit BRSV ist, wie die RSV-Infektion des Menschen, eine der Hauptursachen von Atemwegserkrankungen und führt zu hohen ökonomischen Verlusten in der

Landwirtschaft (STOTT und TAYLOR 1985; VAN DER POEL et al. 1994). BRSV ist weltweit verbreitet und kann, besonders bei Erstinfektionen, zu schwersten respiratorischen Erkrankungen beim Kalb führen (ELLIS et al. 1996; UTTENTHAL et al. 1996; ELVANDER 1996; LARSEN et al. 2001). Die Übertragung erfolgt in der Regel durch direkten Kontakt; experimentell konnte jedoch auch die Übertragung auf dem Luftweg von einem Stall in einen anderen nachgewiesen werden (SMITH et al. 1975; MARS et al. 1999). Die BRSV-Infektion ruft häufig im Herbst und Winter Seuchenzüge hervor und Untersuchungen in den Niederlanden ergaben, dass in der Rinderpopulation eine Seroprävalenz von über 70% vorherrscht (VAN DER POEL et al. 1993; VAN DER POEL et al. 1994). BRSV wird bei Kälbern mit respiratorischer Symptomatik sehr häufig isoliert und auch in Deutschland stellte man bei mehr als 70% der Kälbern Seropositivität gegen BRSV fest (LOTTHAMMER und EHLERS 1990; WENTINK et al. 1994). Die hohe Seroprävalenz von BRSV in den untersuchten Rinderpopulationen weist auf ein endemisches Vorkommen hin (BAKER et al. 1986; LOTTHAMMER und EHLERS 1990; VAN DER POEL et al. 1993; WENTINK et al. 1994; VAN DER POEL et al. 1994; UTTENTHAL et al. 1996).

Das Virus ruft, vor allem beim Kalb und einjährigen Jungrindern, leichte Bronchiolitiden und eine akute interstitielle Pneumonie mit Alveolitis und Bronchitis hervor (JACOBS und EDINGTON 1971; MOHANTY et al. 1976; VAN DEN INGH et al. 1982). Bei schweren Verlaufsformen können sich auch schwere Bronchopneumonien entwickeln, die dann auch letal enden (PIRIE et al. 1981). Vor allem die cranioventralen Bereiche der Lunge sind häufig betroffen (BRYSON et al. 1978b). Am häufigsten erkranken Kälber im Alter von einem bis fünf Monaten (BAKER et al. 1986). Trotzdem können auch erwachsene Rinder nach Infektionen mit BRSV schwere Krankheitszeichen zeigen (ELLIS et al. 1996; ELVANDER 1996). Die Erkrankung ist symptomatisch charakterisiert durch Fieber, Husten, serösen oder mukopurulenten Nasenausfluss, geringer bis moderater Hyperpnoe und verstärkten Atemgeräuschen. Mittelschwer betroffene Kälber zeigen Atemfrequenzen über 80 pro Minute, Tachypnoe, raue Atemgeräusche über den gesamten Lungenbereich und schweren Husten. Bei schwer infizierten Kälbern reichen die Symptome bis zur Dyspnoe und betroffene Kälber können ein subpleurales und interstitielles Emphysem aufweisen (PIRIE et al. 1981). Die allgemeinen Krankheitssymptome können von einer leicht erhöhten Körpertemperatur, leichter Abgeschlagenheit und Anorexie bis zu hohem Fieber, starker Depression und Koma reichen (BRYSON et al. 1978b; BAKER et al. 1986; KIMMAN et al. 1988). Die Mortalität der BRSV-Infektion ist niedrig, die Morbidität ist hoch (BRYSON et al. 1978a; HEALY et al. 1993). Die Pathogenese der RSV-Infektion konnte nicht detailliert geklärt werden, jedoch weisen einige Daten darauf hin, dass ein immunvermittelter Mechanismus zu Grunde liegen könnte (LARSEN 2000). Die Infektion mit dem Virus erhöht das Risiko einer bakteriellen Besiedelung des Respirationstraktes und

etwa 90% der bakteriellen Pneumonien entwickeln sich nach einer häufig eher subklinischen RSV-Infektion (BABIUK et al. 1988; LARSEN et al. 1999). Bakterielle Sekundärinfektionen, vor allem mit Pasteurella-Spezies und Mykoplasmen, führen dann zu schweren Lungenerkrankungen mit hoher Mortalität (BRYSON et al. 1979; VAN DEN INGH et al. 1982; HEALY et al. 1993; FRANKENA et al. 1994).

Infektionen mit dem RSV des Menschen sind weltweit verbreitet. In gemäßigten Zonen ruft das Virus jährliche Infektionsausbrüche vor allem im Winter und Frühjahr hervor, während in den Tropen das ganze Jahr über Infektionsausbrüche festgestellt werden können (SPENCE und BARRATT 1968; RAHMAN et al. 1990; VARDAS et al. 1999). Das Virus gilt als hochinfektiös und wird durch Aerosole, direkten Kontakt und sogar über kontaminierte Oberflächen übertragen (HALL et al. 1981). Die Inkubationszeit beträgt zwei bis sieben Tage (MILLS et al. 1971; HALL und DOUGLAS, Jr. 1981). HRSV-bedingte Erkrankungen sind ein infektiologisches Hauptproblem des ersten Lebensjahres, wobei Säuglinge im Alter von 6 Wochen bis 6 Monaten am stärksten gefährdet sind. Mit zwei Jahren sind fast alle Kinder erstmals infiziert worden und über 50% werden reinfiziert (HENDERSON et al. 1979; WEIGL et al. 2005b). Die höchste Morbidität hat die RSV-Erkrankung bei Kindern unter 6 Monaten und Kindern mit Risikofaktoren, wie z.B. Frühgeburten, bronchopulmonäre Dysplasien, angeborenem Herzkreislauferkrankungen oder Immundefizienzen (PARROTT et al. 1973; HALL et al. 1979; GLEZEN et al. 1981; MACDONALD et al. 1982; HALL et al. 1986; GREEN et al. 1989; NAVAS et al. 1992; WEIGL et al. 2002; WEIGL et al. 2005a). In Industrieländern sterben Schätzungen zu Folge bis zu 1,5% der ins Krankenhaus eingewiesenen Kinder, jedoch sind die Mortalitätsraten bei Kindern mit bestehenden Erkrankungen/Risikofaktoren bedeutend höher (MACDONALD et al. 1982; LA VIA et al. 1992; LA VIA et al. 1993). Klinisch schwere RSV-Infektionen kommen aber auch bei älteren Menschen und immungeschwächten Erwachsenen vor (ENGLUND et al. 1988; FLEMING und CROSS 1993; WHIMBEY et al. 1995; HAN et al. 1999).

RSV repliziert vor allem in den epithelialen Zellen des Nasopharynx und die Infektion scheint auf den Respirationstrakt limitiert zu sein (GARDNER et al. 1970; HALL et al. 1978; COLLINS et al. 2001). In immunologisch kompetenten Individuen konnte keine Virämie nachgewiesen werden. Allerdings konnten RSV-Antigene in zirkulierenden mononukleären Leukozyten nachgewiesen werden (DOMURAT et al. 1985; ROHWEDDER et al. 1998). Das Virus kann bedingt in mononukleären Zellen in Makrophagen *in vitro* replizieren (KRILOV et al. 1987). Und vor kurzem konnten in peripheren Blutzellen von Patienten mit einer RSV-Infektion der unteren Atemwege virale RNA des Respiratorischen Synzytialvirus nachgewiesen werden (YUI et al. 2003). Auch in Rindern konnte eine Persistenz von RSV in B-Lymphozyten lokaler Lymphknoten gezeigt werden und diese Viren waren noch nach

6 Monaten *in vitro* replikationsfähig (VALARCHER et al. 2001). Die pathogenetische und epidemiologische Bedeutung dieser Entdeckung ist jedoch unklar.

2.1.6 Immunität nach Infektionen mit RSV

2.1.6.1 Einführung in die Grundlagen der Immunität

Die Mechanismen der Immunabwehr werden in zwei Gruppen eingeteilt. Zum einen gibt es eine ***unspezifische Immunabwehr***, die eingedrungene Infektionserreger als fremd erkennt und eliminiert. Sie wird auch als sogenannte ***natürliche, angeborene oder nicht-adaptive Immunabwehr*** bezeichnet, da sie als erste aktiv wird, nachdem zum Beispiel ein Virus, in den Körper eingedrungen ist. Sie besteht aus dem Zusammenspiel bestimmter Immunzellen, z.B. Granulozyten, Makrophagen oder natürlichen Killerzellen und löslichen Produkten, wie z.B. Akutephaseproteinen, Faktoren des Komplementsystems, sowie Zytokinen und Interferonen. Zum anderen werden Infektionen durch eine zweite ***Erreger-spezifische, adaptive Immunabwehr*** beantwortet***.*** Sie entwickelt sich erst nach der Etablierung der Infektion. Sie umfasst Antikörper-produzierende B-Zellen, als Bestandteil des ***humoralen Abwehrsystems***, sowie T-Helferzellen und zytotoxische T-Lymphozyten, welche zusammen das ***zelluläre Abwehrsystem*** repräsentieren.

Die zellulären Bestandteile des Blutes werden nach Ihren Vorläuferzellen, den ***hämatopoetischen Stammzellen***, eingeteilt. Aus den ***myeloiden Vorläuferzellen*** entstehen die Granulozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen (DC) und Mastzellen. Aus den ***lymphatischen Vorläuferzellen*** gehen die ***B-Zellen*** (B-Lymphozyten) und ***T-Zellen*** (T-Lymphozyten) hervor.

Die ***Dendritischen Zellen*** bilden hierbei ein wichtiges Bindeglied zwischen ***angeborener*** und ***adaptiver Immunantwort***. DC sind darauf spezialisiert Antigene aufzunehmen, diese aufzubereiten und sie den Lymphozyten zu präsentieren. DC wandern aus dem Blut in die Gewebe und nehmen extrazelluläre Flüssigkeit auf; treffen sie auf ein Pathogen, reifen sie und wandern zu den Lymphknoten.

T-Lymphozyten erkennen infizierte Zellen mit Hilfe der ***T-Zell-Rezeptoren (TCR).*** Diese Rezeptoren stellen einen Proteinkomplex dar, der in der Zytoplasmamembran der T-Lymphozyten verankert ist. Es gibt zwei verschiedene Typen von TCRs, einen αβ-TCR, ein Heterodimer aus einer α- und einer β-Kette, und einen γδ-TCR, welcher aus einer γ- und δ-Kette besteht. Mit den αβ-TCR sind die CD4- oder CD8-Rezeptoren assoziiert, anhand derer man die T-Lymphozyten in die Untergruppen der CD4-positiven ($CD4^+$) T-Helferzellen und der CD8-positiven ($CD8^+$) zytotoxischen T-Zellen einteilt.

Die ***CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen ($CD8^+$)*** erkennen infizierte Zellen, lysieren diese und tragen so entscheidend zur Begrenzung der Infektion im Organismus bei. Sie lagern sich dabei über den T-Zell-Rezeptor und den CD8-Rezeptor an MHC-Klasse-I-Moleküle an

(major histocompatibility complex, beim Menschen auch als HLA, human leucocyte antigen, bezeichnet), welche Peptidabschnitte von endogenen Antigenen, wie z.B. virale Proteine, als Fremdkomponenten präsentieren. MHC-Klasse-I-Proteine oder Antigene befinden sich auf allen Zellen eines Organismus mit Ausnahme der Zellen im Gehirn.

T-Helferzellen (CD4$^+$) binden mit ihren T-Zell-Rezeptoren und den CD4-Rezeptoren an MHC-Klasse-II-Moleküle. Letztere sind nur auf potenziell antigenpräsentierenden Zellen vorhanden, wie z.B. Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen und B-Zellen. Auf MHC-Klasse-II-Molekülen werden durch Phagozytose aufgenommene exogene Fremdproteine, welche in den zellulären Endosomen proteolytisch abgebaut wurden, präsentiert. Man nimmt an, dass die meisten T-Zellantworten durch Dendritische Zellen induziert werden. Diese Zellen befinden sich in peripheren Geweben und nehmen an Infektionsstellen im Gewebe Fremdantigene auf. CD4$^+$-Zellen reagieren auf ihre Interaktion mit den antigenpräsentierenden Zellen mit der Freisetzung verschiedener Zytokine und stimulieren so die Aktivität anderer immunologisch aktiver Zellen.

Bei ihrem ersten Kontakt mit einem Antigen sezernieren die naiven ***T-Helferzellen (T_H0-Zellen, CD4$^+$)*** eine Vielzahl löslicher Faktoren. Diese Eigenschaft geht verloren, wenn sich die T_H0-Zellen entweder zu ***T_H1-*** oder zu ***T_H2-Zellen*** differenzieren. T_H1-Zellen fördern durch die Zytokine (Interleukin) IL-2 und (Interferon) IFN-γ vor allem die Aktivierung weiterer T-Helferzellen sowie diejenige von zytotoxischen T-Zellen und Makrophagen. T_H2-Zellen geben bevorzugt IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 ab und stimulieren die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen und die zelluläre Immunantwort auf den Schleimhautoberflächen (MOSMANN und COFFMAN 1989; YAMAMOTO et al. 1996). Die durch Antigenerkennung aktivierte T-Helferzelle steuert mit Hilfe der Zytokine die Immunantwort.

Im Organismus führen viele verschiedenen Faktoren zur Differenzierung stimulierter CD4$^+$-T-Zellen in T_H1- oder T_H2-Zellen. Bei der Regulation der Differenzierung von CD4$^+$-T-Helferzellen zu T_H1-Zellen, wird dem IL-12 eine Schlüsselrolle zugeschrieben. Humanes oder murines IL-12 stellt einen essentiellen Faktor in der frühen Differenzierungsphase von CD4$^+$-T-Helferzellen dar (HSIEH et al. 1993; MANETTI et al. 1993). *In vitro*-Untersuchungen in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC, peripheral blood mononuclear cells) BRSV-immunisierter Rinder ergaben, dass durch IL-12 ein 20facher Anstieg der IFN-γ-Produktion erzielt werden kann. Als Hauptproduzenten von IFN-γ konnten CD4$^+$-T-Zellen identifiziert werden (COLLINS et al. 1998).

Auch dem Interleukin 18 (IL-18) wird die Funktion als Differenzierungsfaktor von CD4$^+$-T-Helferzellen zu T_H1-Zellen zugeschrieben (OKAMURA et al. 1995; KANAKARAJ et al. 1999; TOMINAGA et al. 2000; SWAIN 2001). Somit weisen erhöhte

IL-18-, IL-12-, IL-2- sowie IFN-γ-Werte auf eine eher T_H1-gerichtete Immunantwort, während erhöhte IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 Werte auf eine eher T_H2-gerichtete Immunantwort, hin.

2.1.6.2 Humorale Immunantwort nach RSV-Infektion

Im Verlauf der Infektion mit RSV werden Antikörper gegen fast alle RSV-Proteine gebildet (WARD et al. 1983; VAINIONPAA et al. 1985; GIMENEZ et al. 1987). Die Bedeutung der Antikörperantworten bei der Bekämpfung einer RSV-Infektion konnte in Tiermodellen, vor allem in Baumwollratten und Mäusen, gezeigt werden. Die Lungeninfektion dieser Tiere konnte durch passiv übertragene monoklonale Antikörper gegen das F-Protein und polyklonale Antikörper verhindert werden (HEMMING und PRINCE 1992; TAYLOR et al. 1992) Nur Antikörper, welche spezifisch gegen das F- oder G-Protein gerichtet sind, neutralisieren das Virus in *in vivo*-Experimenten (COLLINS et al. 2001). Außerdem zeigten Infektionsversuche in Mäusen, dass passiv übertragene F- bzw. G-spezifische Antikörper auch eine *in vivo*-Schutzwirkung besitzen (TAYLOR et al. 1984). Virusneutralisierende Antikörper werden auch in der Prophylaxe und vor allem bei der Behandlung von erkrankten oder gefährdeten Kindern benutzt; z.B. Palivizumab (Antikörper gegen das Fusionsprotein) oder RSVIG (RSV-Immunglobulin) (SIBER et al. 1992; GROOTHUIS et al. 1993; HEMMING et al. 1995; SUBRAMANIAN et al. 1998; ANON. 1998; SIMOES und GROOTHUIS 2002; PEDRAZ et al. 2003).

HRSV-spezifische virusneutralisierende Antikörper sind im Serum aller Neugeborenen, durch plazentaren Transport maternaler Antikörper, vorhanden (PARROTT et al. 1973). Diese Antikörper nehmen jedoch schon in den ersten Lebensmonaten rapide ab und erhöhen somit das Risiko einer RSV-Infektion (HARSTEN et al. 1989). Säuglinge produzieren bei einer Infektion aber nur geringe Titer RSV-spezifischer Antikörper. (MCINTOSH et al. 1978; BRANDENBURG et al. 1997). Diese limitierte Antikörperbildung ist vor allem auf die Unreife des Immunsystems bei Kleinstkindern und die Wirkung maternaler Antikörper zurückzuführen (MURPHY et al. 1986a; BRANDENBURG et al. 1997).

Zur Bedeutung von maternalen BRSV-spezifischen Antikörpern bei Kälbern gibt es nur wenige Untersuchungen. Sie können regelmäßig nachgewiesen werden, bieten jedoch keinen effektiven Schutz vor einer Infektion mit dem Virus (BRYSON et al. 1983; KIMMAN et al. 1987). Das Auftreten und die Schwere der RSV-Erkrankung steigen mit abnehmenden Titern maternaler Antikörper (KIMMAN et al. 1988; BELKNAP et al. 1991). Maternale Antikörper könnten aber auch hier eine limitierte Antikörperantwort zur Folge haben (SANDBULTE und ROTH 2002).

2.1.6.3 Zelluläre Immunantwort nach RSV-Infektion

Virusspezifische T-Zellantworten haben einen erheblichen Einfluss auf den klinischen Verlauf der RSV-Infektion. Es konnte gezeigt werden, dass T-Zellantworten einen wichtigen Beitrag

zur Beseitigung des Virus aus dem Organismus leisten (BANGHAM et al. 1985; BANGHAM und MCMICHAEL 1986; CANNON und BANGHAM 1989; MBAWUIKE et al. 2001; OSTLER und EHL 2002). Dies konnte auch für die Eliminierung des Virus in infizierten Rindern bestätigt werden (GADDUM et al. 2003; SANDBULTE und ROTH 2003). Nach RSV-Infektion werden $CD4^+$- und $CD8^+$-T-Zellen gegen fast alle RSV-Proteine gebildet. Die Übertragung spezifischer $CD4^+$- und $CD8^+$-T-Zellen befähigte Mäuse eine Infektion mit HRSV zu bekämpfen (CANNON et al. 1987). In Kälbern konnte die Bedeutung der $CD4^+$- und $CD8^+$-T-Zellen von BRSV-Infektionen durch Untersuchungen an gnotobiotisch, d.h. keimfrei aufgezogenen, Kälber, gezeigt werden. Hierbei konnte festgestellt werden, dass $CD8^+$-T-Zellen eine dominante Rolle in der Gesundung von Kälbern nach BRSV-Infektion spielen. (TAYLOR et al. 1995; THOMAS et al. 2000). Außerdem wurden vermehrt $CD4^+$- und $CD8^+$-T-Zellen in der Trachea und Lunge infizierter gnotobiotischer Kälber nachgewiesen, wobei die Anzahl $CD8^+$-T-Zellen höher war als die der $CD4^+$ (MCINNES et al. 1999). Trotzdem konnte bisher keine zytotoxische T-Zellimmunantwort ($CD8^+$) gegen das G-Protein, weder in der Maus noch im Menschen nachgewiesen werden. Allerdings können G-spezifische $CD4^+$-T-Zellimmunantworten in infizierten Mäusen gefunden werden (ANDERSON et al. 1991; VARGA et al. 2000). Beim Rind wurden ebenfalls $CD4^+$-T-Zellepitope auf dem Fusionsprotein F und Attachment-Protein G von BRSV identifiziert. Dabei zeigte sich, dass die $CD4^+$-T-Zellepitope im G-Protein vor allem in der zytoplasmatischen Domäne lagen und die des F-Proteins vor allem in der F_1-Untereinheit. Einige der immundominanten bovinen T-Zellepitope im F-Protein wurden auch von humanen T-Zellen erkannt (FOGG et al. 2001). Über die Rolle der Dendritischen Zellen bei der RSV-Infektion gibt es noch wenige Informationen. GILL et al. zeigten 2005, dass DCs durch RSV-Infektion in die Mukosa der Nase wandern (GILL et al. 2005). *In vitro*-Untersuchungen mit RSV-infizierten DCs zeigten, dass diese durch eine geringere T-Zellproliferation die $CD4^+$-T-Zellantwort beeinträchtigten (DE GRAAFF et al. 2005; GUERRERO-PLATA et al. 2005).

2.1.6.4 Mukosale Immunität

Pathogene, die in den Organismus über die Schleimhäute bzw. mukosalen Eintrittspforten eindringen, werden über das nicht-adaptive und adaptive Immunsystem bekämpft (BOYTON und OPENSHAW 2002). Als Schutz gegen Reinfektion mit respiratorischen Viren, spielen sekretorische IgA-Antikörper eine wichtige Rolle (FREIHORST und OGRA 2001; PILETTE et al. 2001). Die Antikörper werden aktiv in die Mukosa und das Lumen des Respirationstraktes transportiert und können das Virus neutralisieren, bevor sich eine Infektion etablieren kann. Bei Untersuchungen in Tieren und Menschen konnte eine Verbindung zwischen HRSV-spezifischen nasalen IgA-Titern und der Schutzwirkung vor der

Infektion mit HRSV gezeigt werden (CROWE, Jr. 1999). Die spezifischen IgA-Antikörper nur vorübergehend auf den Schleimhäuten vorhanden sind, ist ihre Schutzwirkung nicht dauerhaft.

2.1.7 Die RSV-Immunpathogenese

Infektionen mit HRSV sind die häufigste Ursache für eine schwere Infektion der unteren Atemwege bei Kindern, immunsupprimierten Personen und älteren Menschen (SIMOES 1999). Über 70% aller viralen Bronchitiden bei Kleinkindern sind Ursache einer Infektion mit HRSV (OPENSHAW 2002). Das Virus kann aber auch in Erwachsenen eine Influenza-ähnliche Erkrankung hervorrufen (ZAMBON et al. 2001; SIMOES 2001).

Ungeklärt ist bis heute jedoch, warum ein Grossteil der RSV-Infektionen nur geringe oder keine klinischen Symptome auslöst, während ein kleiner Teil der Infektionen durch einen sehr schweren Verlauf gekennzeichnet ist (RSV-Immunpathogenese). Eine mögliche Ursache ist, dass bestimmte Individuen eine physiologische Prädisposition haben, wie z.B. eine vorhandene Lungenfunktionsstörung (MARTINEZ et al. 1988). Außerdem kann die Infektionsdosis oder eine gleichzeitige Infektion mit anderen Krankheitserregern, den Krankheitsverlauf verschlimmern (GREENSILL et al. 2003). Die Hauptursache könnte die RSV-spezifische Immunantwort selbst sein, die die Schwere des Krankheitsverlaufs beeinflussen könnte; d.h. bestimmte Manifestationen der RSV-vermittelten Erkrankung könnten von immunpathologischer Natur sein. Diese Hypothese wird auch durch die Verknüpfung der Infektionserkrankung des unteren Respirationstraktes und dem Entstehen asthmatischer Erkrankungen untermauert (EVERARD 1999; OPENSHAW et al. 2003; HENDERSON et al. 2005). Der immunologische Mechanismus der möglichen Mitwirkung von RSV bei der Entstehung von Asthma ist bis heute nicht geklärt (AOYAGI et al. 2003; OPENSHAW et al. 2003)

Über die spezifische Immunantwort einer HRSV-vermittelten schweren Erkrankung der unteren Atemwege (Bronchiolitis) sind wenige Informationen verfügbar (ROMAN et al. 1997; KON und KAY 1999; BRANDENBURG et al. 2000). Untersuchungen in infizierten Kindern haben allerdings mehrheitlich gezeigt, dass eine vermehrt T_H2-gerichtete Immunantwort und die damit verbunden hohe Menge der Zytokine, wie z.B. IL-4, IL-5 und IL-13 und geringe Mengen der typischen T_H1-induzierten Zytokine wie IFN-γ, IL-2 und IL-12 mit einem schweren Verlauf der RSV-Infektion und einer Hyperreaktivität der Atemwege führt (JACKSON und SCOTT 1996; ROMAN et al. 1997; KON und KAY 1999; VAN SCHAIK et al. 1999; ABERLE et al. 1999; BENDELJA et al. 2000; PALA et al. 2002; AOYAGI et al. 2003; LEGG et al. 2003). Offensichtlich bestimmt das Gleichgewicht zwischen T_H1- und T_H2-gerichteter Immunantwort den protektiven und immunpathogenen Verlauf viraler Erkrankungen (OPENSHAW 2002).

Das Bestehen einer RSV-spezifischen Immunpathogenese wurde erstmals Ende der 60iger Jahre vermutet, als Kinder mit einer Formalin-inaktivierten und Alum-präzipitierten HRSV-Präparation geimpft wurden und nach folgender HRSV-Infektion sehr schwer erkrankten (KIM et al. 1969). Heute gilt die immunpathologische Grundlage dieses FI-HRSV-vermittelten schweren Krankheitsverlaufs als allgemein anerkannt (OPENSHAW et al. 2001).

2.1.7.1 HRSV-Impfstoff vermittelte Immunpathogenese in Kindern

Die HRSV-vermittelte Erkrankung bei Kindern unter 6 Monaten und Kindern mit Risikofaktoren mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden und somit ist die Entwicklung eines Impfstoffes seit geraumer Zeit sehr wünschenswert (CROWE, Jr. 2001b; PIEDRA 2003). Ein erfolgreicher Durchbruch wurde jedoch durch folgende Faktoren erschwert: Erstens ruft auch die natürliche HRSV-Infektion keine Immunantwort hervor, die einen vollkommenen Schutz vor Neuinfektionen bietet (HENDERSON et al. 1979; HALL et al. 1991). Zweitens ist die Morbidität der RSV-vermittelten Erkrankung bei sehr jungen Kindern am höchsten. Deshalb sollte ein Impfstoff auch in Kleinkindern eine Immunantwort, während noch maternale Antikörper im Organismus vorhanden sind, hervorrufen können (CROWE, Jr. 2001a). Drittens waren erste Impfansätze in den 60iger Jahren fehlgeschlagen, bei denen Kinder mit Formalin-inaktiviertem HRSV immunisiert wurden. Trotz hoher Antikörpertiter wurden viele Impflinge im folgenden Winter mit HRSV infiziert und erkrankten schwer. Der Großteil der Erkrankten musste ins Krankenhaus eingewiesen werden und zwei der Kinder starben an der Infektion (KIM et al. 1969; KAPIKIAN et al. 1969). Die hohen Antikörpertiter der Kinder waren jedoch nur in sehr geringem Masse virusneutralisierend (MURPHY et al. 1986b). Bei histopathologischen Untersuchung wurden Entzündungen, insbesondere der kleinen luftführenden Bronchiolen, mit Infiltrationen von Neutrophilen, Eosinophilen und mononukleären Zellen, festgestellt (Lungenpathologie, Impfstoff-vermittelte RSV-Immunpathogenese) (MCCORMACK und CLEWLEY 2002; GRAHAM et al. 2002). Dieser Fehlschlag bei den Immunisierungen mit FI-HRSV machte weitergehende Untersuchungen in verschiedenen Tiermodellen erforderlich.

2.1.7.2 Tiermodelle zur RSV-Impfstoff-vermittelten Immunpathogenese

Während der letzten Jahrzehnte wurden eine Vielzahl von Tiermodellen in der RSV-Forschung mit unterschiedlichem Erfolg evaluiert (HEMMING et al. 1985; BYRD und PRINCE 1997; BEMBRIDGE et al. 1999; SIMOES et al. 1999). Obwohl nur wenige Tierspezies ähnlich wie der Mensch, für eine RSV-Infektion empfänglich sind, haben Untersuchungen in diesen Modellen dazu beigetragen, die Ursachen der RSV-Immunpathogenese besser zu verstehen.

2.1.7.2.1 Mäuse

Das Mausmodell hat den Vorteil, dass eine Vielfalt von Inzuchtstämmen verfügbar ist, über deren immunologischen Hintergrund vielfältige Informationen und auch Reagenzien erhältlich sind.

In diesem Modell ist die RSV-Immunpathogenese nach FI-HRSV-Impfung insbesondere durch eine Ansammlung eosinophiler Zellen in der Lunge (Lungen-Eosinophilie) gekennzeichnet (WARIS et al. 1996). Die induzierte, stark T_H2-vermittelte Immunantwort scheint der Hauptverursacher der pathologischen Befunde in der Lunge zu sein (SRIKIATKHACHORN und BRACIALE 1997; BOELEN et al. 2000). Nach intradermaler Impfung von BALB/c-Mäusen mit rekombinantem Vacciniavirus (rVV), welche das HRSV-F (rVV-F) oder G-Gen (rVV-G) exprimierten, konnte mit rVV-F und darauf folgender HRSV-Infektion, eine „normale“ Immunantwort mit ausgeglichenem T_H1-/T_H2-Phänotyp ohne Lungenpathologie induziert werden. Allerdings zeigten die Mäuse, welche mit rVV-G immunisiert wurden, eine starke T_H2-gerichtete zelluläre Immunantwort, welche mit der Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13 und pulmonaler Eosinophilie verknüpft war (OPENSHAW 1995). Eine G-spezifische zytotoxische T-Zellantwort (CTL) konnte auch bei anderen Untersuchungen nicht nachgewiesen werden (JACKSON und SCOTT 1996; SRIKIATKHACHORN und BRACIALE 1997). Somit könnte eine Immunisierung mit rVV-G dieselbe Wirkung haben, wie die Immunisierung mit FI-HRSV. Bestätigt wurde diese Theorie zusätzlich durch Impfexperimente in Mäusen mit einem Vacciniavirus, welches nicht nur das G-Protein sondern zusätzlich ein CTL-Epitop des Matrixproteins M2 exprimierte. Hierbei konnte die T_H2-gerichtete Immunantwort und die pulmonale Eosinophilie aufgehoben werden. Diese Ergebnisse weisen somit auf eine regulatorische Rolle der $CD8^+$-T-Zellen in der Pathogenese der RSV-Infektion hin (SRIKIATKHACHORN und BRACIALE 1997). HUSSELL und OPENSHAW konnten 1998 nach der Immunisierung von Mäusen mit rVV-G eine Lungen-Eosinophilie mit einer geringen Anzahl von NK-Zellen (Natural Killer) und IFN-γ-Werte in Verbindung bringen. Dies bestätigt den Einfluss dieses Proteins auf die Art der T-Zell-Immunantwort (HUSSELL und OPENSHAW 1998).

In der Maus werden jedoch sehr hohe Virusmengen benötigt, um diese Tiere durch künstliche Verabreichung in den Respirationstrakt infizieren zu können und das Virus ist schon nach wenigen Tagen nicht mehr nachweisbar. Außerdem tendieren vor allem die häufig benutzten BALB/c-Mäuse zu einer T_H2-gerichteten Immunantwort und Untersuchungen, welche in diesem Mausstamm gemacht wurden, konnten in anderen Stämmen nicht reproduziert werden (HUSSELL et al. 1998). Trotzdem kann dieses Modell sehr hilfreich sein die spezifischen Mechanismen der RSV-Immunpathogenese zu untersuchen.

2.1.7.2.2 Baumwollratten

Das Modell in Baumwollratten (*Sigmodon hispidus*) wurde erstmals von DREIZIN et al. 1971 beschrieben (DREIZIN et al. 1971). Die Baumwollratte stellte sich 100fach empfänglicher für HRSV-Infektionen als die Maus dar und schien dadurch ein gutes Modell zur Untersuchung der RSV-Immunpathogenese zu sein (PRINCE et al. 1979; PRINCE et al. 2001). In der Tat führte die Immunisierung mit FI-HRSV und folgende HRSV-Infektion zu einer Alveolitis und interstitiellen Pneumonie (CHANG et al. 2001). Außerdem konnten einige Impfstoffkandidaten den Schutz vor einer HRSV-Infektion im Baumwollrattenmodell zeigen (HOMA et al. 1993; POWER et al. 1997; PRINCE et al. 2000).

Ein großer Nachteil des Baumwollrattenmodells ist jedoch die geringe Verfügbarkeit von Reagenzien und die Schwierigkeit der Quantifizierung von Immunglobulinen, Komplement und anderen Plasmaproteinen, sowie Zelloberflächenantigenen und Zytokinen. Ein weiterer Nachteil ist das Fehlen von transgenen oder Knockout-Baumwollratten-Stämmen (BYRD und PRINCE 1997).

2.1.7.2.3 Primaten

Untersuchungen wurden in Makaken, wie den Indischen Hutaffen (*Macaca radiata*) (BABU et al. 1998; PONNURAJ et al. 2003), Javaneraffen (*Macaca fascicularis*) (BABU et al. 1998; DE SWART et al. 2002; PONNURAJ et al. 2003), Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) (MCARTHUR-VAUGHAN und GERSHWIN 2002) oder auch in Schimpansen (*Pan troglodytes*) (COLLINS et al. 1990) durchgeführt.

Jüngste Experimente in Javaneraffen konnten zwischen der FI-HRSV-induzierten Hypersensitivität nach HRSV-Infektion und der Induktion von IL-13 produzierenden T_H2-Zellen eine Verbindung herstellen (DE SWART et al. 2002).

Fast alle Aspekte der RSV-bedingten Erkrankung beim Menschen vereint jedoch nur die RSV-Infektion von Schimpansen, der dem Menschen genetisch am nächsten verwandt ist. Jedoch haben praktische und biologische Erwägungen den Einsatz des Schimpansen als Modell in der RSV-Impfstoff Forschung stark eingeschränkt (COLLINS et al. 1990). Die Tiere sind sehr selten und nur in den USA über Primatenzuchtprogramme erhältlich. Die laufenden Kosten für die Unterbringung und Verpflegung sind ebenfalls sehr hoch (BYRD und PRINCE 1997). Aus diesen Gründen gibt es auch nur wenige Veröffentlichungen zur RSV-Infektion im Schimpansen (BELSHE et al. 1977; COLLINS et al. 1990).

2.1.7.2.4 Rind/Kalb

Ein interessantes Modell stellt die BRSV-Infektion im Kalb dar, da das RSV des Rindes antigenetisch sehr nah mit dem RSV des Menschen verwandt ist und in Kälbern eine Krankheit hervorruft, welche dieselben epidemiologischen, klinischen und pathologischen Charakteristika zeigt, wie die HRSV-Infektion in Kindern (VAN DER POEL et al. 1994; MORRISON et al. 1999). Diese einzigartige Ähnlichkeit im Krankheitsprofil machten das

Kälbermodell zu einem attraktiven Tiermodell und verschiedene Untersuchungen konnten bereits zeigen, dass BRSV im Rind, ebenso wie HRSV im Menschen, immunpathogenetische Wirkung hat (ANTONIS et al. 2003; KALINA et al. 2004).

GERSHWIN et al. konnten schon 1998 eine Impfstoff-assoziierte RSV-Immunpathogenese in Kälbern reproduzieren (GERSHWIN et al. 1998). Hierzu wurde ein Formalin-inaktivierter und Alum-präzipitierter BRSV-Impfstoff nach KIM et al. verwendet und mit BRSV infiziert (KIM et al. 1969). Die FI-BRSV-infizierten Kälber zeigten einen schweren klinischen Verlauf der Erkrankung, welche mit histologischen Läsionen, ähnlich deren der Kinder in den 60iger Jahren waren. Die Immunisierung induzierte keine neutralisierenden Antikörper, aber es konnten IgG-Antikörper durch ELISA nachgewiesen werden. GERSHWIN et al. (1998) benutzten hierzu jedoch Kälber, die in ihrer natürlichen Umgebung geboren und aufgewachsen waren und nur ab dem Beginn des Experiments in Isolierstallungen eingestallt wurden. Somit sind die Ergebnisse von GERSHWIN et al. (1998) auf Grund des möglichen gleichzeitigen Auftretens natürlicher BRSV-Infektionen etwas kritischer zu betrachten (GERSHWIN et al. 1998).

WEST et al. konnten 1999 mit ihren FI-BRSV-Impfexperimenten in Kälbern nur ein signifikant früheres Einsetzen der Symptome im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen (WEST et al. 1999).

2003 konnten ANTONIS et al. mit dem klassischen Formalin-inaktivierten und Alum-präzipitierten BRSV-Impfstoff in Kälbern die klinisch schwer verlaufende Erkrankung in FI-HRSV-immunisierten und HRSV-infizierten Kindern nachahmen. Hierbei entwickelten die Kälber eine T_H2-assoziierte entzündliche Immunantwort, die mit einer erhöhten Anzahl an Eosinophilen in der bronchoalveolären Flüssigkeit und der Lunge assoziiert war. Außerdem konnten in diesen Kälbern erhöhte IgE-Antikörper, die bei allergischen Reaktionen in hoher Anzahl vorhanden sind, im Serum nachgewiesen werden (ANTONIS et al. 2003).

Einer der weiteren großen Vorteile des Kälbermodells ist, dass hier im Gegensatz zum Nager, neben den Lungenvirustitern und der histopathologischen Untersuchung, mehrfache bronchoalveoläre Lavagen durchgeführt und auch die Lungenfunktion untersucht werden kann. Somit erlaubt das BRSV-Tiermodell im Kalb, die Untersuchung der RSV-Immunpathogenese, durch die Nutzung einer natürlichen Infektion in seinem natürlichen Wirt (BRANDENBURG et al. 2001).

2.2 Virale Vektoren: Eine neue Generation von Virusimpfstoffen

Nicht-pathogene Viren können dazu benutzt werden selektiv virale Fremdproteine zu produzieren. Diese Viren können anschließend dazu benutzt werden eine Immunantwort gegen das pathogene Virus zu induzieren (virale Vektoren). Diese Technik, Viren als Vektoren zur Immunisierung zu benutzen, eröffnete neue Möglichkeiten auf dem Gebiet der Impfstoffentwicklung (MOSS et al. 1996; MOSS 1996).

Mittlerweile wurden verschiedenste Viren zur Vektorimpfstoffentwicklung untersucht. Unter den Kandidaten zur Vektorimpfstoffentwicklung finden sich verschiedene RNA-Viren, wie das Influenzavirus (SHINYA et al. 2004), die Picornaviren (z.B. Poliovirus) (GIRARD et al. 1993; MANDL et al. 1998; MANDL et al. 2001), die Venezuelanischen Equinen Enzephalitis-Viren (DAVIS et al. 1996; GUPTA et al. 2005) und das Semliki-Forest-Virus (ATKINS et al. 1996; FORSELL et al. 2005), aber auch DNA-Viren, wie Adenoviren (MASSIE et al. 1986; HAJ-AHMAD und GRAHAM 1986; BAEZ-ASTUA et al. 2005), Herpesviren (SPAETE und FRENKEL 1982; BROCKMAN und KNIPE 2002; LAUTERBACH et al. 2004), Vesikuläres Stomatitis-Virus (ROBERTS et al. 1999; JONES et al. 2005), Baculoviren (PREHAUD et al. 1989; FACCIABENE et al. 2004) und auch verschiedene Pockenviren, wie das Vacciniavirus, Geflügel- oder Kanarienpockenviren.

Schon 1982 stellten PANICALI und PAOLETTI und kurze Zeit später auch MACKETT et al. Pocken- bzw. Vacciniaviren als Vektoren zur Expression von Fremdgenen vor (MACKETT et al. 1982; PANICALI und PAOLETTI 1982; MACKETT et al. 1992; PANICALI und PAOLETTI 1992). Diese Entdeckung eröffnete die Möglichkeit, Pocken- bzw. Vacciniaviren auch als Impfstoff gegen verschiedenste Krankheiten zu benutzen.

2.3 Die Pockenviren

2.3.1 Die Familie Poxviridae

Die Familie der ***Poxviridae*** umfasst zwei Unterfamilien von Viren mit doppelsträngiger DNA, deren Replikation im Zytoplasma erfolgt: die Unterfamilie ***Entomopoxvirinae***, welche Insekten infizieren, und die Unterfamilie ***Chordopoxvirinae***, welche Vertebraten infizieren.

Tabelle 2 Übersicht über wichtige Vertreter der Pockenvirus-Familie, deren Ursprung, Verbreitung und Wirte. Für den Menschen wichtige Orthopocken-Spezies sind fett, die als Expressionsvektoren verwendeten Pockenviren sind fett und kursiv hervorgehoben.

Genus	**Spezies**	**Reservoir/ Wirt**	**Ursprung und Verbreitung**	**Andere Wirte**
Orthopockenviren	**Variolavirus**	Menschen	weltweit, ausgerottet	-
	Vacciniavirus	unbekannt	weltweit	Menschen, Kaninchen, Kühe, Wasserbüffel
	Kuhpockenvirus	Nager	Europa, Asien, Westafrika	Katzen, Kühe, Zootiere, Menschen
	Affenpockenvirus	Eichhörn-chen	West-, Zentralafrika	Affen, Menschen
	Ektromeliavirus	Nager	Europa, Amerika	-
Parapoxvirus	***Orfvirus***	Schafe	Weltweit	andere Wiederkäuer, Menschen
	Bovines Papuläres Stomatitis Virus	Rinder	Weltweit	Menschen
Capripoxvirus	Schafpockenvirus	Schafe	Asien, Afrika	-
	Ziegenpockenvirus	Ziegen	Asien, Afrika	-
	Lumpy-Skin-Disease Virus	Rinder	Afrika	-
Suipoxvirus	***Schweinepocken***	Schweine	Weltweit	-
Leporipoxvirus	Myxomavirus	Kaninchen	Amerika, Europa, Australien	
	Fibromavirus	Kaninchen	Amerika, Europa	andere Leporiden
Avipoxvirus	***Hühnerpocken***	Hühner, Vögel	weltweit	-
	Kanarienpocken	Vögel	weltweit	-

2.3.2 Molekularbiologie der Pockenviren

Pockenviren haben mit ihrem großen komplexen Genom einen einzigartigen Replikationszyklus. Weil das Genom von Pockenviren bis zu ca. 300.000 Basenpaare DNA umfassen kann, replizieren diese ausschließlich im Zytoplasma der infizierten Zelle. Das Innere der Viruspartikel enthält verschiedene viruskodierte Enzyme. Diese Enzyme sind in Untereinheiten aus DNA-abhängiger RNA-Polymerase, Transkriptionsfaktor, Capping- und Methylierungsenzym und einer Poly(A)-Polymerase verpackt und verleihen den Viren die Fähigkeit direkt nach dem Eintritt in die Zelle mit der Bildung von mRNA zu beginnen.

Nach dem Eintritt in die Zelle werden zunächst nur frühe Gene transkribiert. Sie kodieren für Proteine zur Stimulation des Wachstums von Nachbarzellen, zur Evasion von Wirtsabwehr-Mechanismen (wie z.B. Zytokinen, Interferonen oder Apoptose), zur viralen DNA-Replikation, sowie für Faktoren zur Transkription der intermediären viralen Gene. Die Vorläufer der viralen DNA dienen als Vorlage für die Expression intermediärer und später Gene. Für diese zeitlich unterschiedliche Expression der verschiedenen Genklassen (frühe, intermediäre und späte Genexpression) gibt es spezielle Promotoren die spezifische Elemente enthalten, welche von den jeweiligen viralen Transkriptionsfaktoren erkannt werden. Dieser kaskadenähnliche Mechanismus stellt die Basis für die Regulation der Genexpression der Pockenviren dar.

Nach der Bildung der späten viralen Proteine setzen sich infektiöse Viruspartikel zusammen. Man unterscheidet bei Pocken vier verschiedene Partikelformen:
die IMV (intracellular mature virions), die IEV (intracellular enveloped virions), die EEV (extracellular enveloped virions) und die CEV (cell-associated enveloped virions). Die IEV-Partikel werden mit einer zusätzlichen Membran, aus dem Golgi-Apparat umgeben. Sie wandern an Aktinfilamenten des Zytoskeletts der Zelle zur Zelloberfläche und knospen durch die Plasmamembran (= EEV). Manche der Virionen werden nicht in die Umgebung freigesetzt, sondern verbleiben an der Zelloberfläche (= CEV).

Die Grundlage zur Herstellung rekombinanter Pockenviren stellt die homologe Rekombination dar. Die relative Häufigkeit solcher Rekombinationen von ca. 0,1%, welche auch unter natürlichen Bedingungen stattfindet, trug entscheidend zur Entwicklung von Pockenviren als Träger für Fremdgene *in vitro* und *in vivo* bei. Zur Pockenvirus-spezifischen Expression der Fremdgene wurden entweder Vaccinia- oder Vaccinia-verwandte Promotoren verwendet.

2.3.3 Vorteil der Pockenviren als Vektorimpfstoff

Pockenviren eigenen sich durch viele ihrer Eigenschaften vorzüglich zur Expression von Fremdgenen und führten somit zu ihrem häufigen Gebrauch als virale Vektoren. Sie replizieren im Zytoplasma, integrieren nicht wie andere Viren in das Wirtszellgenom und

benutzen ihr eigenes Transkriptionssystem. Die einfache Herstellung und Isolierung rekombinanter Pockenviren, die Möglichkeit große DNA-Mengen in das Virusgenom einzuschleusen, sowie die Expression hoher Mengen an Fremdgenen und das breite Wirtsspektrum dieser Virusfamilie machen sie zu einem der erfolgsversprechendsten Kandidaten zur Vektorimpfstoffentwicklung.
Pockenimpfstoffe sind einfach herzustellen, relativ stabil, leicht zu applizieren und induzieren eine lang anhaltende zelluläre und humorale Immunität.

2.4 Das Vacciniavirus

2.4.1 Abstammung des Vacciniavirus

Der Name Vacciniavirus stammt von „vacca“ (lat. Kuh). Dieser Begriff wurde erstmals 1803 von Richard Dunning verwendet um die Methode Edward Jenners zu beschreiben, welche die Erlangung der Immunität gegen eine Krankheit durch die Inokulation einer attenuierten bzw. abgeschwächten Form des krankmachenden Virus ermöglicht. Jenner erkannte 1796 Kuhpockenläsionen auf der Hand der Sennerin, Sarah Nelmes und entschied sich die Übertragung von Läsionsmaterial zum Schutz gegen die Variolainfektion zu testen (JENNER 1801; RIEDEL 2005). 1881 bezeichnete Louis Pasteur zu Ehren Jenners alle Immunisierungsmethoden als Vakzination. Jenners Aufzeichnungen lassen erkennen, dass er nicht nur Kuhpocken als Material für die Impfung benutzte, sondern verschiedenstes Pockenläsions-Material verimpft wurde. Passagen in verschiedenen Tieren und Menschen führten zu einer heute eigenen Viruspezies, dem Vacciniavirus. Selektion von Vacciniaviren, die weniger Fieber, Schmerzen und Komplikationen nach einer Impfung hervorriefen, wurden zu den Vacciniavirus-Stämmen, die wir heute noch benutzen (HENDERSON 1997; BAXBY 1999b). Die Kuhpocken werden heute nach eingehenden vergleichenden Untersuchungen der Virusgenome als Vorläufer aller heutigen Orthopockenviren angesehen. Trotzdem sind der genaue Ursprung und die Herkunft des Vacciniavirus auch heute noch unbekannt (BAXBY 1999a).

2.4.2 Vacciniavirus als Vektorsystem

Die einzigartigen biologischen Charakteristika von Vacciniaviren führten zu ihrer erfolgreichen Entwicklung als Expressionsvektoren. Zu diesen zählen die nicht infektiöse virale DNA, die Verpackung viraler Enzyme für die Transkription im Viruspartikel selbst, die Vacciniavirus-eignenen Transkriptionsregulatoren und die im Zytoplasma stattfindende Transkription und Replikation (MOSS 1974; DALES und POGO 1981). Fremd-DNA konnte relativ einfach in das Vacciniagenom durch homologe Rekombination inseriert werden. Hierzu wurden intakte Vacciniaviren und präzipitierte DNA oder ein Plasmid, welches virale Sequenzen enthielt, einfach zusammengefügt. (NAKANO et al. 1982; WEIR et al. 1982). Erstmals beschrieben 1982 PANICALI und PAOLETTI, wie auch MACKETT et al.

Vacciniaviren zum Einbringen fremder Gene (MACKETT et al. 1982; PANICALI und PAOLETTI 1982; MACKETT et al. 1992; PANICALI und PAOLETTI 1992). MACKETT et al. (1982) benutzten die kodierende Sequenz der Thymidinkinase im Vacciniavirus-Genom um Fremd-DNA zu inserieren (siehe hierzu Abbildung 5).

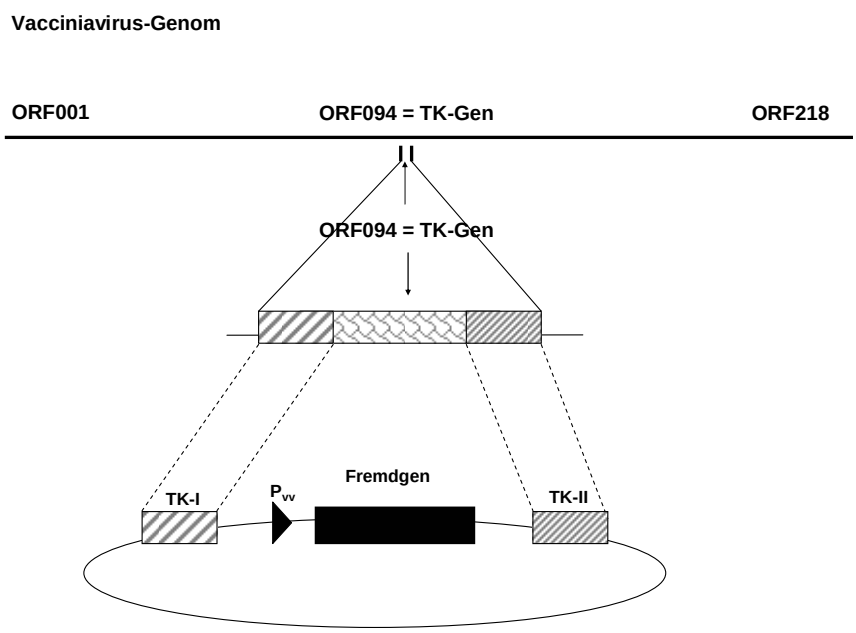


Abbildung 5: Schema der Insertion von Fremdgenen in den TK-Lokus des Vacciniagenoms (MACKETT et al. 1982). Schematische Darstellung des Vacciniagenoms und des Plasmides, welches zur Insertion des ersten Fremdgens in die kodierende Sequenz der Thymidinkinase dienten. Das Plasmid enthält Sequenzen der Thymidinkinase (TK-I und TK-2), einen Vacciniavirus-spezifischen Promotor und das Fremdgen. Durch homologe Rekombination der TK-Gensequenzen im Plasmid mit derer im Vacciniagenom wird das Fremdgen inseriert. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass bei der Insertion die kodierende Sequenz der Thymidinkinase (TK) zerstört wird und damit die Selektion durch den Zusatz von Bromodeoxyuridin auf einer TK-negativen Zelllinie ermöglicht wird.

Diese beiden oben genannten Publikationen setzten die Entwicklung von Vaccinia- und anderen Pockenviren als Expressionsvektoren in Gang.

Zur Herstellung konventioneller Vacciniaviren wurden auch die Wirtsgen-Selektionen entwickelt. Hierzu wurde schon 1989 das Vacciniavirus-Wirtsgen K1L von PERKUS et al. genutzt. Mit einer Deletionsmutante, welche nur noch auf Hühnerembryofibroblasten oder zwei Affenzelllinien Foci bildete, konnte sie durch die Vacciniavirus K1L-kodierende Sequenz eine erfolgreich Selektion rekombinanter Viren auf einer humanen Zelllinie durchführen (PERKUS et al. 1989; SMITH et al. 1993).

Eine andere Methode rekombinante Vacciniaviren durch Wirtsgen-Selektion herzustellen, basiert auf der Konstruktion einer Vacciniavirus-Mutante, welcher das essentielle Vacciniavirus-Gen D4R fehlt. Diese Mutante kann nur auf einer Zelllinie wachsen, welche das D4R-Gen exprimiert. Eine stringente Selektion rekombinanter Viren wird durch die stabile Reinsertion des D4R-Gens erreicht (HOLZER et al. 1998).

2.5 Das Modifizierte Vacciniavirus Ankara (MVA)

2.5.1 Abstammung des Modifizierten Vacciniavirus Ankara (MVA)

Das modifizierte Vacciniavirus Ankara stammt vom Vacciniavirus Ankara ab, einem Virusstamm, der in der türkischen Impfanstalt in Ankara zur Herstellung von Pockenimpfstoff verwendet wurde. Als Grundstoff für diese Pockenimpfstoffproduktion wurde Material aus Hautläsionen von Eseln verwendet, die durch Skarifizierung in Esel-Kalb-Esel Passagen gewonnen wurden.

1953 wurde das Vacciniavirus Ankara in das Institut von Albert Herrlich für infektiöse Krankheiten und tropische Medizin in München gebracht und als Chorioallantois Vacciniavirus Ankara (CVA) eingeführt. Dieses Virus wurde von HERRLICH und MAYR (1954) durch fraktionierte Ultrazentrifugation aufgereinigt, zweimal im Rind passagiert und in den Jahren 1954/55 als Pockenimpfstoff in Deutschland verwendet (HERRLICH und MAYR 1954).

1958 startete MAYR et al. einen Attenuierungsversuch mit seriellen Passagen des zellfreien CVA auf primären Hühnerembryofibroblasten (HEF) (MAYR et al. 1974). 1963 wurde die 371. Passage morphologisch, serologisch und biologisch mit dem Vorfahren CVA verglichen (MAYR und MUNZ 1964). Typische Charakteristika des CVA waren verschwunden und die auffälligste Veränderung war der Verlust oder die starke Verminderung der Virulenz im Kaninchen, in Babymäusen und in bestimmten Zelllinien. Auch in Hühnerembryos (CAM) hatte das neue Virus den typischen Phänotyp des Vacciniavirus verloren. Anstelle von großen lytischen Plaques mit starker zentraler Nekrose, generierte das neue Virus kleine kompakte Proliferationsherde ohne Nekrose, obwohl die Entwicklung einer generalisierten Infektion bestehen blieb. Es konnte weiterhin in Neutralisationsassays durch Anti-Vaccinia-Immunseren neutralisiert werden und hatte eine reduzierte Hämagglutinationsaktivität mit Hühnererythrozyten.

Nach der 516. Passage wurde das attenuierte CVA, auf Grund der Stabilität seines veränderten Phänotyps und der Möglichkeit der Unterscheidung von anderen Vacciniavirus-Stämmen, als MVA (modifiziertes Vacciniavirus Ankara) bezeichnet (MAYR et al. 1975). MVA war nicht mehr in der Lage sich produktiv auf humanen Zelllinien zu vermehren und seine Avirulenz wurde nach Inokulation in verschiedene Tierarten bestätigt. Infolgedessen wurde MVA von der Bayerischen Landesimpfanstalt in München als Testimpfstoff für sicherere Pockenschutzimpfungen ausgewählt. Von 1968 an wurde MVA in über 100.000 Menschen als Impfvirus verwendet, ohne dass es, wie bei anderen Vacciniaviren, zu Impfkomplikationen kam (STICKL und HOCHSTEIN-MINTZEL 1971; STICKL 1974; STICKL et al. 1974). 1980, mit dem Ende des Pockenimpfprogramms, wurde auch die MVA-Impfung beim Menschen eingestellt.

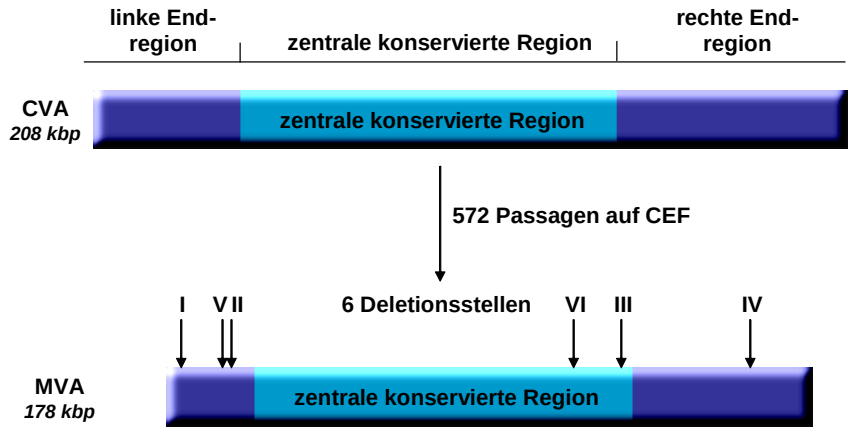


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Entwicklung von MVA aus CVA. Das Genom des Chorioallantois-Vacciniavirus Ankara (CVA) ist 208 kbp groß und besteht, wie für Orthopockenviren typisch, aus einer zentralen hochkonservierten Genomregion, sowie den in ihrer Sequenz variableren Genomenden. Die Serienpassage des CVA führte zur Entwicklung des MVA, dessen Genom nach 572. Passagen auf HEF rund 30 kbp eingebüßt hat. Dabei verteilt sich ein Grossteil des Verlustes an genetischer Information auf wenige Deletionsbereiche (Deletionsstellen I bis VI).

Die molekulargenetische Analyse des Genoms von MVA (basierend auf dem MVA-Isolat F6) zeigte einen Verlust von ca. 15% des Genoms im Vergleich zum Ursprungsstamm CVA. Dieser Verlust der genetischen Information betrifft vor allem die Genomenden und umfasst über 30.000 Basenpaare der DNA (Abbildung 6). Diese Mutationen und Deletionen umfassen einige regulatorische Virusgene, welche zumindest teilweise, für das extrem eingeschränkte Wirtszellspektrum verantwortlich sind (MEYER et al. 1991). Diese Beobachtung wurde durch die Sequenzierung des kompletten Genoms von MVA (ANTOINE et al. 1998) bestätigt.

2.5.2 MVA als Vektor für Fremdgene

Einige Jahre nach der Verwendung von MVA als Pockenimpfstoff erweckte die Möglichkeit, Vacciniaviren genetisch zu verändern und als rekombinante Vektorviren zu benutzten, erneut das Interesse an MVA. Das replikationsdefiziente modifizierte Vacciniavirus Ankara (MVA) bietet die Möglichkeit der Expression rekombinanter Gene. Sie können für verschiedene *in vitro*-Untersuchungen, wie die Funktion von Proteinen, als auch für *in vivo*-Experimente, wie der Induktion von antigenspezifischen zellulären und humoralen Immunantworten, dienen.

Die sechs großen Deletion im MVA-Genom (MEYER et al. 1991) können zur Insertion rekombinanter Gene verwendet werden. Die Deletion II, III und IV wurden und werden zur Insertion von Fremdgenen in das MVA-Genom benutzt (SUTTER und MOSS 1992; SUTTER et al. 1995; DREXLER et al. 1999; STAIB und SUTTER 2003; STAIB et al. 2003). Dazu werden verschiedene Vektorplasmide verwendet, die angrenzende DNA-Sequenzen der entsprechenden Deletionsstelle enthalten und dazu dienen, die Fremdgene über

homologe Rekombination gezielt an dieser Stelle in das MVA-Genom zu inserieren (Abbildung 7).

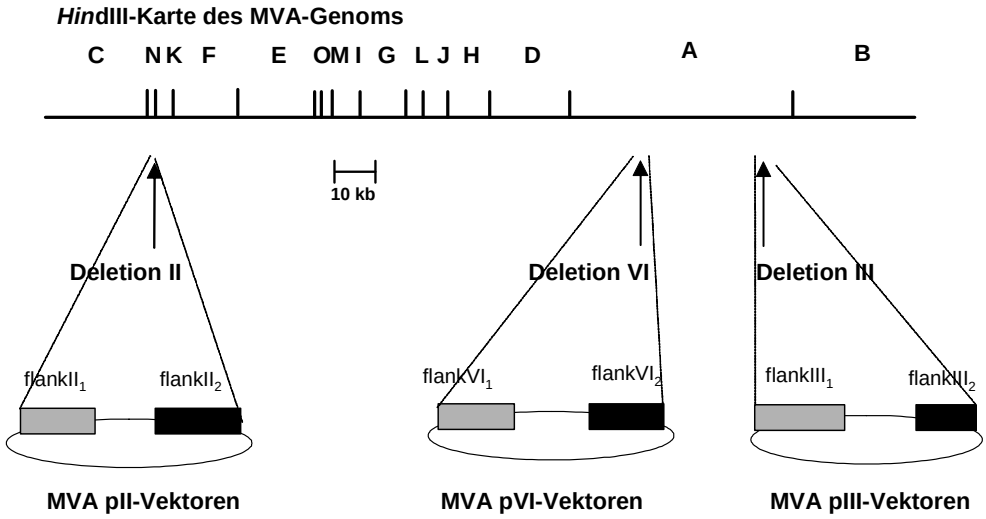


Abbildung 7: MVA zur Insertion von Fremdgenen. Oben gezeigt ist eine schematische Karte des MVA-Genoms für das Schnittmuster der Restriktionsendonuklease HindIII. Die Pfeile markieren die Lokalisation der jeweiligen Deletion, die der Insertion von Fremdgenen dienen. Unten sind schematisch Deletions-spezifische Vektorplasmide gezeigt. Wobei flank1 und flank2, DNA-Sequenzen darstellen, die dem entsprechenden Deletionsbereich im MVA-Genom entnommen wurden und dazu dienen Fremdgene durch homologe Rekombination in das MVA-Genom zu inserieren.

Im Laufe der letzten Jahre wurden eine Reihe verschiedenster Technologien zur Isolierung rekombinanter MVA entwickelt. Einige dieser Methoden beruhen auf der Koproduktion eines Reporterenzyms, wie der β-Galaktosidase und der β-Glukuronidase von *E. coli*, die die Isolierung durch Sichtung von Plaqueisolaten auf MVA-infizierten Zellen durch Anfärbung erlaubt (SUTTER und MOSS 1992; CARROLL und MOSS 1997; SCHNEIDER et al. 1998; DREXLER et al. 1999). Andere Methoden nutzen eine dominante Selektion rekombinanter MVA durch die Koexpression des *E. coli*-gpt-Gens. Dieses Bakteriengen kodiert die Xanthin-Guanin-Phophoribosyl-Transferase und führt zu einer Resistenz gegen die antimikrobiell wirkende Mykophenolsäure (SUTTER und MOSS 1992; SCHEIFLINGER et al. 1998). Diese Methoden erfordern jedoch zusätzliche Inkubationszeiten der infizierten Zellen unter Zusatz von Farbstoffen oder Antibiotika und die Verwendung von Agaroseüberschichtung.

Eine neue Methode zur Herstellung von rekombinanten Viren wurde von STAIB et al. (2000) entwickelt. Bei der Charakterisierung der Replikationsdefizienz des MVA konnte gezeigt werden, dass die Reinsertion der im Bereich der Deletionsstelle II verlorenen kodierenden Genomsequenzen, die auch die K1L-Gensequenz mit einschloss, das Wachstum von MVA auf RK13-Zellen ermöglichte (MEYER et al. 1991). Die nichtpermissive MVA-Infektion von RK13-Zellen resultiert in einer frühen Hemmung der viralen Replikation, die durch eine verminderte intermediäre und späte RNA-Synthese charakterisiert ist. Die stabile Koexpression des K1L-Gens durch ein eukaryotisches Expressionsplasmid in

RK13-Zellen konnten diese Blockade im verkürzten Virusreplikationszyklus aufheben (SUTTER et al. 1994a). Entsprechend kann das Wiedereinsetzen eines funktionstüchtigen K1L-Gens in das MVA-Genom als effiziente Selektionsmethode benutzt werden (STAIB et al. 2000). Die hierfür konstruierten MVA-Vektorplasmide enthalten das K1L-Gen unter der Transkriptionskontrolle seines authentischen Promotors und flankiert von repetitiven DNA-Sequenzen. Das K1L-Gen erlaubte die Selektion K1L-exprimierender, rekombinanter MVA auf RK13-Zellen. Die Plaques zeigten sich, nach ungefähr 24 Stunden, als typische Zellaggregate auf dem RK13-Zellrasen. Die anschließende Passagierung auf BHK-21- oder HEF-Zellen, auf der die K1L-Genexpression nicht erforderlich ist, führte zur effizienten Deletion des K1L-Gens aus dem Genom rekombinanter MVA. Diese Methode hat den Vorteil einer einfachen transient-positiv, dominanten Selektion auf Standardzelllinie, bei der kein Zusatz von Farbstoffen oder selektiven Stoffen erforderlich ist. Bei multiplen Gen-Insertionen oder –Mutationen erlaubt es die schnelle und effektive Deletion des transienten K1L-Markers und die Mehrfachverwendung der K1L-basierten Selektionsmethode (siehe Abbildung 8).

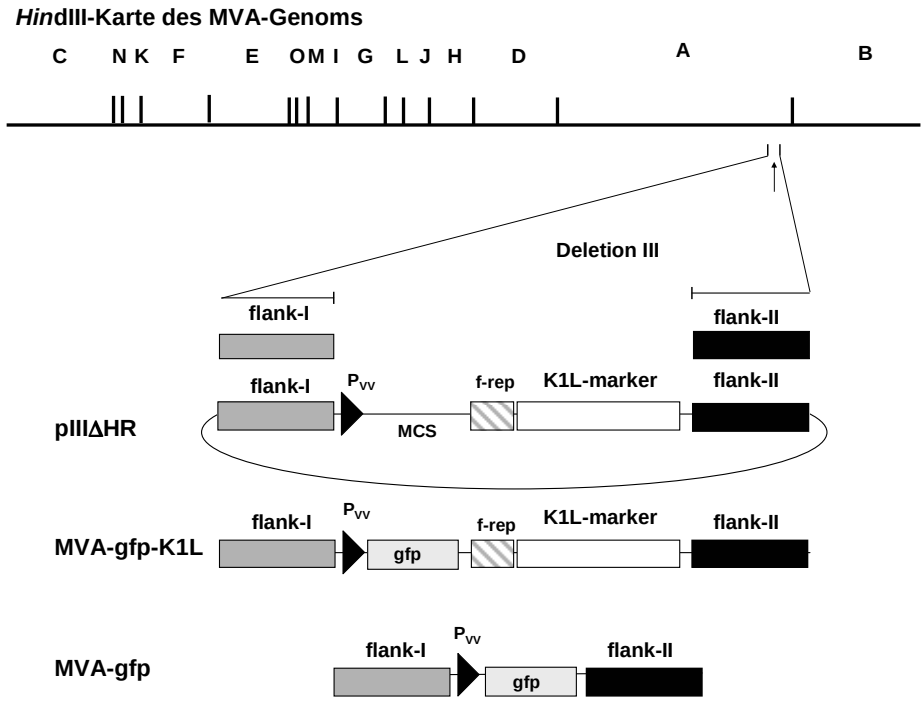


Abbildung 8: (entnommen aus (STAIB et al. 2003)) Generierung von rekombinanten MVA am Beispiel der Insertion des gfp-Gens in die Deletion III - Plasmidkonstruktion und Insertion von rekombinanten Plasmiden. Gezeigt sind die schematische Karte des MVA-Genoms (HindIII-Restriktionsendonuklease-Karte) und darunter ein MVA-Vektorplasmid pIIIdhrPvv. flank-I und flank-II stellen MVA-DNA-Sequenzen dar, die erforderlich sind, um Fremdgene in die Deletion im MVA-Genom zu inserieren. flank-rep ist ein repetitives 283 bp großes DNA-Fragment des rechten Endes des flank-I dar, welches die Deletion der K1L-Expressions-Kassette durch interne homologe Rekombination erlaubt. MVA-gfp-K1L stellt das Zwischenprodukt dar, welches nach homologer Rekombination und Selektion auf RK13-Zellen entsteht. MVA-gfp stellt das Endprodukt der Generierung eines rekombinanten MVA dar, wobei das K1L-Markergen durch interne homologe Rekombination auf HEF- oder BHK-Zellen, deletiert ist.

Eine weitere Verbesserung dieser Methode erfolgte ebenfalls durch STAIB et al. (2003). Hierzu wurde ein neues MVA-Isolat konstruiert, welches die im MVA-Isolat F6 vorhandene K1L-Restsequenz nicht mehr enthält (MVAIInew) und zusätzlich wurde ein neues Vektorplasmid pIII∆hr hergestellt, das das K1L-Markergen enthielt, welches von zwei kurzen heterologen DNA-Gensequenzen umgeben ist. Mit diesen Veränderungen konnten unerwünschte Rekombinationsereignisse mit dem K1L-Markergen und dessen Restsequenz, sowie der repetitiven Gensequenz im Plasmid und der entsprechenden Sequenz im MVA-Genom vermieden werden (STAIB et al. 2003).

2.5.3 Sicherheit und Immunogenität von MVA

Einer der größten Vorteile von MVA ist, dass es, trotz seiner Replikationsdefizienz in humanen und in den meisten Säugetier-Zellen, rekombinante Gene während des gesamten Vacciniavirus-Lebenszyklus exprimiert. MVA zeichnet sich außerdem durch seine hohe biologische Sicherheit aus. Mit dem Virus kann im Labor sowie in der Klinik/Präklinik unter der Sicherheitsstufe 1 gearbeitet werden. Rekombinante MVA wurden bereits erfolgreich als Testimpfstoff gegen eine Reihe von infektiösen Krankheiten und Tumorerkrankungen in Tiermodellen getestet (SUTTER und MOSS 1992; MURPHY et al. 1994; SUTTER et al. 1994b; HIRSCH et al. 1996; SCHNEIDER et al. 1998; BELYAKOV et al. 1998; DREXLER et al. 1999; AMARA et al. 2002). Zur Zeit werden mehrere Impfstoffkandidaten in ersten klinischen Studien geprüft (HILL et al. 2000; CORONA GUTIERREZ et al. 2002; HANKE et al. 2003; MCCONKEY et al. 2003; COSMA et al. 2003).

Die ausgeprägte Replikationsdefizienz von MVA wurde durch Wachstumsuntersuchungen auf verschieden Zelllinien eingehend erforscht (MEYER et al. 1991; SUTTER und MOSS 1992; CARROLL und MOSS 1997; DREXLER et al. 1998; BLANCHARD et al. 1998). Diese Untersuchungen zeigten, dass die Defizienz auf die Blockierung der Bildung neuer infektiöser Virionen auf Grund der fehlerhaften proteolytischen Spaltung von viralen Core-Proteinen zurückzuführen ist. Ein weiterer Aspekt, der die Sicherheit von MVA als Impfstoff unterstreicht, ist das Fehlen spontaner revertanter Viren unter nicht permissiven Bedingungen. Die *in vitro*-Replikationsdefizienz zeigt sich ebenfalls in Beobachtungen in *in vivo*-Experimenten: z.B. durch die Unfähigkeit der Bildung von Pockenläsionen, nach Skarifizierung oder intradermaler Applikation von MVA (STICKL und HOCHSTEIN-MINTZEL 1971); die Avirulenz in Erwachsenen, Neugeborenen oder bestrahlten Mäusen (WERNER et al. 1980; MEYER et al. 1991); die Sicherheit in immunsupprimierten Makaken (STITTELAAR et al. 2001); die sehr schnelle Beseitigung von MVA in Mäusen nach intraperitonealer Applikation (RAMIREZ et al. 2000) und die gute Verträglichkeit selbst hoher Dosen an rekombinantem MVA-Impfstoff zur experimentellen therapeutischen Immunisierung von HIV-infizierten Individuen (COSMA et al. 2003; HARRER et al. 2005).

Die Impfung mit MVA ruft eine antigenspezifische humorale und zelluläre Immunantwort hervor, die vergleichbar mit den Immunantworten nach Impfung mit vermehrungsfähigen Vacciniaviren ist (WYATT et al. 2004; EARL et al. 2004). Es konnte auch gezeigt werden, dass nachteilige Effekte durch einen bereits vorhandenen Pockenimpfschutz durch die Verwendung von verschiedenen Impfrouten oder von kombinierten Immunisierungsprotokollen vermieden werden können (BELYAKOV et al. 1999; RAMIREZ et al. 2000). Durch die Experimente mit kombinierten Impfungen wurde deutlich, dass MVA sehr effektiv zur Amplifikation von Immunantworten nach der Erstimpfung mit heterologen Systemen, wie beispielsweise DNA-Impfstoffen (SCHNEIDER et al. 1998; MOORTHY et al. 2003; BERTLEY et al. 2004; AMARA et al. 2005) oder rekombinanten Semliki-Forest-Virus (NILSSON et al. 2001; HANKE et al. 2003) eingesetzt werden kann.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zellkulturmedien und Puffer

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, ohne L-Glutamin, Na-Pyruvat, L-Methionin, L-Cystein) (*Gibco BRL®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany*)

EMEM (Eagle Minimum Essential Medium mit L-Glutamine) (*BioWhittaker™ Cambrex, Verviers, Belgium*)

2 x MEM (Biochrom AG, Berlin, Germany)

RPMI 1640-Medium (Roswell Park Memorial Institute 1640 mit Ultraglutamine1) (*BioWhittaker™, Cambrex, Verviers, Belgium*).

FBS (engl. fetal bovine serum, Fötales Rinderserum, Mykoplasmen getestet) (*Biochrom AG, Berlin, Germany*), hitzeinaktiviert für 30 Min. bei 56℃

PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 2 mM KH_2PO_4, pH 7,0 – 7,4)

Pen-Strep (10.000 U Penicillin/ml, 10.000 µg Streptomycin/ml) (*BioWhittaker™, Cambrex, Verviers, Belgium*)

Antibiotikum-Antimykotikum (100x, 10.000 U/Penicillin-G Natrium, 10.000 µg/ml Streptomycinsulfat, 25 µg/ml Amphotericin B in 0,85% Saline) (*Gibco BRL®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany*)

NEA (engl. non essential aminoacids, nichtessentielle Aminosäuren, 100x) (*BioWhittaker™, Cambrex, Verviers, Belgium*)

Laktalbumin (Laktalbumin Hydrolysat) (Gibco BRL®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany)

BMS (Basal Medium Supplement) (Biochrom AG, Berlin, Germany)

Trypsin/EDTA (0,5%/0,2% in 10x PBS ohne $Ca2^+$ und $Mg2^+$) (*Biochrom AG, Berlin, Germany*), zum Gebrauch mit A. bidest. 1:10 verdünnen

Trypsin-EDTA (1x, in HBBS ohne Ca und Mg, mit EDTA) (*Gibco BRL®, Invitrogen* GmbH, Karlsruhe, Germany)

3.1.2 Zellkulturflaschen und –platten

96-Loch-Platten (Corning Incorporated Life Science, Acton, USA)

12-Loch-Platten (Corning Incorporated Life Science, Acton, USA)

6-Loch-Platten (Corning Incorporated Life Science, Acton, USA)

T85-Flaschen (TC Flask, 80 cm^2, angled neck, Filter cap, Nunc™ Brand Products, Apogent Technologies Company, Nalge Nunc International, New York, USA)

T185-Flaschen (Solo flask, 600 ml, angled neck, Filter cap, PS, Nunc™ Brand Products, Apogent Technologies Company, Nalge Nunc International, New York, USA)

T225-Flaschen (Corning Incorporated Life Science, Acton, USA)

Petrischalen Zellkulturschale (*100 x 20 mm oder 50 x 20 mm, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany*)

3.1.3 Zellen

Die Passagierung aller Zelllinien wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle Medien wurden mit 1% Antibiotikum-Antimykotikum oder 1% Penicillin-Streptomycin supplementiert.

3.1.3.1 Primäre Zelllinie

3.1.3.1.1 Hühnerembryofibroblasten (HEF; Chicken embryo fibroblasts, CEF)

Für die Vermehrung von MVA wurden primäre Hühnerembryofibroblasten verwendet. Sie sind das Zellkultursystem der Wahl.

Primäre HEF-Zellkulturen wurden nach dem von MAYR et al. (1974) beschriebenen Verfahren der fraktionierten Trypsinierung aus 10 – 11 Tage bebrüteten Hühnereiern hergestellt (30 – 40 Eier, aus dem Institut für Geflügelkrankheiten, Oberschleißheim, Tierärztliche Fakultät der Universität München) (MAYR et al. 1974). Nach dem Desinfizieren der Eischale mit 80%igem Ethanol wurden die Eier am stumpfen Pol eröffnet, Schalenhaut und Allantochorion durchstochen und der Embryo unter sterilen Bedingungen entnommen und sofort dekapitiert. In einer mit PBS gefüllten Petrischale *(Zellkulturschale, 100 x 20 mm, Greiner Bio-One GmbH)* wurden die Gliedmaßen sowie die inneren Organe entnommen. Die Embryonen wurden anschließend zur Entfernung der Erythrozyten zweimal mit PBS gewaschen, durch eine Einwegspritze ohne Kanüle (20 bis 50 ml) in einen mit 100 ml Trypsin gefüllten Erlenmeyerkolben (300 ml) gepresst und auf 250 ml mit PBS aufgefüllt. Das so zerkleinerte Körpergewebe wurde unter ständigem Rühren 20 bis 30 min auf einem Magnetrührer bei RT inkubiert. Die trypsinierte Gewebesuspension wurde nach 10-minütiger Sedimentation der gröberen Bestandteile durch sterile Gaze in einen Becher filtriert und auf 250 ml mit PBS aufgefüllt. Anschließend erfolgte nach Aufteilung des Ansatzes auf 50 ml Falkons eine Zentrifugation bei 1.500 rpm, 4℃ für 10 Minuten (*Megafuge 1,0R, Heraeus Holding GmbH*). Das resultierende Zellsediment wurde sodann zweimal mit PBS gewaschen und in Medium (EMEM mit 10% BSA und 5% Laktalbumin oder EMEM mit 10% FBS und 1% NEA) resuspendiert und auf Eis aufbewahrt. Mit dem, aus der Filtration durch die Gaze, erhaltenen Rückstand wurde der gesamte Vorgang wiederholt. Die resuspendierten Zellen wurden vereinigt und auf 2 l Medium aufgefüllt (je Ei zirka 50 bis 100 ml Medium). Je 50 ml dieser Zellsuspension wurden in eine T225-Zellkulturflasche ausgesät (ca. 5 x 10^5 Zellen/ml) und bei 37℃ und 5% CO_2-Atmosphäre kultiviert. Nach 36 bis 48 Stunden erreichten die Primärkulturen Konfluenz. Die Kultivierung erfolgte in EMEM mit 10% BMS und 5% Laktalbumin oder in EMEM mit 7% FBS. Die konfluenten HEF wurden nach ein- bis zweimaligem Waschen mit PBS, mit Trypsin abgelöst und im Verhältnis

1:2 oder 1:3 geteilt und in neue Zellkulturflaschen oder –platten ausgesät und weiterverwendet.

3.1.3.2 Permanente Zelllinie

3.1.3.2.1 Baby Hamster Kidney-Zellen (BHK-21, ATCC CCL-10)

Diese Zelllinie kann ebenfalls zur Vermehrung von MVA verwendet werden. Es handelt sich um eine permanente, adhärent wachsende Zelllinie aus Hamsternierenzellen (*Mesocricetus auratus*, Syrischer Goldhamster) mit fibroblastenähnlicher Morphologie. Die Zellen wurden in RPMI-Medium mit 5 - 10% FBS bei 37℃ in 5%iger CO_2-Atmosphäre kultiviert und bei 80 - 100%iger Konfluenz (alle zwei bis drei Tage) im Verhältnis 1:5 bis 1:10 geteilt.

3.1.3.2.2 Rabbit Kidney-Zellen (RK13, ATCC CCL-37)

Bei diesen Zellen handelt es sich um eine permanente Zelllinie, die aus Nieren von Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) isoliert wurde. Die Zellen wachsen adhärent und haben ein kugeliges Aussehen. RK13-Zellen wurden alle drei bis vier Tage im Verhältnis 1:5 bis 1:10 geteilt und bei 37℃ in 5% iger CO_2-Atmosphäre in RPMI-Medium mit 10% FBS kultiviert.

3.1.3.2.3 Vero-Zellen (ATCC-CCL-81)

Bei Vero-Zellen handelt es sich um eine permanente Zelllinie, die aus den Nieren einer erwachsenen grünen Meerkatze (*Cercophitecus aethiops*) isoliert wurde. Die Zellen besitzen adhärentes Wachstum und ein kugeliges Aussehen. Vero-Zellen wurden alle zwei bis drei Tage im Verhältnis 1:5 geteilt und bei 37℃ in 5%ig er CO_2-Atmosphäre in RPMI-Medium mit 10% FBS kultiviert.

3.1.3.2.4 HeLa-Zellen (ATCC CCL-2)

Bei HeLa-Zellen handelt es sich um eine permanente Zelllinie, die aus einem humanen Zervixkarzinom, der Patientin **He**nrietta **La**cks, isoliert wurden. Die Zellen besitzen adhärentes Wachstum und haben polygonales bis kugeliges Aussehen. HeLa-Zellen wurden alle zwei bis vier Tage im Verhältnis 1:5 bis 1:10 geteilt und bei 37℃ in 5%iger CO_2-Atmosphäre in RPMI-Medium mit 10% FBS kultiviert.

3.1.3.2.5 HEp-2-Zellen (ATCC CCL-23)

Bei HEp-2-Zellen handelt es sich um eine permanente Zelllinie, die ursprünglich aus einem humanen Epidermoidkarzinom des Larynx abstammen. Diese Herkunft wurde jedoch durch verschiedene Untersuchungen widerlegt und es konnte gezeigt werden, dass die Entstehung dieser Zelllinie auf eine HeLa-Zell-Kontamination zurückzuführen war. Diese Zelllinie besitzt adhärentes Wachstum und hat polygonales Aussehen. Die Zellen werden zwei- bis dreimal

die Woche im Verhältnis 1:4 bis 1:10 geteilt und bei 37℃ in 5%iger-CO_2-Atmosphäre in EMEM mit 10% FBS kultiviert.

3.1.3.2.6 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden nur Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase verwendet. Ein Zellmonolayer einer T185-Flasche wurde mit 3 ml Trypsin behandelt und mit 7 ml Medium aufgenommen und anschließend durch Zentrifugation bei 4℃ und 1500 rpm (*Megafuge 1,0R, Heraeus Holding GmbH*) pelletiert und in kaltem Einfriermedium (90% FBS und 10% DMSO) durch vorsichtiges Pipettieren aufgenommen und in 1 ml Aliquots steril in Kryoröhrchen (*1,8 ml, Nalge Nunc International*) gefüllt. Die Zellen wurden anschließend sofort in gekühlte Einfrierbecher gegeben und sofort auf -80℃ eingefroren. Am darauf folgenden Tag wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff transferiert und dort gelagert.

Um eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurde die eingefrorene Zellsuspension in einem 37℃ Wasserbad zunächst soweit erwärmt, dass sie durch Pipettieren in eine Zellkulturflasche T185, welche 30 ml vorgewärmtes Medium enthielt, überführt werden konnte. Nach ca. 6 - 8 Stunden musste das Medium zur vollständigen Entfernung von DMSO gewechselt werden.

3.1.3.2.7 Bestimmung der Zellzahl in 6-Loch-Platten

Die Zellzahlbestimmung wird hier am Beispiel einer 6-Loch-Platte dargestellt. Nachdem die Zellen in den verwendeten Platten subkonfluent gewachsen waren, d.h. zu einer nicht vollständig dichten Einschichtzellkultur (Monolayer), erfolgte das Entfernen des Mediums eines Lochs. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit 200 µl Trypsin bei RT inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen erfolgten die Zugabe von 800 µl des entsprechenden Vollmediums und die Resuspension der Zellen. Danach wurden die Zellen 1:4 verdünnt, d.h. 50 µl Zellsuspension mit 100 µl PBS und 50 µl einer Trypanblau-Lösung gemischt und ein Aliquot zur Zählung der Zellen in der Kammer nach Neubauer *(Paul Marienfeld GmbH & Co. KG)* entnommen. Hierzu wurden alle 4 äußeren großen 4 x 4 Quadrate gezählt und der Durchschnitt dieser 4 Werte gebildet. Die Zellzahl wurde dann folgendermaßen berechnet:

gezählte Zellen x Verdünnung x 10^4 = Anzahl der Zellen pro ml

3.1.4 Viren

3.1.4.1 Modifiziertes Vacciniavirus Ankara (MVA)

Verwendung fand hier der Vaccinia Stamm MVA, das Isolat F6 (= 582. HEF-Passage) (MEYER et al. 1991) oder das von MVA-F6 abgeleitete MVAIInew (STAIB et al. 2003).

3.1.4.2 Chorioallantois Vacciniavirus Ankara (CVA)

Das CVA, der Vorfahre von MVA, wurde in der 2. HEF-Passage verwendet (MAYR und MUNZ 1964; MEYER et al. 1991). In Wachstumsuntersuchungen wurde dieses Virus als replikationskompetentes Vacciniavirus eingesetzt.

3.1.4.3 MVA-HRSV-F und MVA-HRSV-G (WYATT et al. 1999)

Diese rekombinanten MVA, welche die Oberflächenproteine des RSV-Subtyps A2 des Menschen (HRSV) unter der Kontrolle des modifizierten Vacciniapromotors PmH5 exprimieren, wurden freundlicherweise von Prof. Dr. B. Moss, Bethesda, USA, zur Verfügung gestellt.

3.1.4.4 Respiratorisches Synzytialvirus

3.1.4.4.1 RSV-Subtyp A2

RSV-Subtyp A2 wurde freundlicherweise von A.F.G. Antonis (Animal Sciences Group, Wageningen University and Research Centre, Lelystad, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Die Anzucht erfolgte in T185-Flaschen in subkonfluent gewachsenen HEp-2-Zellen, welche zur Infektion mit 0,05 IE (infektiöse Einheiten) pro Zelle in 5 ml EMEM mit 5% FBS je Flasche für eine Stunde bei leichtem Schwenken und RT adsorbiert und anschließend auf 30 ml mit EMEM/5% FBS aufgefüllt wurden. Nach dem Entwickeln eines zytopathischen Effekts erfolgte die Ernte der Zellen durch Auftauen und Einfrieren der Flaschen. Das geerntete Material wurde anschließend im Eisbad in einem Becher-Ultraschallgerät *(BANDELIN electronic GmbH & Co. KG)* für 10 Minuten beschallt. Die Entfernung von Zelltrümmern erforderte eine Zentrifugation bei 1500 rpm für 15 Minuten. Der resultierende Überstand wurde in SW 28-Zentrifugenbecher *(Beckman Coulter GmbH – Biomedical Research)* überführt und bei 25.000 rpm und 4℃ zentrifugiert *(SW 28-Rotor, Beckman Coulter GmbH – Biomedical Research)*). Das resultierende Pellet konnte in TEN-Puffer aufgenommen werden.

TEN-Puffer (pH 7,8):

20 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

0,15 M NaCl

3.1.4.4.2 Formalin-inaktiviertes RSV (FI-RSV)

Die Herstellung des FI-RSV-Impfstoffes erfolgte nach der Methode von KIM et al. (1969). Die Amplifikation des RSV-Subtyps A2 wurde wie unter 3.1.4.4.1 beschrieben durchgeführt. Die von Zelltrümmern durch Zentrifugation befreiten Überstände wurden anschließend mit 37%igem Formalin versetzt (1:4000) und für 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Proben im SW 28-Becher *(Beckman Coulter GmbH – Biomedical Research)* überführt und für eine Stunde bei 50.000*x*g *(Optima™ LE-80K, Beckman Coulter GmbH – Biomedical Research)* bei 4°C zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde im Verhältnis 1:25 mit PBS verdünnt und nach einer 30-minütigen Präzipitation mit Aluminiumhydroxid (*4 mg/ml, Imject Alum, Pierce Biotechnology Inc*.), für 30 Minuten bei 1000*x*g zentrifugiert. Diese Viruspräpartionen konnten nach Verdünnung mit PBS im Verhältnis 1:4 bei 4°C aufbewahrt werden. Für die Immunisierungen wurde diese FI-RSV-Impfstoffpräpartion kurz vorher mit PBS auf den entsprechenden Titer verdünnt und verwendet.

3.1.5 Synthetische Oligonukleotide (Primer)

3.1.5.1 Oligonukleotide zur Detektion von DNA-Sequenzen der Deletionsbereiche im MVA-Genom

3.1.5.1.1 Deletion III

NIH-GS83: 5´- GAA TGC ACA TAC ATA AGT ACC GGC ATC TCT AGC AGT -3´

IIIf 1B: 5´- CAC CAG CGT CTA CAT GAC GAG CTT CCG AGT TCC -3´

3.1.5.1.2 Deletion VI

VI-5´: 5´- CCT GGA CAT TTA GTT TGA GTG TTC CTG AAT -3´

VI-3´: 5´- CTC AGC ATC TAG TTG ATA TTC CAA CCT CTT -3´

3.1.5.2 Oligonukleotide zur Detektion der K1L-Gensequenzen

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

K1Lint-2: 3´- GTC GAC GTC ATA TAG TCG AGC -3´

3.1.5.3 Oligonukleotide zur Detektion der DNA-Sequenz von BRSV-F und -G-Genen

3.1.5.3.1 BRSV-F-Gen

5´-BRSV-F: 5´- ATG GCG GCA ACA GCC ATG AG -3´

3´-BRSV-F: 5´-TCA TTT ACT AAA GGA AAG ATT GTT G -3´

3.1.5.3.2 BRSV-G-Gen

5´-BRSV-G: 5´- CGC ACC ACCTGA AGT TCA AGA C -3´

3´-BRSV-G: 5´- TGC TCA GGA TGC CTT GCT -3´

3.1.6 Plasmide

3.1.6.1 Plasmide zur Herstellung rekombinanter MVA

3.1.6.1.1 pIIIdhrP7.5 und pIII∆hrP7.5

Diese Plasmide fanden zur Insertion von Fremdgenen in die Deletion III des MVA-Genoms Verwendung (siehe Abbildung 9 und Abbildung 10). Sie enthalten eine Ampicillin-Expressions-Kassette zur Selektion rekombinanter Plasmide auf Ampicillin-Agar-Platten. Zusätzlich enthalten sie MVA-DNA-Sequenzen, „flank-I“ und „flank-II“, welche homolog zu den MVA-DNA-Sequenzen links und rechts der Deletion III sind. Zwischen den beiden MVA-Sequenzen im Plasmid befindet sich eine K1L-Expressions-Kassette, welche die Selektion von rekombinanten MVA auf RK13-Zellen ermöglicht. Zur Deletion der K1L-Expressions-Kassette durch interne homologe Rekombination enthält das Plasmid pIIIdhrP7.5 ein 283 bp großes DNA-Fragment, das eine homologe DNA von Sequenz des rechten Endes flank-I darstellt (sogenannte „flank-rep“). Hierfür enthält das Plasmid pIII∆hrP7.5Im anstelle des „flank-rep“, zwei homologe repetitive DNA-Sequenz-Abschnitte des Escherichia coli (*E. coli*) lacZ Gens auf beiden Seiten des K1L-Gens. Beide Plasmide enthalten den Vacciniavirus- Tandempromotor P7.5 hinter dem sich mehrere einzigartige Restriktionsschnittstellen („multiple cloning site“, MCS), zur Insertion von Fremdgenen befinden.

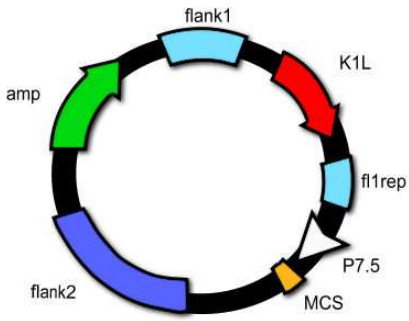


Abbildung 9: Schematische Darstellung von pIIIdhrP7.5.

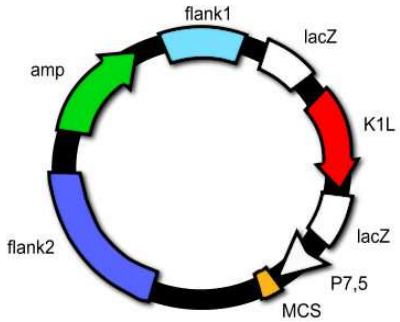


Abbildung 10: Schematische Darstellung von pIII∆hrP7.5.

3.1.6.1.2 pVIΔhrP7.5-sP

Dieses Plasmid ermöglichte die Insertion von Fremdgenen in die Deletion VI. Der Aufbau des Plasmides entspricht dem des Plasmides pIIIΔhrP7.5, mit dem Unterschied, dass die „flank-I"- und „flank-II"-Gensequenzen darstellen, die homolog zum MVA-Genom beidseits der Deletion VI sind. Außerdem enthält dieses Plasmid zwei Promotoren, den Vacciniavirus Tandempromotor P7.5 und den synthetischen Vacciniavirus Promotor sP; welche entgegengesetzt („back to back") orientiert sind.

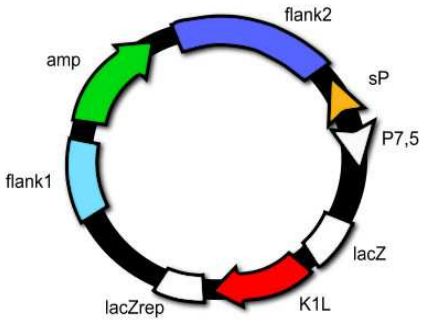


Abbildung 11: Schematische Darstellung von pVIΔhrP7.5/sP.

3.1.6.1.3 pLW9 (WYATT et al. 1996)

Dieses Plasmid wurde von Prof. Dr. Bernhard Moss, NIH, Bethesda, USA zur Verfügung gestellt. Es ist ebenfalls ein MVA-Vektorplasmid, welches die Insertion von Fremdgenen in die Deletion III ermöglicht. Es enthält das *E. coli* gpt-Gen unter der Kontrolle des Vacciniavirus Promotors P7.5 und den modifizierten Vacciniavirus Promotor PmH5 (WYATT et al. 1996).

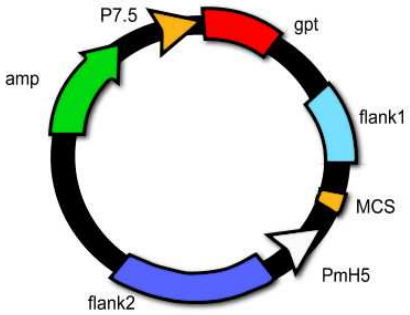


Abbildung 12: Schematische Darstellung von pLW9 (WYATT et al. 1996).

3.1.6.1.4 pEVNeo14

Das Plasmid pEVNeo14 wurde von Dr. J.P.M. Langedijk; Animal Sciences Group, Wageningen University and Research Centre, Lelystad, Niederlande, zur Verfügung gestellt. Es enthält das BRSV-Gen F des Stammes Odijk. Die F-Gensequenz kann mittels der Restriktionsenzyme BamHI und SalI isoliert werden.

3.1.6.1.5 pBRSVGsyn (KUHNLE et al. 1998)

Dieses Plasmid wurde von Dr. G. Keil, Friedrich-Löffler-Institut, Insel Riems, Deutschland, zur Verfügung gestellt. Es wurde zur Insertion des BRSV-G-Gens in das Genom des BHV-1 Stamms Schönböken generiert. Das pBRSVGsyn enthält die rekonstruierte BRSV-G-Gensequenz, welche kodonoptimiert wurde (BRSV-Gsyn). Dieses Gen ist von zwei EcoRI-Restriktionsenzym-Schnittstellen umgeben (KUHNLE et al. 1998).

3.1.6.2 Plasmide für den Fusionsassay

3.1.6.2.1 Luziferase-Kontrollplasmid (T7Luc)

Dieses Plasmid wurde von der Promega GmbH (*Mannheim, Germany*) bezogen. Es enthält das Gen für die Leuchtkäfer (*Photinus pyralis*)-Luziferase unter der Kontrolle des Bakteriophagen T7-RNA-Polymerase-Promotors (T7-Pol).

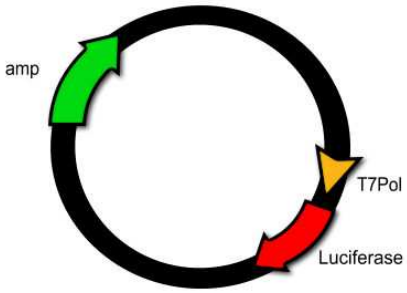


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Luziferase-Kontrollplasmides.

3.1.6.2.2 pUCIILZT7pol (SUTTER et al. 1995)

Dieses Plasmid enthält das Gen der Bakteriophagen T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des Vacciniavirus-Promotors P7.5. Zur Insertion dieses Gens in das MVA-Genom enthält das Plasmid flankierende Sequenzen der Deletion II und zusätzlich zur Selektion positiver, d.h. rekombinanter Klone, das *E. coli*-Gen lacZ unter der Kontrolle des späten Vacciniavirus-Promotors P11.

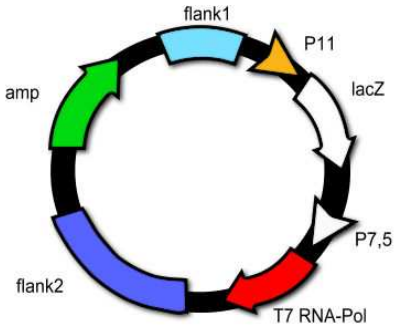


Abbildung 14: Schematische Darstellung von pUCIILZT7pol (SUTTER et al. 1995)

3.1.7 Antikörper

3.1.7.1 Anti-Vaccinia-Antikörper

Dieser Antikörper wurde von der Firma Quartett GmbH (*Berlin, Germany*) bezogen. Es handelt sich um ein polyklonales Antikörperserum aus dem Kaninchen.

3.1.7.2 Anti-F-Antikörper (mAb 3) (SCHRIJVER et al. 1997)

Dieser Antikörper wurde von Dr. J.P.M. Langedijk, Niederlande, zur Verfügung gestellt. Es ist ein monoklonaler Antikörper aus der Maus.

3.1.7.3 Anti-G-Antikörper (mAb 20) (LANGEDIJK et al. 1996a)

Dieser Antikörper wurde ebenfalls von Dr. J.P.M. Langedijk zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hier ebenfalls um einen monoklonalen Antikörper aus der Maus.

3.1.7.4 Meerrettich-Peroxidase (PO)-gekoppelte Antikörper

3.1.7.4.1 Anti-Kaninchen PO-gekoppelter Antikörper

Dieser Antikörper, des Subtyps IgG, stammt aus der Ziege und wurde von Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (*USA*) bezogen. Die Lieferung erfolgte in gefriergetrocknetem Zustand. Nach Aufnahme des Lyophilisats in 1,5 ml sterilem A. bidest. wies der Antikörper eine Konzentration von 0,8 mg/ml auf. Dieser Antikörper wurde in der Anti-Vaccinia-Immunfärbung bei der Titration von Viruspräparationen benutzt (siehe 3.2.3.1.8).

3.1.7.4.2 Anti-Maus PO-gekoppelter Antikörper

Dieser Antiköper, der Subtypen IgG und IgM, wurde ebenfalls von Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (*USA*) bezogen und stammt aus der Ziege. Das gefriergetrocknete Pulver wurde in 1,5 ml sterilem A. bidest. aufgenommen um eine Konzentration von 0,8 mg/ml zu erhalten. Er wurde ebenfalls in der Immunfärbung gegen die aus der Maus stammenden monoklonalen Antikörper gegen F und G (siehe 3.1.7.2 und 3.1.7.3), benutzt

Für den RSV-ELISA kam ebenfalls ein Anti-Maus PO-gekoppelter Antikörper, des Subtyps IgG zur Verwendung. Er stammte ebenfalls aus der Ziege, wurde jedoch von der Firma Sigma Aldrich Chemie GmbH (*Taufkirchen, Germany*) bezogen.

3.1.7.4.3 Anti-RSV PO-gekoppelter Antikörper

Dieser Antikörper wurde für die Immunfärbung von RSV-infizierten Hep2-Zellen verwendet. Der Peroxidase-konjugierte Anti-RSV-Antikörper stammt aus der Ziege und wurde von Biogenesis Ltd. (*England*) bezogen.

3.1.7.5 Biotinylierte Antikörper

3.1.7.5.1 Antikörper für den ELISPOT Assay

Biotinylierte Anti-Zytokin-Antikörper wurden für den ELISPOT verwendet. Anti-IFN-γ, -IL-4 und -IL-5 wurde von Becton Dickinson GmbH (*Heidelberg, Germany*), und anti-IL-13 von R&D Systems (*USA*) bezogen.

3.1.7.5.2 Antikörper für den RSV-ELISA

Anti-Maus-IgG1 oder -IgG2a der Firma Serotec GmbH (*Düsseldorf, Germany*) wurden für den RSV-ELISA benötigt.

3.1.7.6 Alkalische Phosphatase-(AP)gekoppelte Antikörper

3.1.7.6.1 Anti-Bovine- (AP)gekoppelter Antikörper

Dieser aus der Ziege stammende Antikörper, des Subtyps IgG, wurde von Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (*USA*) bezogen. Die Lieferung dieses Antikörpers erfolgte in gefriergetrocknetem Zustand und hatte nach Aufnahme in 1 ml sterilem A. bidest. eine Konzentration von 0,6 mg/ml. Dieser Antikörper wurde für die Bestimmung des Anti-Vaccinia-Antikörpertiters (Anti-Vaccinia-ELISA) in bovinen Seren benutzt (siehe 3.2.4.3.1),

3.1.8 Zytokine

Für den ELISPOT wurden IFN-γ, IL-4, IL-5 von Becton Dickinson GmbH (*Heidelberg, Germany*) und IL-13 von R&D Systems (*USA*) bezogen.

3.1.9 Sonstige Materialien, Geräte und Gebrauchsgegenstände

Sonstige Materialien, wie Bakterienstämme, Bakterienkulturmedien, Chemikalien, Kits, Puffer und Lösungen sowie Geräte und Gebrauchsgegenstände werden im Anhang aufgeführt.

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA

3.2.1.1.1 Analytische Plasmid-DNA-Isolierung (=Kleine DNA-Präparation)

Die Gewinnung und Aufreinigung von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab erfolgte mit Hilfe des Qiagen Plasmid Purification Maxi Kits *(Qiagen GmbH*).

4 ml Ampicillin-haltiges Luria Bertani-(LB-)Medium (Amp^+) Ampicillin *(100 µl/ml Ampicillin, Sigma Aldrich Chemie GmbH)* wurden mit einer Bakterienkolonie aus einer Agarplatte oder einer Glycerinkultur angeimpft und in einem Inkubationsschüttler *(Innova 4430, New Brunswick Scientific GmbH)* bei 37℃ über Nacht mit 200 rpm geschüttelt. Diese Übernachtkultur wurde in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß *(Eppendorf AG)* überführt und eine Minute bei 13.000 rpm pelletiert *(Biofuge fresco, Heraeus Instruments)*. Der Überstand konnte verworfen werden und die restlichen 2 ml der Übernachtkultur auf das Pellet gegeben und wiederum 1 Min. bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstands konnte das Pellet in 150 µl RNAse-haltigem Resuspensionspuffer *(P1)* aufgenommen werden. Die Zerstörung der Bakterien und die Freisetzung der Plasmid-DNA erfolgten nach Zugabe von 150 µl alkalischem Lysispuffer mit Natriumdodecylsulfat *(P2)*. Die Präzipitation der denaturierten Proteine, der chromosomalen Bakterien DNA und dem Natriumdodecylsulfat erfolgte durch Zusatz von 250 µl Neutralisationspuffers *(P3)*. Durch anschließende Zentrifugation für 10 Min. bei 13.000 rpm konnte das Präzipitat pelletiert und der klare Überstand in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß *(Eppendorf AG)* überführt und das Pellet verworfen werden. Aus dem Überstand erfolgte die Reinigung der Plasmid-DNA von restlichen Proteinen durch Phenolextraktion und anschließende Fällung durch Zugabe von 2 Vol 100% Ethanol und 0,1 Vol 3 M Natrium-Acetat pH 4,8. Die präzipitierte DNA wurde 20 – 30 Min. bei 13.000 rpm abzentrifugiert und mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die Aufnahme des DNA-Sediments erfolgte nach dem Trocknen in 30 - 50 µl sterilem A. bidest. Die so erhaltene Plasmid-DNA konnte direkt für Restriktionsanalysen eingesetzt werden.

3.2.1.1.2 Präparative Plasmid-DNA-Isolierung (=Große DNA-Präparation)

Die Gewinnung und Aufreinigung der unter 3.1.6 dargestellten Vektorplasmide und der daraus hergestellten rekombinanten Vektorplasmide, für die Herstellung von rekombinanten Vacciniaviren, erfolgte mit Hilfe des Qiagen Plasmid Purifikation Maxi Kit *(Qiagen GmbH)* nach Angaben des Herstellers.

3.2.1.1.3 Reinigung von Plasmid-DNA durch Phenolextraktion und Ethanolfällung

Zur Entfernung von Proteinen aus wässrigen DNA-Lösungen wurden diese mit 1 Volumen Phenollösung versetzt und der Ansatz auf einem Schüttler *(Vortex-Genie 2, Scientific Industries)* gemischt und zur Beschleunigung der Phasentrennung 3 - 5 Min. bei 13.000 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde mit der oberen wässrigen Phase mit 1 Vol Phenol/Chloroform-Gemisch (1:2) und danach durch Ausschütteln mit 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol Gemisch (24:1), um Phenolreste zu entfernen, wiederholt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 0,1 Vol einer 3 M Natriumazetat-Lösung pH 4,8 und 2 Vol 100%igem Ethanol und einer Inkubation von 10 - 15 Min. bei -80℃. Das durch Zentrifugation bei 4℃ und 13.000 rpm (*Biofuge fresco, Heraeus Instruments)* resultierende DNA-Sediment wurde anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 bis 50µl sterilem A. bidest. aufgenommen.

3.2.1.2 Herstellung und Aufarbeitung von DNA-Fragmenten

3.2.1.2.1 Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen

3.2.1.2.1.1 Photometrische Bestimmung

Die Konzentration von nukleinsäurehaltigen Lösungen konnte durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm im Photometer *(GeneQuant RNA/DNA Calculator Pharmacia Biotech)* ermittelt werden. Eine OD_{260} von 1 entspricht einer Nukleinsäure-Konzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA, 40 µg/ml für einzelsträngige DNA, sowie 20 µg/ml für Oligonukleotide. Die nukleinsäurehaltige Lösung wurde für die Messung im Photometer 1:100 mit sterilem A. bidest. verdünnt.

3.2.1.2.1.2 Konzentrationsbestimmung auf Agarosegelen

Für die Konzentrationsbestimmung kleiner DNA-Mengen konnten Aliquots der entsprechenden DNA-Lösungen zusammen mit einem DNA-Größenstandard *(1Kb ladder, NEB BioLabs)* elektrophoretisch aufgetrennt werden. Nach Anfärben der Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid konnten durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten definierter Banden die Konzentration der DNA-Lösungen relativ genau bestimmt werden, da sich bei niedrigen Konzentrationen diese Intensität proportional zur DNA-Menge verhält.

3.2.1.2.2 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA in wässrigen Lösungen erfolgte mit Restriktionsendonukleasen in den vom Hersteller jeweils angegebenen Pufferlösungen. Dabei wurde eine DNA-Menge von 1 - 5 µg verwendet. Die Reaktion verlief für 2 - 4 Stunden bei 37℃ oder auch bei 25℃, je nach verwendetem Restriktionsenzym, in einem Blockthermostat *(HLC Bio Tech – Haep Labor Consult)*. In der Regel wurden 1 - 5 U des Enzyms pro µg DNA eingesetzt. Die

Enzyme konnten anschließend durch Hitze, je nach verwendetem Enzym, denaturiert werden.

3.2.1.2.3 Aufreinigung und Gelextraktion

Restriktionsendonuklease-geschnittene Plasmide konnten durch Agarosegel-Elektrophorese aufgereinigt werden. Hierzu wurde ein 1%iges Agarosegel mit 0,01% Ethidiumbromid-Lösung (5 mg/ml) versetzt. Durch Versetzen des gesamten Restriktionsenzym-Ansatzes mit 1/10 Vol eines 10x Probenpuffer konnte dieser in die Tasche des Gels eingebracht werden. An das Gel wurde anschließend in einer DNA-Elektrophoresekammer für 45 - 60 Minuten eine Spannung von 100 Volt angelegt und die DNA-Fragmente dadurch aufgetrennt. Durch Bestrahlung mit ultraviolettem (UV-) Licht von 245 nm Wellenlänge auf einem UV-Transilluminator *(UVP, Gel Doc 2000, Bio-Rad Laboratories GmbH)* konnte die DNA sichtbar gemacht werden. Die Position des Vektors wurde mit einem mitgeführten DNA-Größenstandard *(1kb ladder, NEB BioLabs)* verglichen und das Gel mit einem Geldokumentationsgerät mit Kamera *(Gel Doc 2000, Bio-Rad Laboratories GmbH*) dokumentiert.

Banden der gewünschten Größe konnten mit einem Skalpell aus dem Agarosegel vollständig isoliert werden. Diese Gelstücke wurden in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß *(Eppendorf AG)* überführt und mit Hilfe des QiaquickGel Extraktion Kits *(Qiagen GmbH)* nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Aufnahme der DNA erfolgte in 30 µl sterilem A. bidest.

3.2.1.2.4 Veränderungen an 3' und 5' Enden von DNA-Fragmenten

3.2.1.2.4.1 Klenow-Enzym

Das Klenow-Enzym *(Roche Diagnostics GmbH*) wird zum Auffüllen und Entfernen von 3'-Überhängen verwendet. Dieses Enzym, das große Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment), besitzt nur die 5'→3'-Polymerase- und die 3→5'-Exonuclease-Aktivität, während die 5'→3'-Exonuclease-Aktivität des ursprünglichen Enzyms nicht mehr vorhanden ist. Das Klenow-Enzym katalysiert die Anlagerung und Abspaltung von Mononukleotiden aus Desoxynucleosid-5'-triphosphaten an das 3'-OH-Ende der Template-DNA. Das Auffüllen von 3'-Enden geschnittener DNA erfolgte in einem Reaktionsansatz mit einem DNA-Gehalt von 1 - 5 µg. Dieser wurde mit 5 oder 10 µl 10x PCR-Puffer *(Roche Diagnostics GmbH*), 0,1 mM dNTP *(Promega GmbH*) und 1 - 2 IU Klenow-Enzym und auf 50 oder 100 µl mit A. bidest. aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion konnte durch eine 10-minütige Inkubation bei 75℃ beendet werden . Das erhaltene DNA-Fragment konnte nach elektrophoretischer Auftrennung auf dem Agarosegel ausgeschnitten, mit dem QiaquickGel Extraktion Kits *(Qiagen GmbH)* aufgereinigt und in 50 µl sterilem A. bidest. aufgenommen werden.

3.2.1.2.4.2 T4-DNA-Polymerase

Die T4-DNA-Polymerase hat ebenfalls nur die 5'→3'-Polymerase- und die 3→5'-Exonuclease-Aktivität und im Gegensatz zur *E. coli* DNA-Polymerase I keine 5'→3'-Exonuclease-Aktivität. Ihre 3'→5'-Exonuklease-Aktivität ist jedoch 200fach höher, als die des Klenow-Enzyms. Sie wird, genau wie das Klenow-Enzym, benutzt um 3'-Überhänge zu entfernen und 5'-Überhänge aufzufüllen. Hierzu wurde eine DNA-Menge von 1 - 5 µg mit 30 µl 5 x T4-Polymerase Puffer (*Roche Diagnostics GmbH)*, 5 µl dNTP *(10 mM, Promega GmbH*), 1,5 µl DTT *(100 mM, Sigma Aldrich Chemie GmbH)* und 1,5 µl T4-DNA-Polymerase *(1U/µl, Roche Diagnostics GmbH)* versetzt und der Ansatz mit 12 µl sterilem A. bidest. auf das Volumen von 150 µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte in einem Kältethermostat *(Ecoline RE 112, Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG*) bei 11℃ für 5 Minuten. Anschließend wurde der Ansatz durch Phenolextraktion aufgereinigt (siehe 3.2.1.1.3) und in 30 µl sterilem A. bidest. aufgenommen.

3.2.1.2.4.3 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Die Entfernung von Phosphatgruppen am 5'-Ende von DNA-Molekülen erfolgte durch die Katalyse der Alkalischen Phosphatase aus Kälberdärmen (*calf intestinal Phosphatase, CAP, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG)*. Die DNA wurde hierzu in dem entsprechenden Puffer und je 1 U/µg DNA nach Angaben des Herstellers 1 Stunde bei 37℃ inkubiert. Die Inaktivierung der AP erfolgte durch Zusatz einer 0,25 M EDTA-Lösung und einer 10minütigen Inkubation bei 75℃. Die DNA wurde anschließend entweder durch Phenolextraktion oder durch Agarosegel-Elektrophorese aufgereinigt.

3.2.1.3 Gelelektrophoretische Methoden für DNA

3.2.1.3.1 Analyse von DNA in Agarosegelen

Entsprechend der jeweiligen Größe des zu analysierenden DNA-Fragmentes wurden 0,8 - 2%ige Agarosegele verwendet. Für ein 1%iges Agarosegel wurden 2,0 g Agarose in 200 ml TAE-Puffer aufgekocht, auf ca. 60℃ abgekühlt, mit 20 µl Ethidiumbromid-Lösung *(5 mg/ml, Sigma Aldrich Chemie GmbH)* versetzt und anschließend in eine horizontale Gelapparatur (DNA Sub Cell™, Bio-Rad Laboratories GmbH) gegossen. Die Elektrophorese erfolgte ebenfalls in TAE-Puffer und die elektrophoretische Auftrennung der in 5x DNA-Probenpuffer aufgenommenen DNA bei 80 - 120 V. Nach der Elektrophorese konnte die DNA durch Bestrahlung mit ultraviolettem (UV-) Licht von 245 nm Wellenlänge auf einem UV-Transilluminator *(UVP, Gel Doc 2000, Bio-Rad Laboratories GmbH)* sichtbar gemacht und analysiert werden. Die Position der DNA-Fragmente wurde mit einem mitgeführten DNA-Größenstandard *(1Kb ladder, NEB BioLabs)* verglichen und das Gel mit einem Geldokumentationssystem mit Kamera *(Gel Doc 200, Bio-Rad Laboratories GmbH)* dokumentiert.

TAE-Puffer (1x)

40 mM Tris

1 mM EDTA

TAE-Puffer (50x)

242 g Tris-Base

57,1 ml Eisessig

100 ml einer 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,0)

1:50 mit A. bidest. auf 1x TAE-Puffer verdünnen

3.2.1.4 Klonierung rekombinanter DNA-Moleküle

3.2.1.4.1 Präparation von Vektoren

Die Herstellung linearer Vektor-DNA erfolgte durch Spaltung von 2 - 5 µg Plasmid-DNA mit der jeweiligen Restriktionsendonuklease. Zur Überprüfung der Vollständigkeit der Reaktion und Reinigung der DNA wurde ein Aliquot des Ansatzes auf einem Agarosegel analysiert. Zur Verhinderung einer Religation der Vektor-DNA im folgenden Ligationsansatz wurden die 5'-Enden des Vektors dephosphoryliert (siehe 3.2.1.2.4.3).

3.2.1.4.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation eines linearisierten und dephosphorylierten Vektors mit dem gewünschten DNA-Fragment wurde durch die T4-DNA-Ligase *(1 U/µl, Roche Diagnostics GmbH)* katalysiert. Die Ligation erfolgte in einem molaren Verhältnis von Fragment zu Vektor von 2:1 (bei kohäsiven Enden) bis 5:1 (bei glatten Enden) und einer Temperatur von 14°C. Hierfür wurden für den Vektor immer 100 ng DNA eingesetzt und die entsprechende Menge DNA-Fragment mit 1 U T4-DNA-Ligase sowie 10x Ligase Puffer versetzt und der Ansatz mit sterilem A. bidest. auf 10 oder 20 µl aufgefüllt und über Nacht in einem Kältethermostat (*Ecoline RE 112, Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG*) bei 14°C inkubiert. Ein Kontrollansatz ohne das zu ligierende Fragment wurde parallel inkubiert. Der Ligationsansatz konnte ohne weitere Reinigung zur Transformation kompetenter Bakterien-Zellen des *E. coli* Stammes DH 10B eingesetzt werden.

3.2.1.4.3 Herstellung elektrokompetenter Bakterienzellen

Zur Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurden ausschließlich sterile Gegenstände und Lösungen verwendet.

10 ml einer frischen Übernachtkultur des *E. coli*-Stammes ELEKTROMAX™ DH10B™ Cells *(Gibco BRL®, Invitrogen GmbH)* wurden in 1 l LB-Medium aufgenommen und bei 37°C in einem Inkubationsschüttler *(Innova 4430, New Brunswick Scientific GmbH)* bis zu einer optischen Dichte (λ = 600) von 0,4 inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde in einer vorgekühlten Zentrifuge 15 Min. bei 4000*x*g pelletiert. Der Überstand wurde komplett entfernt

und das Bakterienpellet mit 1000 ml kaltem Wasser resuspendiert und wiederum pelletiert. Dieser Vorgang musste noch zweimal wiederholt werden, wobei zuerst 500 ml kaltes Wasser und dann 250 ml Wasser zum resuspendieren verwendet wurden. Nach dem letzen Pelletiervorgang erfolgte die Aufnahme des Pellets in 4 - 5 ml eiskaltem sterilem A. bidest. mit 15% Glycerol, das Aliquotieren à 50 µl in 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße *(Eppendorf AG)* und sofortiges Schockgefrieren auf Trockeneis. Die elektrokompetenten Zellen wurden bei –80℃ aufbewahrt.

3.2.1.5 Elektroporation von Bakterienzellen

Die Methode der Elektroporation von Bakterienzellen hat den Vorteil, dass, unabhängig von der Vektorgröße, eine sehr hohe Transformationsrate erreicht werden kann.

Für die Transformation wurde pro Ligationsansatz ein Aliquot (50 µl) elektrokompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 1 - 3 µl des Ligationsansatzes versetzt. Dieser Ansatz wurde in vorgekühlte Gene Pulser® Küvetten (*0,2 cm, Bio-Rad Laboratories GmbH)* gegeben und im Elektroporationsgerät Gene Pulser® (*Bio-Rad Laboratories GmbH)* bei 2,5 kV für 3 - 5 msec. inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufnahme des gesamten Ansatzes in 500 µl LB-Medium, die Überführung in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß *(Eppendorf AG)* und die Inkubation in einem Inkubationsschüttler *(Innova 4430, New Brunswick Scientific GmbH)* für 1 Std. bei 37℃. Danach wurden 100 µl dieses Ansatzes und, das nach 5minütiger Zentrifugation bei 2000 rpm *(Biofuge fresco, Heraeus Instruments)* gewonnene Sediment, welches in 100 µl frischem LB-Medium aufgenommen wurde, auf LB-Platten mit Ampicillin *(100 µl/ml Ampicillin, Sigma Aldrich Chemie GmbH)* ausplattiert. Bakterien, welche den Vektor aufgenommen haben sind aufgrund der Plasmid-kodierten Ampicillin-Resistenz in der Lage, auf Ampicillin-haltigen Nährböden zu wachsen. Nach 14 - 18 Std. Inkubation bei 37℃ konnten einzelne Bakterienkolonien mit Hilfe s teriler Pipettenspitzen von der Nährbodenplatte entnommen und für die analytische Plasmidisolierung verwendet werden.

3.2.1.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die „Polymerase Chain Reaction“ ist eine *in vitro*-Methode zur enzymatischen Synthese spezifischer DNA-Sequenzen. Zunächst wird eine doppelsträngige DNA (Matrizen-DNA) denaturiert. An die entstehenden komplementären DNA-Einzelstränge werden anschließend zwei Oligonukleotid („Primer“), die die zu amplifizierenden DNA-Region flankieren, hybridisiert. Mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase werden, ausgehend von den Oligonukleotiden, die jeweiligen komplementären DNA-Stränge synthetisiert. Eine repetitive Folge von DNA-Denaturierung, Oligonukleotid-Hybridisierung und DNA-Synthese führt zu einer exponentiellen Akkumulation der Ziel-DNA, deren Enden durch die 5’-Enden der Oligonukleotide definiert sind. Die PCR läuft in einem Volumen von 50 µl in einem 0,2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß *(Eppendorf AG)* ab. Zu einem 50 µl Ansatz wurden 50 - 100 ng

Matrizen-DNA (gelöst in sterilem A. bidest.), 45 µl PCR-Master-Mix (*ABgene*®) und 15 pmol jedes Oligonukleotides (gelöst in sterilem A. bidest.) gegeben. Die Denaturierung der Reaktion erfolgte für 5 Minuten bei 95°C und durchlief dann 25- bis 35-mal in einem Thermocycler *(GeneAmp 9600 PCR System, Perkin Elmer®)* folgende Schleife:

Denaturierung bei 95°C für 1 Minute

Hybridisierung der Oligonukleotide bei Tm, 1 Minute

Polymerasereaktion bei 72°C, 2 - 3 Minuten

Die optimale Hybridisierungstemperatur musste für jedes Oligonukleotid-Paar separat ermittelt werden.

Dabei gilt folgende Formel:

TM = 4 x (G + C) + 2 x (A + T)

Zum Abschluss der Reaktion erfolgten eine 5-minütige Inkubation des Ansatzes bei 72°C und die Kühlung auf 4°C. Die Analyse erfolgte mit einem Aliquot (10 -25 µl) oder dem gesamten Ansatz durch Agarosegel-Elektrophorese.

3.2.2 Proteinanalytische Methoden

3.2.2.1 Western-Blot

3.2.2.1.1 Proben für den Western-Blot

Für den Western-Blot wurden Zellen, entweder HEF oder BHK, in einer 6-Loch-Platte, mit je 10 IE (infektiöse Einheiten) pro Zelle des entsprechenden MVA infiziert und nach 24 - 48 h durch Zugabe von 120 µl Zelllysispuffer mit einem Zellschaber *(cell lifter, Corning Incorporated Life Science)* geerntet, in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß *(Eppendorf AG)* überführt und bei 2000 rpm für 5 Minuten pelletiert. Das Pellet wurde anschließend sofort bei -80°C eingefroren. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 Min. bei 95°C denaturiert.

Zelllysispuffer:

50 mM Tris-HCl (pH8,0)

150 mM NaCl

0,02% NaN_3

1% Triton X-100 oder NP-40

100 µg/ml PMSF

3.2.2.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mit SDS-Polyacrylamid-Gelen. Zur Herstellung dieser Gele wurden zwei Glasplatten mit den Massen 20 cm x 21 cm x 0,4 cm in eine Gießapparatur *(Bio-Rad Laboratories GmbH)* mit Abstandshaltern eingespannt.

Die Gele bestanden aus einem unteren Polyacrylamid-Trenngel unterschiedlicher Konzentration und einem oberen 6%igen Sammelgel. Die Lösung für ein 10%iges Trenngel setzte sich aus 19,8 ml A. bidest., 16,7 ml einer 30%igen Bisacrylamid-Mischung *(Protogel®, national diagnostic)*, 12,5 ml einer 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 und 0,5 ml einer 10%igen SDS-Lösung zusammen. Danach wurden 500 µl einer 10%igen Ammoniumpersulfat-Lösung und 20 µl TEMED *(Bio-Rad Laboratories GmbH)* zugesetzt. Das Trenngel wurde bis auf eine Höhe von zirka einem Zentimeter unterhalb des Taschenformers gegossen. Zur Ausbildung einer planen Oberfläche wurde die Gellösung mit 0,2 bis 0,5 ml Butanol oder A. bidest. überschichtet. Das 6%ige Sammelgel setzte sich aus 3,6 ml A. bidest., 3,4 ml einer 30%igen Bisacrylamid-Mischung *(Protogel®, national diagnostic)*, 2,5 ml einer 1,0 M Tris-HCl Lösung mit pH 6,8, 0,2 ml einer 10%igen SDS-Lösung, 0,2 ml einer 10%igen Ammoniumpersulfat-Lösung und 20 µl TEMED zusammen. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Butanol oder A. bidest. abgegossen, mit der Sammelgel-Lösung überschichtet und der Taschenformer *(Bio-Rad Laboratories GmbH)* eingesetzt. Das polymerisierte Gel wurde in eine Doppelelektrophoresekammer *(Bio-Rad Laboratories GmbH)* eingespannt und die Kammer mit 1 x WB-Laufpuffer aufgefüllt. 50 µl der vorbereiteten Proben (siehe 3.2.2.1.1) wurden mit speziellen Gelloader-Spitzen (*ART GEL, Molecular Bioproducts Inc.)* in die Geltaschen gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 -120 Volt für zirka 8 -10 Stunden.

10 x WB-Laufpuffer:

25 mM Tris-Base
192 mM Glycin
1% SDS

1 x WB-Laufpuffer:

1 Teil 10 x WB-Laufpuffer
9 Teile A. bidest.

3.2.2.1.3 Elektrotransfer von Proteinen

Nach der Gelelektrophorese (siehe 3.2.2.1.2, oben) der Proteinproben fand ein Transfer der Proteine aus dem SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrozellulosemembran *(Bio-Rad Laboratories GmbH*) nach der Semi-Dry-Transfer-Methode von KYHSE-ANDERSEN (KYHSE-ANDERSEN 1984) statt. Für den Transfer wurde eine Graphitblotapparatur *(Fastblot B33/B34 Whatman Biometra, Biometra GmbH i.L.) v*erwendet. Nach der

elektrophoretischen Trennung der Proteine wurde das Gel abgemessen und 10 Whatman-Filterpapiere *(3MM-Papier, Whatman Biometra, Biometra GmbH i.L.*) und eine Nitrozellulosemembran *(Bio-Rad Laboratories GmbH)* auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten. Die Whatman-Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran wurden in Transferpuffer getränkt. Der Aufbau der Blotapparatur erfolgte (von der Kathode zur Anode) nach folgendem Schema:

Anode

5 x Whatman-Filterpapier

Nitrozellulosemembran

SDS-Polyacrylamid-Gel

5 x Whatman-Filterpapier

Kathode

Der elektrophoretische Transfer erfolgte bei 15 V für 60 Min und wurde durch Anfärbung der Nitrozellulosemembran mit Ponceau S-Lösung überprüft. Das Ponceau S konnte durch Waschen der Nitrozellulosemembran mit PBS wieder entfernt werden.

5 x Salze für Transferpuffer:

25 mM Tris-Base

192 mM Glycin

1 x Transferpuffer:

20% 5 x Salze

20% Methanol

60% A. bidest.

Ponceau S-Lösung:

2,63 mM Ponceau S, Na-Salz

1% Essigsäure

3.2.2.1.4 Immunodetektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte eine Inkubation der Nitrozellulosemembran *(Bio-Rad Laboratories GmbH*) für ein bis zwei Stunden bei RT in PBS + 1% BSA. Nach zwei Waschschritten mit PBS (jeweils 10 Minuten bei RT) wurde der erste Antikörper, gegen das Protein welches detektiert werden sollte, in der entsprechenden Verdünnung in PBS + 1% BSA aufgenommen und in einer Schale auf die Nitrozellulosemembran gegeben. Der Ansatz wurde auf einer Schwenkapparatur *(WT 16, Whatman Biometra, Biometra GmbH i.L.)* für 2 bis 4 Stunden bei RT inkubiert. Danach erfolgten zwei Waschschritte für 5 bis 10 Minuten mit PBS und die Inkubation mit dem

zweiten Antikörper, ein PO-gekoppelter Anti-Spezies-Antikörper, für 45 bis 60 Minuten bei RT in der entsprechenden Verdünnung in PBS oder PBS + 2% FBS. Die Detektion der Proteine erfolgte nach dreimaligem Waschen der Nitrozellulosemembran mit PBS, mittels Chemolumineszenz *(Lumilight™, Roche Diagnostics GmbH*) nach Angaben des Herstellers. Hierfür wurde die mit Chemolumineszenz-Lösung bedeckte Membran in eine Plastikfolie gegeben und ein Röntgenfilm (*BioMax MR-1, Kodak GmbH*) für 5 bis 60 Sekunden aufgelegt. Die Entwicklung des Films erfolgte mit Hilfe eines Röntgenentwicklergerätes *(Curix 60, Type 9462/106, Agfa Deutschland Vertriebsgesellschaft mbH & Cie.KG).* Da der Proteinstandard *(„prestained protein marker", NEB BioLabs)* nicht mit Peroxidase markiert ist, werden dessen Proteine nicht auf dem Film dargestellt. Durch erneutes Auflegen des Films auf die Nitrozellulosemembran, auf welcher der Proteinstandard erkennbar ist, ist die Bestimmung der Größe der Proteine möglich.

3.2.2.2 Proteinkinetik

3.2.2.2.1 Proben für die Proteinkinetik

Für die Proteinkinetik erfolgte die Infektion von Zellen, entweder HEF oder BHK in einer 6-Loch-Platte, mit 10 IE pro Zelle des entsprechenden MVA und einer Inkubation für 1 Std. bei 4℃ im Kühlschrank *(Bauknecht Hausgeräte GmbH)*. Danach wurde das Inokulum entfernt und jedes Loch dreimal mit 2 ml Medium, welchem 2% FBS zugesetzt waren, gewaschen. Jedes Loch wurde dann wieder mit 2 ml Medium und 2% FBS gefüllt. Die Ernte der entsprechenden Zeitpunkte (0, 4, 8, 12, 24, 48 und 72 Stunden) erfolgte nach Zugabe von 120 µl Zelllysispuffer mit Hilfe eines Zellschabers *(cell lifter, Corning Incorporated Life Science)* und dem sofortigen Einfrieren bei -80℃. Diese Proben konnten anschließend auf ihren Proteingehalt in der Proteinbestimmung nach LOWRY et al. (1951) untersucht werden (LOWRY et al. 1951).

3.2.2.2.2 Proteinbestimmung nach LOWRY et al. *(1951)*

Die Proteinbestimmung erfolgte durch den *DC* Protein Assay *(Bio-Rad Laboratories GmbH)*. Die Reaktion ist der Proteinbestimmung nach Lowry sehr ähnlich mit folgenden Veränderungen: die Reaktion erreicht 90% der maximalen Farbentwicklung innerhalb von 15 Minuten und die Farbintensität verändert sich nach 1 Stunde um nicht mehr als 5% und nach 2 Stunden um nicht mehr als 10%. Der Assay basiert auf der Reaktion von Protein mit einer alkalischen Kupfer-Tartrat-Lösung und Folin-Reagenz. Wie im Lowry Assay, gibt es zwei Schritte die zur Farbentwicklung führen: die Reaktion zwischen Protein und Kupfer im alkalischem Milieu und die anschließende Reduktion von Folin-Reagenz durch die Kupfer-Protein-Komplexe. Die Farbentwicklung wird in erster Linie durch die Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan und zu einem geringeren Anteil auch durch Cystin, Cystein und Histidin hervorgerufen. Diese Proteine bewirken eine Reduktion des Folin-Reagenz durch den

Verlust von 1 bis 3 Sauerstoffatomen und produzieren so eine oder mehrere von verschiedenen möglichen Verbindungen, die eine charakteristische blaue Farbe mit einer maximalen Absorption bei 750 nm und einer minimalen Absorption bei 405 nm haben.
Der *DC* Protein Assay *(Bio-Rad Laboratories GmbH)* enthält das Reagenz A (alkalische Kupfer-Tartrat-Lösung), das Reagenz B (verdünntes Folin-Reagenz) und das Reagenz S. Zusätzlich enthält es einen bovinen Serumalbumin-Standard zur Erstellung einer Eichkurve.
Zunächst die Zugabe von 20 µl Reagenz S zu jedem Milliliter Reagenz A, diese Mischung (A + S) war für zirka eine Woche stabil.
Zur Erstellung der Eichkurve wurden verschiedene Verdünnungen des bovinen Serumalbumins, mit einem Gehalt von 1,4 bis 0,2 mg/ml, hergestellt.
Zur Durchführung der Proteinbestimmung wurden je 5 µl Probe oder Standardlösung in eine Mikrotiterplatte pipettiert und anschließend je 25 µl Reagenz A + S zugefügt. Danach erfolgte die Zugabe von 200 µl Reagenz B in jedes Loch und leichtes Schwenken der Platte zur Mischung der Reagenzien. Vorhandene Bläschen wurden mit einer Pipettenspitze entfernt. Nach 15 Minuten konnte die Absorption bei 750 nm gemessen werden. Der Proteingehalt der Proben konnte anhand der Eichkurve, die mit dem bovinen Serumalbumin erstellt wurde, bestimmt werden.

3.2.2.3 Nachweis von [^{35}S]-markierten Proteinen

3.2.2.3.1 [^{35}S]-Markierung von Proteinen

Der Nachweis [^{35}S]-markierter Proteine erforderte die Infektion von HEF- oder BHK-Zellen in 6-Loch-Platten mit 10 bis 30 IE pro Zelle des entsprechenden rekombinanten MVA oder MVAwt für 2 Stunden bei 37℃ und 5% CO_2. Danach erfolgte ein dreimaliger Waschschritt der Zellen mit DMEM ohne Methionin und Cystein und die Zugabe von je 1 ml dieses Mediums, supplementiert mit 1% L-Glutamin und 1% Na-Pyruvat, pro Vertiefung. Auf diese Weise wurde den Zellen Methionin und Cystein während 20 bis 30 Minuten bei 37℃ und 5% CO_2 entzogen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 µCi des Redivue™ [^{35}S]-Methionin-/Cystein-ProMix *(Amersham Bioscience Europe GmbH*) zum Medium. Nach 14 Stunden wurde das Medium von jeder Vertiefung abgenommen und die Zellen mit 200 µl RIPA-Lysispuffer für 5 bis 10 Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß *(Eppendorf AG)* überführt und sofort auf Eis gegeben bzw. bei -80℃ eingefroren.

RIPA-Lysispuffer:

10 mM Tris pH 7,4
150 mM NaCl
1% Natriumdeoxycholat
1% Triton X-100

3.2.2.3.2 SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese

Von den in RIPA-Lysispuffer geernteten Zellen wurden 25µl bis 50µl mit 5 x SDS-Probenpuffer versetzt, bei 95℃ für 5 Minuten aufgekocht und wie unter 3.2.2.1.1 beschrieben auf einem 12%igem SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

3.2.2.3.3 Fluorographie

Nach der Elektrophorese erfolgte die Fixation des Proteingels für 30 Minuten bei RT in Fixierungspuffer und anschließend eine 30minütige Inkubation in Quellpuffer bei RT. Nach dem Quellen konnte das Proteingel zwischen zwei speziellen Cellophanblättern *(Bio-Rad Laboratories GmbH*) in einem Trockenrahmen *(Gel Drying Frames 24 x 24 cm, Cat.No.AB-110761, Diversified Biotech)* über Nacht getrocknet werden. Das getrocknete Gel wurde dann auf eine Phosphorimagerplatte *(Storage Phosphor Screen GP, 20 x 25 cm, Kodak GmbH*) in einer Röntgenfilmkassette gelegt und nach 8 bis 24 Stunden konnte die Phosphorimagerplatte im Personal Molecular imager FX *(Bio-Rad Laboratories GmbH*) mit der Software Quantity One 4.1.1 *(Bio-Rad Laboratories GmbH)* eingelesen werden.

Fixierungspuffer:

50% Isopropanol
10% Eisessig
ad 500 ml A. bidest.

Quellpuffer:

20% Ethanol
10% Glycerin
ad 500 ml A. bidest.

3.2.2.4 Radioimmunopräzipitationsassay (RIPA)

3.2.2.4.1 Proben für den RIPA

Die Proben für den RIPA wurden wie unter 3.2.2.3.1, für [^{35}S] Markierung von Proteinen auf Seite 53 beschrieben, hergestellt. Die Ernte erfolgte in 150µl RIPA-Lysispuffer und die Lagerung in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß *(Eppendorf AG)* bei -80℃.

3.2.2.4.2 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurde 50%ige Protein-A-Sepharose™ CL-48 (*PAS™, Amersham Bioscience Europe GmbH)* in PBS benutzt. Diese wurde in zwei Aliquots (A und B) von 60 µl in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße *(Eppendorf AG)* aufgeteilt und mit 500 µl Phosphat-Puffer (PP) gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation des Aliquots A mit 10 µl mAb3 (Anti-F-Antikörper, siehe 3.1.7.2) und 150 µl Phosphat-Puffer und des Aliquots B nur in 150 µl Phosphat-Puffer in einem Taumel-Rotator *(neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs*

GmbH) für 2 Stunden bei 4℃. Danach erfolgten zwei Wasch schritte mit Phosphatpuffer und die Inkubation mit 100µl unmarkierten, uninfizierten HEF- oder BHK-Zelllysaten über Nacht bei 4℃ im Taumel-Rotator. Nach dreimaligem Waschen mit RIPA-Puffer wurden beide Aliquots in drei weitere Aliquots von 20 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäße *(Eppendorf AG)* aufgeteilt. Die unter 3.2.2.4.1 geernteten und markierten Zellen wurden ebenfalls aufgeteilt; 30 µl wurden als nicht immunpräzipierte Kontrolle entnommen, 120 µl wurden in 150 µl RIPA-Puffer aufgenommen und je 135 µl auf zwei Eppendorf-Reaktionsgefäße *(Eppendorf AG)* aufgeteilt. Jedes 135 µl Aliquot wurde mit 30 µl PAS-Aliquot A oder Aliquot B über Nacht bei 4℃ rotierend inkubiert. Die Proben wurden sech smal in 500 µl RIPA-Puffer gewaschen. Die gewaschenen PAS-Pellets wurden mit 20 µl 2fach SDS-Probenpuffer versetzt, die 30 µl reinen Zelllysate wurden mit 5fachem SDS-Probenpuffer aufgenommen und bei 95℃ für 5 Minuten aufgekocht.

Phosphatpuffer 0,1M pH 8,1:

A. 26,70 g $Na_2HPO_4.2H_20$ ad 1,5 l A. bidest. (pH 9,09)

B. 1,38 g $NaH_2PO_4.H_20$ ad 100 ml A. bidest. (pH 5,08)

Zirka 70 ml der Lösung B in die Lösung A geben, bis sich ein von pH 8,1 einstellt.

3.2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proben wurden wie unter 3.2.2.1.2 auf Seite 50 beschrieben auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und zirka 6 bis 10 Stunden bei 100 Volt elektrophoretisch aufgetrennt.

3.2.2.4.4 Fluorographie

Die Proteingele wurden wie unter 3.2.2.3.3 auf Seite 54 beschrieben fixiert, getrocknet und ausgewertet.

3.2.2.5 Fusionsassay

Der Fusionsassay wurde mit Hilfe des Luziferase-Assay-Systems *(Promega GmbH*) durchgeführt. Dieses System enthält das lyophilisierte Luziferase-Assay-Substrat, einen Luziferase-Assay-Puffer zum Auflösen des Substrats und 5fach Luziferase-Zellkultur-Lysis-Puffer.

Beim Luziferase-Assay wird die Bildung der Leuchtkäfer-Luziferase nachgewiesen. Hierbei wird Licht, durch die Umsetzung der chemischen Energie der Luziferin Oxidation zu Oxyluziferin, produziert. Die Leuchtkäfer-Luziferase ist ein monomeres 61kDa Protein, welches die Luziferin-Oxidation unter Verwendung von ATP und zweiwertigen Mg-Ionen katalysiert. In diesem Assay wurde als Reporter-Gen das Luziferase-Kontrollplasmid verwendet (siehe dazu 3.1.6.2.1 auf Seite 40), es enthielt das Luziferin-Gen unter der Kontrolle des Bakteriophagen T7-RNA-Polymerase-Promotors.

3.2.2.5.1 Proben für den Fusionsassay

Für diesen Nachweis erfolgte die Infektion von BHK- oder HeLa-Zellen für 90 Min. bei 37℃ mit 5 IE pro Zelle MVA-BRSV-F oder MVAwt pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte. Anschließend wurden die infizierten Zellen wie in der unter 3.2.3.1.2 (Seite 57) beschriebenen Methode mit FuGene6 mit dem pUCIILZT7pol (a) oder dem Luziferase-Kontrollplasmid (b) transfiziert (Gruppe A). Eine weitere 6-Loch-Platte wurde mit einem der Plasmide (a oder b) transfiziert (Gruppe B). Nach einer Inkubation von 4 Stunden wurden die Zellen der Gruppe B zweimal mit 10 bis 20 ml Erhaltungsmedium gewaschen, trypsiniert und das Pellet, je Vertiefung, in 1 ml Erhaltungsmedium aufgenommen. Die Zellen der Gruppe A wurden dreimal mit Erhaltungsmedium gewaschen. Die geernteten und trypsinierten Zellen der Gruppe B wurden dann auf die Zellen der Gruppe A gegeben und zwar immer so, dass das Zellen die mit dem Plasmid a und b transfiziert waren, zusammen kamen. Die Ernte des 0 Stunden Punktes erfolgte sofort und dann nach 14 und 24 Stunden.

3.2.2.5.2 Extraktherstellung zur Analyse der Luziferase-Enzymaktivität

Die Ernte der Zellen erfolgte nach Angaben des Herstellers mit Hilfe des Luziferase-Zelllysis-Puffers. Dieser Puffer wurde 5fach konzentriert geliefert und die zur Ernte benötigte Menge wurde 1:5 mit Wasser verdünnt und auf Raumtemperatur gebracht. Nach dem Entfernen des Mediums vom Zellrasen erfolgte ein Waschschritt mit PBS. Anschließend wurden 150µl Zelllysis-Puffer auf den Zellrasen gegeben und die Zellen durch leichtes hin und herschwenken gelöst. Bei HeLa-Zellen wurde die Ernte mit einem Zellschaber *(cell lifter, Corning Incorporated Life Science)* unterstützt. Die lysierten Zellen wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß *(Eppendorf AG)* überführt auf Eis aufbewahrt. Das Lysat wurde 10 bis 15 Sekunden auf einem Schüttler *(Vortex-Genie 2, Scientific Industries Inc.)* gemischt und dann für 2 Minuten, bei 4℃ und 12.000 rpm zentrifugiert. Nach dem Überführen der Überstände in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß *(Eppendorf AG)* erfolgte die Aufbewahrung bis zur Messung bei -80℃.

3.2.2.5.3 Messung der Luziferase-Aktivität

Die Luziferase-Aktivität der einzelnen Überstände wurde in eine 96-Loch-Platte gemessen. Von jeder Probe wurden 20 µl in die Vertiefungen der Platte gegeben und diese anschließend für die Messung in ein Microplate Luminometer mit Injection Unit *(Orion, Berthold Detection Systems)* gegeben. Die Messung erfolgte mit Hilfe der Software Simplicity 2.0 R1 *(Berthold Detection Systems)* mit einem Injektions-Volumen von 50µl Luziferase-Assay-Substrat, einer Verzögerungszeit von 2.05 Sekunden und einer Messzeit von 10 Sekunden.

3.2.3 Virologische Methoden

3.2.3.1 Herstellung rekombinanter Viren

Zur Herstellung rekombinanter Viren wurde der Vaccinia Stamm MVA, das Isolat F6 (582. HEF-Passage) oder das von MVA-F6 ageleitete MVAIInew verwendet (MEYER et al. 1991; STAIB et al. 2003).

3.2.3.1.1 Infektion von Zellkulturen

Die Infektion von Zellen erfolgte meist mit 0,1 - 10 oder auch 10 - 30 IE Virus pro Zelle. Hierzu wurden Zellen in 6-Loch-Platten ausgesät und nach Erhalt einer konfluenten Einschichtkultur, die Zellzahl pro 6-Loch-Vertiefung bestimmt (siehe 3.1.3.2.7). Anhand der Zellzahl konnte dann die Infektionsdosis des Virus nach entsprechender Verdünnung in Erhaltungsmedium präzise eingestellt werden. Virus-Suspensionen wurden in einem Volumen von 1 ml auf die Zellen einer Vertiefung verimpft und anschließend für 60 Min. bei 4℃ adsorbiert bzw. bei 37℃ inkubiert.

Trypanblau-Lösung:

0,5% Trypanblau in PBS (Bei RT stabil für einen Monat)

3.2.3.1.2 Transfektionen

Die Herstellung von rekombinantem MVA erfolgte durch DNA-Transfektion von mit Ausgangsvirus (MVAwt)-infizierten HEF- oder BHK-Zellen mit Insert-tragenden Transfervektorplasmiden. Rekombinante Viren entstanden dabei durch homologe Rekombination der DNA des Virusgenoms mit den MVA-DNA-Sequenzen der Plasmidvektoren.

3.2.3.1.2.1 Transiente Transfektion

Die Expression eines klonierten Fremdgens wurde in Vorversuchen auf BHK-Zellen überprüft (=Transiente Genexpression). Subkonfluente BHK in einer 6-Loch-Platte wurden mit 5 IU/Zelle MVAwt infiziert. Nach der Virusadsorption (1 Std., 37℃, 5% CO_2; siehe auch 3.2.3.1.1) wurde das Inokulum entfernt, die Zellen mit 1 ml frischem Erhaltungsmedium überschichtet und anschließend mit der Transfervektor-DNA transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit Hilfe des FuGene™ 6 Transfektions-Reagenz *(Roche Diagnostics GmbH)* nach Angaben des Herstellers. Dazu wurde während der Virusadsorption, der Transfektionsansatz vorbereitet. 6 µl FuGene™ 6 Reagenz wurden in 94 µl EMEM verdünnt, 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und tropfenweise in ein Reaktionsgefäß, welches 1 - 2 µg der entsprechenden Vektorplasmid-DNA-Maxi-Präparation (1µg/µl) enthielt, überführt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Min. bei Raumtemperatur wurde der Transfektionsansatz in den Zellkulturüberstand pipettiert und die Zellen bei 37℃ und 5% CO_2-Atmosphäre für 48 Std. inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit erfolgte die Ernte der Zellen aus der Vertiefung mit

Hilfe eines sterilen Plastikschabers und die Überführung in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß *(Eppendorf AG)*. Das geerntete Zellmaterial wurde pelletiert, in Lysispuffer aufgenommen und bei -80℃ gelagert. Die Anwesenheit von rekombinanten Proteinen konnte anschließend durch Western-Blot-Analyse wie unter 3.2.2.1 auf Seite 49 beschrieben, überprüft werden.

Zelllysispuffer:

50 mM Tris-HCl (pH8,0)

150 mM NaCl

0,02% NaN_3

1% Triton X-100 oder NP-40

100 µg/ml PMSF

3.2.3.1.2.2 Stabile Transfektion

Für die stabile Transfektion wurden subkonfluente HEF- oder BHK-6-Loch-Platten mit 0,05 IU/Zelle MVAwt infiziert. Nach der Virusadsorption von 90 Min. bei 37℃ und 5% CO_2-Atmosphäre erfolgte die Transfektion mit der Transfervektor-DNA durch das FuGene™ 6- Reagenz. Die Ernte erfolgte nach Inkubation von 48 Std. bei 37℃ und 5% CO_2-Atmosphäre. Der Transfektionsansatz wurde anschließend gefriergetaut und die Virus-Suspension als 0. Passage bei -80℃ gelagert.

3.2.3.1.3 Ernte Virus-infizierter Zellen

3.2.3.1.3.1 6-Loch-oder 12-Loch-Platten

Die Ernte von Virus-infizierten Zellen in den verschiedenen Loch-Platten erfolgte mit einem sterilen Zellschaber *(cell lifter, Corning Incorporated Life Science)*. Die infizierten Zellen in den einzelnen Vertiefungen wurden mit dem Schaber abgelöst und mit einer Pipette in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß *(Eppendorf AG)* überführt.

3.2.3.1.3.2 Zellkulturflaschen

Die Ernte von Virus-infizierten Zellen in Zellkulturflaschen verschiedener Größen (T85, T185 oder T225) erfolgte entweder mit speziellen langen Zellschabern *(disposable cell scraper, Greiner Bio-One GmbH)* oder bei der Ernte einer größeren Anzahl von Flaschen auch durch Gefriertauen der Kulturen in den Plastikflaschen.

3.2.3.1.4 Transiente Wirtsselektion rekombinanter Viren

Diese Selektionstechnik beruht auf dem Unvermögen von MVA auf RK13-Zellen zu wachsen. Die vorübergehende Insertion des vacciniaviralen Wirtszellgens K1L ermöglicht das Wachstum von rekombinanten MVA auf dieser Zelllinie, die somit einfach isoliert und kloniert werden können. Dabei bilden MVA-Viruspartikel, welche das K1L-Gen exprimieren, auf RK13-Zellen typische Zelltrauben-ähnliche Infektionsherde aus (Abbildung 28 auf Seite 80).

Nach der Durchführung der unter 3.2.3.1.2.2 (Seite 58) beschriebenen stabilen Transfektion, erfolgte das Gefriertauen des geernteten Transfektionsansatzes und anschließendem dreimaligem Beschallen für 1 Min. auf Eiswasser in einem Becher-Ultraschallgerät auf maximaler Stufe *(BANDELIN electronic GmbH & Co. KG)* (um zellassoziierte Viruspartikel oder Virusaggregate zu vereinzeln). Danach wurde der Transfektionsansatz auf subkonfluente RK13-Zellen, als 1. Passage, in verschiedenen Verdünnungen nach folgendem Schema ausgesät:

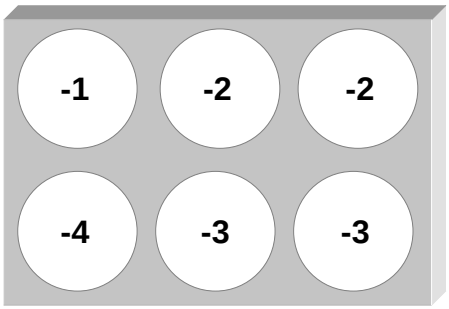


Abbildung 15: Verdünnungsschema für die Passagierung zur Herstellung von rekombinantem MVA

Die Überprüfung der Platte unter dem Mikroskop auf die Bildung von Zellagglomeraten (Plaques) erfolgte jeden Tag. Jedes einzelne Zellagglomerat stellte einen rekombinanten Virusklon dar. Die ersten Plaques konnten meistens schon nach zwei Tagen erkannt werden, diese wurden mit einem dünnen Folienstift an der Unterseite der Platte angezeichnet und weiter beobachtet. Am 3. bis 5. Tag nach der Infektion konnten einzelne Aggregate rekombinanter Viren durch Ansaugen mit einer sterilen Pasteurpipette oder einer 100 µl Pipette isoliert werden. Das Anzeichnen der Plaques an der Unterseite erleichterte die Selektion unter sterilen Bedingungen. Die Aufnahme der Plaqueisolate erfolgte in 500 µl Medium EMEM + 2% FBS in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß *(Eppendorf AG)*. In der Regel wurden 10 bis 30 solcher Plaques aus der 1. Passage ausgewählt. Diese klonalen Isolate wurden, wie beschrieben, dreimal gefriergetaut und mit Ultraschall behandelt. Zirka 100 bis 200 µl der Isolate fanden zur Infektion subkonfluenter RK13-Zellen in 6-Loch-oder 12-Loch-Platten Verwendung (siehe Abbildung 15). Alternativ konnte die 1. Passage auch

als Blindpassage durchführt werden, dabei wurde der komplette Überstand einer Vertiefung abgenommen, zirka die Hälfte wieder direkt auf subkonfluente RK13-Zellen überführt und nach demselben Schema verdünnt (siehe Abbildung 7). Klone, welche nur einen Single-cross-over vollzogen hatten und somit nicht rekombinant waren, zeigten in Folge fehlender Expression des K1L-Gens, bei weiteren Passagen kein Wachstum mehr. Insgesamt erfolgten zirka drei Passagen auf RK13-Zellen und danach, zur genetischen Überprüfung der einzelnen Klone durch PCR, eine Amplifikation zur DNA-Gewinnung.

3.2.3.1.5 Überprüfung rekombinanter Virusklone

3.2.3.1.5.1 Amplifikation der einzelnen Virusklone

Die Amplifikation von Virusisolaten erfolgte auf HEF-, BHK- oder RK13-Zellen. Dazu wurden zirka 200µl eines einzelnen Isolats in eine Vertiefung einer 12-Loch-Platte ausgebracht. Zur besseren Adsorption der Virionen an den Zellen wurde das gesamte Medium der Vertiefung entnommen und das Virusmaterial für zirka eine Stunde bei 37℃ und 5% CO_2 inkubiert und anschließend die Vertiefung mit Erhaltungsmedium aufgefüllt. Nach etwa 24 bis 72 Stunden, nach Ausbildung eines fast vollständigen zytopathischen Effekts, erfolgte die Ernte der Zellen in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß *(Eppendorf AG).* Diese wurden bei 2.000 rpm in einer Zentrifuge (*Biofuge fresco, Heraeus Instruments)* für 5 Minuten pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 500µl TE-Puffer aufgenommen.

TE-Puffer:

10 mM Tris-HCl

0,1 mM EDTA (pH 8,0)

3.2.3.1.5.2 Extraktion der viralen DNA

Zum Entfernen von Proteinen erfolgte die Inkubation des aus der Amplifikation gewonnenen Pellets mit Proteinase K *(Sigma Aldrich Chemie GmbH*). Dazu wurde das in 500µl TE-Puffer aufgenommene Pellet mit 50µl 10x TEN-Puffer, 23µl 20%SDS und 50 µl Proteinase K-Lösung (1 mg/ml in 1 mM $CaCl_2$) versetzt und bei 56℃ ein bis vier Stunden (oder auch über Nacht) in einem Blockthermostat *(BT 1302, HLC Bio Tech – Haep Labor Consult)* inkubiert. Danach erfolgte eine Aufreinigung durch Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung (siehe 3.2.1.1.3, Seite 44). Das resultierende DNA-Pellet wurde in 30 bis 50 µl sterilem A. bidest. aufgenommen.

TEN-Puffer (10x, pH 7,8)

20 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

0,15 M NaCl

3.2.3.1.5.3 PCR-Analyse viraler DNA

Die PCR-Analyse erfolgte mit 2 - 3 µl der extrahierten Virus-DNA und den unter 3.1.5.1 (Seite 37) beschriebenen Oligonukleotiden für den Deletionsbereich, in der das Fremdgen inseriert werden sollte. Die Durchführung der PCR erfolgte wie im Abschnitt Materialien unter 3.2.1.6 (Seite 48) beschrieben.

3.2.3.1.6 Deletion/Entfernung des K1L-Markergens aus rekombinanten MVA

Nachdem die PCR-Analyse ergab, dass einzelne Virusklone frei von MVAwt waren, erfolgten weitere Passagen zur Entfernung des K1L-Markergens auf HEF-Zellen. 200 bis 300 µl des letzten RK13-Plaqueisolates wurden hierzu auf eine subkonfluente 6-Loch-Platte mit HEF-Zellen in verschiedenen Verdünnungen (Abbildung 15) ausgebracht. Nachdem das Virusmaterial zwei bis 4 Stunden adsorbiert hatte, erfolgte eine Überschichtung der Zellen mit Low Melting Point Agarose *(L.M.P. Agarose, Gibco BRL®, Invitrogen GmbH)*. Die Überschichtung erforderte die Herstellung einer 2%igen Low Melting Point Agarose-Lösung, welche in der Mikrowelle aufgekocht wurde, und die Supplementierung von 2x MEM mit 4% FBS und 2% AB-AM. Beides wurde bis zur Benutzung im Wasserbad bei 37℃ aufbewahrt. Kurz vor Ablauf der Adsorptionszeit wurde die Agarose und das 2x MEM im Verhältnis 1:2 gemischt und zur Vermeidung des Festwerdens in einem Becherglas mit 37℃ warmen Wasser aufbewahrt. Nach dem Entfernen des Virusinokulats erfolgte die Überschichtung der Zellen mit je 2 ml der hergestellten Mischung. Nach dem Festwerden der Agarose bei Raumtemperatur, wurden die Platten im Brutschrank bei 37℃ und 5% CO_2 für weitere zwei bis vier Tage inkubiert. Die makroskopische und mikroskopische Untersuchung der Platten auf Plaquebildung erfolgte täglich. Spätestens am 4. Tag wurden in der Verdünnung, in der nur noch vereinzelt Plaques zu erkennen waren, diese durch Ansaugen isoliert und in 500µl Erhaltungsmedium aufgenommen (siehe 3.2.3.1.4, Seite 59). Die Klone wurden nach jeder Passage amplifiziert, die DNA extrahiert und durch PCR-Analyse mit K1L-spezifischen Oligonukleotiden überprüft.

2%ige L.M.P. Agarose:

2 g Low Melting Point Agarose
ad 100 ml A. bidest.

3.2.3.1.7 Amplifikation von rekombinanten MVA

Nach der Passagierung auf RK13-Zellen und HEF-Zellen und entsprechender Überprüfung der DNA der rekombinanten Virusklone mittels PCR mit spezifischen Oligonukleotiden, wurde ein Wildtyp- und K1L-Markergen freier Virusklon ausgewählt und als Mutterklon zur Amplifikation eines Virusstocks verwendet. Die Amplifikation zu einem Primärstock, der dann als Ausgangsstock für den Virus-Arbeitsstock und den Virus-Impfstock diente, erfolgte nach folgendem Schema:

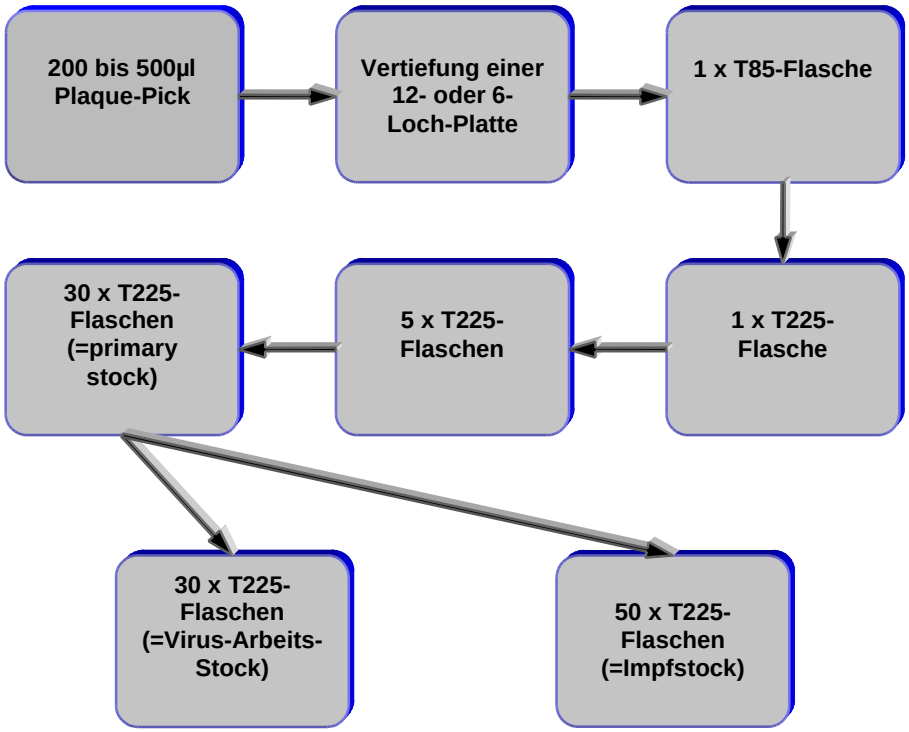


Abbildung 16: Schema für die Amplifikation von rekombinantem MVA

3.2.3.1.8 Titration von Viren durch Immunfärbung

Die Ermittlung der Infektiosität in IE/ml (infektiöse Einheiten pro ml) einer Virusstockpräparation erfolgte durch Sichtbarmachung MVA-infizierter Zellen, sogenannte Plaques, durch spezifische Immun-Peroxidase-Färbung. Für die Titration von MVA wurden subkonfluente HEF-Zellen in 6-Loch-Platten verwendet. Das Virusmaterial, entweder ein Arbeitsstock oder eine Impfstoffpräparation, wurde aufgetaut und dreimal für eine Minute in einem Becher-Ultraschall-Gerät *(BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Germany)* auf Eis beschallt. Anschließend erfolgte die Verdünnung des Virusmaterials in 10er Schritten, von 10^{-1} bis 10^{-9}, in 3 ml Erhaltungsmedium. Jeweils 1 ml dieser Verdünnungen wurde auf zwei 6-Loch-Platten im Doppelansatz ausplattiert, von 10^{-4} bis 10^{-9}. Nach einer 2stündigen Inkubation der Platten bei 37℃ und 5%iger CO_2-Atmosphäre erfolgte der Austausch des Inokulums durch Erhaltungsmedium. Nach weiteren 48 Stunden konnte das Medium von den Zellen entfernt und zur Fixierung der Zellen je Vertiefung, 2 ml einer 1:1 Methanol-Aceton Mischung zugegeben werden. Nach 5 Minuten bei RT wurde das Gemisch abgenommen und die Platten luftgetrocknet. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Platten mit je 2 ml des Blockpuffer (PBS pH 7,4 + 3% FBS) pro Vertiefung für zirka 10 bis 60 Minuten.

Die Durchführung der folgenden Schritte erfolgten alle bei RT auf einer Schwenkapparatur *(Polymax 1040, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG)*. Die Platten wurden für eine Stunde mit 1 ml pro Vertiefung einer 1:1000 verdünnten Anti-Vaccinia-Antikörper-Lösung in Blockpuffer inkubiert. Anschließend erfolgte zweimal ein Waschschritt der Platten für 5 Minuten mit PBS und eine 45minütige Inkubation mit dem zweiten Antikörper, einem

Peroxidase-gekoppelten Anti-Kaninchen-Antikörper, ebenfalls in einer Verdünnung von 1:1000 in Blockpuffer. Nachdem die Platten zweimal mit PBS gewaschen wurden, konnte das Substrat für die Meerrettich-Peroxidase vorbereitet werden. Hierfür musste eine gesättigte Dianisidine-Lösung durch Zugabe einer Messerspitze Dianisidine in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß *(Eppendorf AG)* und 1 ml 100%igem Ethanol hergestellt werden. Diese Lösung wurde für zirka 5 Minuten auf einem Schüttler *(Vortex-Genie 2, Scientific Industries Inc.)* gemischt und bei zirka 6.000 rpm für 30 bis 60 Sekunden zentrifugiert (*Biofuge fresco, Heraeus Instruments).* Der Überstand konnte anschließend durch einen Filter von 0,4 bis 0,2 µm filtriert werden und 300 µl dieser gesättigten und filtrierten Lösung wurden dann auf 10 ml PBS gegeben und mit 10 µl einer 30% H_2O_2-Lösung supplementiert. 0,5 bis 1 ml dieses Substrates wurden je Vertiefung auf die Zellen verteilt. Nach einer Inkubation von 5 bis 20 Minuten erfolgte eine Braunfärbung MVA-infizierter Zellfoci.
Die Bestimmung des Titers einer Viruspräparation erfolgte durch Auszählung der Anzahl gefärbter Foci. Die genauesten Ergebnisse wurden durch Auszählung von Vertiefungen mit 20 bis 100 Foci erzielt. Aus der Anzahl der Foci des Doppelansatzes wurde der Durchschnitt gebildet und diese Zahl mit der Verdünnung multipliziert um den Titer als IE/ml zu erhalten.
Diese Methode kann auch mit Antikörpern gegen das inserierte Fremdgen durchgeführt werden und dient somit gleichzeitig zum Nachweis der Proteinexpression.

Blockpuffer für den Immunostain:
PBS (pH 7,4)
3% FBS

3.2.3.1.9 Herstellung von Impfstoffpräparationen

MVA-Virus-Suspensionen können von Zelltrümmern und rekombinantem Protein mittels Ultrazentrifugation durch Saccharose-Lösungen gereinigt werden. Dazu erfolgte die Verdünnung des Virusmaterials in einem 50 ml Falkon mit 10 mM Tris-HCl-Lösung pH 9,0 auf ein Volumen von 20 bis 30 ml und die Behandlung mit einer Ultraschall-Nadel *(TS 73, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG).* Die Beschallung auf Eis erfolgte jeweils dreimal für 15 Sekunden bei 80% Stärke und dreimal für 15 Sekunden bei voller Stärke. Anschließend erfolgte zur Entfernung von großen Zelltrümmern („clarifying“) eine Zentrifugation des Virusmaterials bei 2500 rpm für 5 Minuten in einer Zentrifuge *(Megafuge 1,0R, Heraeus Instruments)*. In der Zwischenzeit erfolgte die Vorbereitung der Saccharose-Kissen. Hierzu wurden Ultrazentifugations-Röhrchen (SW 28, *Beckman Coulter GmbH – Biomedical Research)* zur Hälfte mit 36% (V/V) Saccharose befüllt und mit einem gleichen Volumenanteil des Überstands des beschallten Virusmaterials überschichtet. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 13.500 rpm für 90 Minuten in einer Ultrazentrifuge *(Optima™ LE-80K, Beckman Coulter GmbH – Biomedical Research)*. Der Überstand wurde

anschließend vorsichtig dekantiert und das Pellet in 10 mM Tris-HCl-Lösung pH 9,0 aufgenommen, dabei sollte das Volumen so gering wie möglich gehalten werden (zirka 300 - 500 µl pro Röhrchen). Die Aufbewahrung der Impfstoffpräparation erfolgte bei – 80°C.

3.2.3.1.10 Sterilitätsprüfung von Impfstoffpräparationen

3.2.3.1.10.1 Sterilitätsprüfung in nicht supplementiertem Medium

Die einfachste Methode zur Sterilitätsprüfung stellte die Zugabe eines Aliquots der Impfstoffpräparation in Medium ohne Pen-Strep (*BioWhittaker™, Cambrex)* dar. Eine Mischung aus 5 ml Medium und 5 µl der Impfstoffpräparation wurden in einer Petrischale *(Zellkulturschale, 50 x 20 mm, Greiner Bio-One GmbH)* für zwei bis sieben Tage bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Dabei erfolgte täglich eine makroskopische und mikroskopische Untersuchung auf Bakterienkontaminationen.

3.2.3.1.10.2 Sterilitätsprüfung auf speziellen Agarplatten

Eine weitere Möglichkeit der Prüfung der Sterilität einer Impfstoffpräparation erfolgte auf Agarplatten. Hierbei fanden verschiedene Agarplatten, zum Nachweis unterschiedlicher Keime, Verwendung. Columbia- oder „Blut"-Platten ermöglichen das Wachstum der meisten Keime, „Kochblutplatten" den Nachweis von sehr empfindlichen Keimen und zusätzlich wurden McConkey-Platten mitgeführt, zum Nachweis von *Enterobacteriaceae*. Die Beimpfung dieser Platten erfolgte mit einem Aliquot der Impfstoffpräparation mittels Drei-Ösenausstrich und einer Bebrütung von 24 Stunden bei 37°C und 5% CO_2.

3.2.3.2 Charakterisierung rekombinanter Viren

3.2.3.2.1 PCR-Analyse der viralen DNA

Eine wiederholte Überprüfung des DNA-Genoms der Viruspräparationen rekombinanter MVA-Viren erfolgte durch PCR-Analyse (siehe 3.2.1.6) mit spezifischen Oligonukleotiden (siehe 3.1.5). Zu diesem Zweck wurden Oligonukleotide der Deletion, in die das Fremdgen inseriert wurde, Fremdgen-spezifische Oligonukleotide, zum Nachweis des inserierten Gens und K1L-spezifische Oligonukleotide, zur Überprüfung der Abwesenheit des K1L-Markergens, verwendet.

3.2.3.2.2 Untersuchung der Vermehrungsfähigkeit der rekombinanten Viren

3.2.3.2.2.1 Infektion mit hoher MOI (multiplicity of infection; Ein-Schritt-Wachstumskurve, one step growth curve)

Durch diese Wachstumsuntersuchung kann die Menge neu gebildeter Viruspartikel pro infizierte Zelle analysiert werden. Hierfür erfolgte eine Infektion von HEF-Zellen mit 10 IE pro Zelle und die Ernte der infizierten Zellen nach 0, 4, 8, 12, 24 und 48 Stunden. Die Ansätze wurden dreimal eingefroren und aufgetaut, anschließend dreimal eine Minute im Becher mit Ultraschall (*BANDELIN electronic GmbH & Co. KG)* behandelt und jeder Zeitpunkt auf

HEF-Zellen titriert (siehe 3.2.3.1.8 auf Seite 62). Danach erfolgte die Bestimmung der Titer der einzelnen Zeitpunkte und die Auswertung in einem Diagramm mit Hilfe der Software Excel 2000 (*Microsoft Corporation).*

3.2.3.2.2.2 Infektion mit geringer MOI (Mehr-Schritt-Wachstumskurve, multiple step growth curve)

Bei der „multiple-step"-Wachstumskurve erfolgte die Infektion von HEF-Zellen mit nur 0.01 IE pro Zelle, hierbei kann zusätzlich zur Bildung neuer infektiöser Partikel auch die Zell- zu Zellausbreitung des rekombinanten MVA, überprüft werden. Die Ernte der infizierten Zellen erfolgte zu den Zeitpunkten 0, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Infektion. Anschließend wurde die Infektiosität durch Titration auf HEF-Zellen bestimmt. Die Auswertung erfolgte auf dieselbe Art und Weise wie für die Ein-Schritt-Wachstumskurve beschrieben.

3.2.3.2.2.3 Replikationsdefizienzassay

Diese Wachstumsuntersuchungen wurden nach der „Allgemeinen Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung des rekombinanten Vacciniavirus MVA", 6790-10-74 vom Juni 2002, durchgeführt. Rekombinante MVA, die der Risikogruppe 2 zugeordnet werden, können nach Prüfung ihrer Unfähigkeit zur Replikation auf den humanen Zelllinien HeLa oder HaCat, auf Risikogruppe 1 herabgestuft werden.

Zum Nachweis dieser erhaltenen Replikationsdefizienz nach Insertion von Fremdgenen erfolgte die Infektion von HeLa-Zellen mit den rekombinanten MVA, MVAwt und CVA mit einer MOI von 0,05. Nach 60-minütiger Adsorption der Viren bei 37℃ und 5% CO_2 wurde das Inokulum entfernt und die Zellen dreimal mit Erhaltungsmedium gewaschen. Die Ernte der Zellen erfolgte nach Adsorption bzw. 72 Stunden Infektion. Die Vermehrungsfähigkeit der Viren konnte durch Rücktitration der Infektiosität des zu den verschiedenen Zeitpunkten geernteten Virusmaterials auf BHK-Zellkulturen bestimmt und mit Hilfe der Software Excel 2000 (*Microsoft Corporation)* ausgewertet werden.

3.2.4 Tiermodelle

3.2.4.1 Mausmodell

3.2.4.1.1 BALB/c-Mäuse (H-2^d)

Experimente in diesem Mausmodell wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Wieslawa Olszewska und Prof. Dr. Peter Openshaw vom Imperial College (London, UK) durchgeführt.

Die 8 - 12 Wochen alten Tiere wurden von Harlan Olac Ltd. *(Blackthorn Bicester, England)* bezogen und wurden unter SPF (specific pathogen-free)-Bedingungen gehalten.

3.2.4.1.1.1 Immunisierung und Infektion der Mäuse

H-2^d-Mäuse wurden in Gruppen von 4 bis 6 Tieren gehalten und zweimal im Abstand von 3 Wochen mit 1 x 10^8 pfu MVA-HRSV-F, MVA-HRSV-G oder MVAwt immunisiert. Als positive Kontrollgruppe wurde eine Gruppe i.m. mit 50 µl FI-RSV immunisiert. Drei Wochen nach der zweiten Immunisierung wurden die Mäuse intranasal mit HRSV (1.2x 10^6 IE in 50 µl) infiziert und auf Gewichtsverlust und Krankheitszeichen beobachtet. Vier Tage nach der Infektion wurden die Mäuse zur Organentnahme (Lunge) getötet (siehe Abbildung 17).

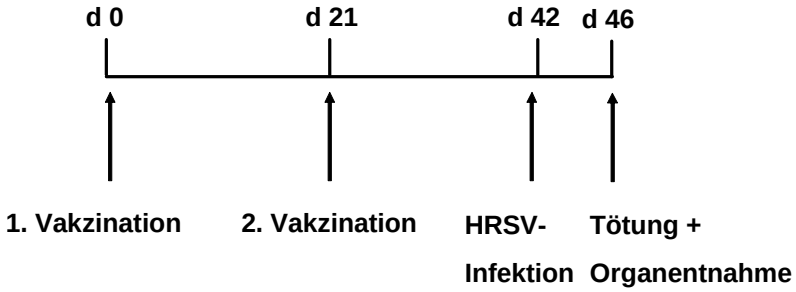


Abbildung 17: Immunisierungsschema der BALB/c-(H-2^d)-Mäuse.

3.2.4.1.2 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte entweder unter Äthernarkose am retrobulbären Venenplexus oder durch Inzision der Schwanzvene.

3.2.4.1.3 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Vier Tage nach der Infektion wurden die Mäuse getötet und die Lungen mit 1 ml einer 12 mM Lidocain-Lösung in Eagle's MEM gefüllt, gespült und die erhaltene BAL-Suspension in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäß *(Eppendorf AG)* auf Eis gegeben. 100 µl jeder BAL-Probe wurden auf Objektträgern zytozentrifugiert, mit Hämatoxilin und Eosin gefärbt und ausgezählt. Die Überstände der BAL-Proben wurden zur Messung von IL-12- und IL-18- Zytokinen verwendet.

3.2.4.1.4 Quantifizierung von HRSV in Lungen infektiöser Mäuse

Um den Gehalt von infektiösem Virus in den einzelnen Lungenhomogenaten zu verschiedenen Tagen nach der Infektion mit HRSV-Subtyp A2 zu messen, wurden in PBS homogenisierte Lungengewebe bei 4000 rpm für 4 Min. zentrifugiert und die Überstände im Zweifachansatz auf HEp-2-Zellen titriert. Als Positiv-Kontrolle diente eine Viruspräparation mit bekanntem Titer. Nach 24 Std. Inkubation bei 37℃ und 5%iger CO_2-Atmosphäre wurden die Zellmonolayer gewaschen und mit Peroxidase-konjugiertem Anti-RSV-Antikörper aus der Ziege *(Biogenesis Ltd., England)* inkubiert. Die Herde infizierter Zellen wurden durch DAB-Färbung *(Sigma Aldrich Chemie GmbH*) sichtbar gemacht und unter dem Lichtmikroskop gezählt.

3.2.4.2 Rindermodell

Die Immunisierungsexperimente in Kälbern erfolgten in Zusammenarbeit mit A.F.G. Antonis, Department of Infection Biology, Animal Sciences Group, Wageningen University and Research Centre, Lelystad, Niederlande. Hierbei sollten die MVA-BRSV-F- und -G-Impfstoffe im Vergleich zu einer PBS-Vergleichsgruppe auf ihre Verträglichkeit, Immunogenität und Schutzwirkung gegen BRSV-Infektion getestet werden. 2003 entwickelte ANTONIS et al. dieses Infektionsmodell zur Evaluierung von BRSV-Test-Impfstoffen (ANTONIS et al. 2003). Hierbei konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die FI-BRSV-Vakzination, wie auch FI-HRSV-Impfung in Kindern, eine immunpathogene Symptomatik nach RSV-Infektion hervorruft.

3.2.4.2.1 Aufbau des Immunisierungs- und Infektionsmodells

In diesen Experimenten kamen 18 unter SPF-Bedingungen gehaltene Kälber im Alter von 4 Wochen zur Verwendung. Die Verteilung der 18 Kälber erfolgte in 3 Gruppen mit jeweils 6 Tieren, wobei männliche und weibliche Tiere zu gleichen Anteilen vertreten waren. Diese Kälber wurden durch *Sectio caesarea* entbunden und ohne Kolostrum aufgezogen. Die Fütterung erfolgte bis zur Entwöhnung in der 6. Lebenswoche mit einem speziellen Milchaustauscher *(Denkaveal Start, Denkavit Nederland BV)*, welcher frei von Antikörper war (negativ getestet gegen BVDV, PI3 and BRSV, Antikörper gegen das gB-Protein von BHV-1 waren nachweisbar, jedoch negativ im BHV-1 gE ELISA). Die Unterbringung erfolgte in speziellen isolierten Einheiten unter kontrollierten Umweltbedingungen und die Identifizierung der einzelnen Tiere wurde durch Ohrmarken gesichert. Nur eingewiesenes Personal, welches direkt am Experiment beteiligt war, hatte Zutritt zu diesen Laboreinheiten.

Die Impfungen erfolgten jeweils am Tag 0 und Tag 21 durch intramuskuläre Inokulation; in Abbildung 18 (auf Seite 68) ist das Immunisierungsschema dargestellt. Die erste Impfung wurde auf der rechten Halsseite und die zweite auf der linken Halsseite intramuskulär (i.m.) appliziert. Am Tag 126 wurden die Tiere intranasal mit einem virulenten, *in vivo* passagierten BRSV-Feldisolat (Stamm Odijk) infiziert. Dieser Stamm wurde bei einem Ausbruch einer akuten respiratorischen Erkrankung einer Herde im Dezember 1991 in Odijk in den Niederlanden isoliert (VAN DER POEL et al. 1996). Das Gruppenschema ist in Tabelle 3 dargestellt; sie zeigt die Gruppenaufteilung mit Impfstoffen und Impfdosen.

Abbildung 18: Immunisierungsschema zum Kälberexperiment. Die Vakzination erfolgte je nach Gruppe mit den in Tabelle 3 angegebenen Impfstoffen und Impfdosen. Am Tag 126 (d 126) erfolgte die intranasale BRSV-Infektion mit einem virulenten, in vivo passagierten BRSV-Feldisolat (Stamm Odijk). Am Tag 142 (d 142) wurden die Tiere durch intravenöse Injektion von Pentobarbital getötet und entblutet.

Tabelle 3: Schema und Gruppenaufteilung, Impfstoffaplikationen und -dosen. Die Gruppe T02 erhielt 1 x 10^8 pfu MVA-BRSV-F und die Gruppe T03 erhielt jeweils 1 x 10^8 pfu MVA-BRSV-F und MVA-BRSV-G. Die Tiere der Gruppe T04 erhielten 2 ml einer PBS-Lösung.

Gruppennr.	Impfstoff	Dosis	Anzahl Tiere
T02	**MVA-BRSV-F**	**1 x 10^8**	**6**
T03	**MVA-BRSV-F** + MVA-BRSV-G	**1 x 10^8 + 1x 10^8**	**6**
T04	Mock-Vakzine	**2 ml PBS**	**6**

Die Tiere wurden täglich auf ihren Allgemeinzustand untersucht; ab dem 2. Tag nach der RSV-Infektion (vergl. Abbildung 18) bis zum Ende des Experiments erfolgte diese Untersuchung zweimal täglich. Das Gewicht der Tiere wurde am Tag der ersten Impfung (d 0) und am Tag der Euthanasie (d 142) dokumentiert. Blutentnahmen zur Serumgewinnung erfolgten an den ersten drei Tagen nach der *Sectio caesarea* (d-30, -29, -28) und dann wöchentlich bis zur Tag der RSV-Infektion, ab dem 5. Tag nach der Infektion (d131) täglich. Heparinisiertes Blut wurde ab dem 2. Tag nach der RSV-Infektion (d128) täglich bis zum Ende des Experiments entnommen. Nasenabstriche und Bronchoalveoläre Lavagen (BAL) wurden nach der RSV-Infektion and den Tagen 128, 132, 135 und 138 entnommen. Das Experiment wurde 16 Tage nach der Infektion, durch Tötung der Tiere durch intravenöse

Injektion von Pentobarbital und Entbluten, beendet. Tabelle 4 zeigt die Untersuchungen, welche mit den gewonnenen Proben durchgeführt wurden:

Tabelle 4: Übersicht über die Untersuchungen, welche an den gewonnenen Proben vorgenommen wurden.

Serum
Serologie auf BRSV und andere pathogene respiratorische Erreger (BVDV, PI_3 und BHV1)
heparinisiertes Blut
BVDV Antigen ELISA (nur am Tag der Geburt, d-30)
WBC (white blood cells, weiße Blutzellen)
FACS Analyse
Plasma-Laktat-Konzentration
Nasenabstriche
IgA Messung
BAL (Bronchoalveoläre Lavagen)
BRSV-Isolation und -Titration
Serologie (IgA, IgE)
ELISPOT (Zytokinmessung)
Zytokin-PCR-Analyse
BAL-Zellen
FACS-Analyse (BRSV-spezifische $CD8^+$-T-Zellimmunantworten)
Zellzählung und -differenzierung

Die „post mortem"-Untersuchung schloss die Inspektion der Lungen, sowie die Probenentnahme aus diesem Organ für die Histologie ein. Außerdem erfolgte die Entnahme lymphoiden Gewebes zur FACS-Analyse.

3.2.4.3 ELISA

3.2.4.3.1 Vaccinia-spezifischer ELISA

Die Messung Vaccinia-spezifischer Serum-Antikörper erfolgte mit Hilfe eines ELISA (modifiziert für Rinder nach (COSMA et al. 2004)).

Hierzu erfolgte die Beschichtung von 96-Loch-Mikrotiterplatten *(MAXISorb®, Nalge Nunc International)* mit 1 µg/ml Saccharose-Gradient gereinigtem MVA in Coatingpuffer (Volumen 100µl) für 3 Std. bei 37℃ und dann über Nacht bei 4℃. Am nächsten Tag wurden die Platten viermal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 200 µl pro Loch Blockpuffer für 1 Std. bei 37℃ inkubiert. Anschließend erfolgten ein 4maliger Waschschritt der Platte, die Beschickung mit Serumverdünnungen (100 µl pro Loch) und die Inkubation von einer Std. bei 37℃ im Brutschrank. Danach wurde die Platte viermal gewaschen und mit

100 µl pro Loch alkalischer Phosphatase-konjugiertem Anti-Spezies-Antikörper (Anti-Maus oder Anti-Rind), in Blockpuffer verdünnt, für 30 Min. bei 37℃ inkubiert. Als Substrat wurde pNPP *(Paranitrophenylphosphat, Sigma Aldrich Chemie GmbH)* verwendet, welches nach Angaben des Herstellers in A. bidest. aufgelöst wurde. Nach einem weiteren Waschschritt erfolgte die Zugabe von 75 µl Substrat pro Loch und eine 20minütige Inkubation bei 37℃. Die anschließende Messung der ELISA Reaktion erfolgte in einem Microplate Reader *(Model 550, Microplate Manager® 4,0, Bio-Rad Laboratories GmbH*) bei 405 nm.

Coating Puffer:

70 mM $NaHCO_3$

30 mM Na_2CO_3

pH 9,6

Waschpuffer:

44,5 mM NaCl

0,3 mM KH_2PO_4

1,6 mM Na_2HPO_4 x12H_2O

0,3 mM KCl

0,05% Tween 20

Blockpuffer für Mausseren:

PBS

10% FBS

0,05% Tween 20

„Blockpuffer“ für Rinderseren:

PBS

0,05% Tween 20

(für Rinderseren konnte kein FBS verwendet werden, da der AP-konjugierte Anti-Rind-Antikörper sonst zu starken Hintergrund produzierte)

3.2.4.3.2 Zytokin-ELISA

IL-12 p40 wurde mit Hilfe des DuoSet ELISA Systems von R&D Systems, Inc. *(Minneapolis, USA)* nach Angaben des Herstellers gemessen und IL-18 wurde mit Hilfe von Maus IL-18 ELISA-Kit von MBL (*Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.*) ebenfalls nach Angaben des Herstellers, nachgewiesen.

3.2.4.3.3 HRSV-ELISA

Die Messung HRSV-spezifischer Serum-Antikörper erfolgte mit Hilfe eines ELISA. Dazu wurden Mikrotiterplatten *(MAXISorb® Nalge Nunc International)* über Nacht mit 2 µg/ml Saccharose-Gradient gereinigtem HRSV-Antigen in Carbonat-Bicarbonat Puffer (*C-3041, Carbonat Bicarbonat Buffer Capsules, Sigma Aldrich Chemie GmbH*) beschickt. Das Blocken der Platten erfolgte für 2 Std. mit 3% BSA bei Raumtemperatur und anschließendem Waschen. Danach wurde das Serum im Zweifachansatz auf den Platten verdünnt und mit Anti-Maus IgG konjugiert mit HRP *(Sigma Aldrich Chemie GmbH)* oder biotinyliertem Anti-Maus IgG1 oder IgG2a *(Serotec GmbH)* inkubiert und nachfolgend durch Zugabe von HRP-konjugiertem Streptavidin *(Sigma Aldrich Chemie GmbH)* und O-Phenylenediamin, als Substrat, gefärbt. Die Absorption wurde bei 450 nm gemessen. Als Kontrollseren dienten Seren von nicht immunisierten Mäusen.

3.2.4.3.4 BRSV-F-spezifischer ELISA

Dieser ELISA detektiert Antikörper gegen das Fusionsprotein von BRSV (F-ELISA, Ceditest ELISA für BRSV-Antikörper, Cedi Diagnostics, Lelystad, Niederlande).

3.2.4.3.5 BRSV-G-spezifischer ELISA

Dieser G Peptid „Blockierungs“-ELISA wurde 1996 von LANGEDIJK et al. beschrieben und zur Bestimmung von BRSV-G-spezifischen Antikörper-Titern benutzt. Das Prinzip beruht auf der Blockierung der Bindung von BRSV-G-spezifischem Antikörper (mAb 20, (LANGEDIJK et al. 1996a)) mit dem gebundenen Peptid durch, im Serum vorhandene, G-spezifische Antikörper.

3.2.4.4 ELISPOT

Die Anzahl der Zellen die IFN-γ, IL-4, IL-5 und IL-13 bilden wurden durch ELISPOT bestimmt. Dafür erfolgte die Beschichtung von 96-Loch-Platten *(*MAXISorb®*, Nalge Nunc International)* über Nacht mit Mikrozellulose, der die entsprechenden Zytokin-spezifischen Antikörper *(IFN-γ, IL-4, IL-5 von Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany; IL-13 von R&D Systems, USA)* in Carbonat-Bicarbonat-Puffer *(C-3041, Carbonat Bicarbonat Buffer Capsules, Sigma Aldrich Chemie GmbH)* enthielt. Danach wurden Zellen aus der BAL (5x 10^4 pro well) im Zweifachansatz zugegeben und bei 37℃ und 5% CO_2 Atmosphäre für drei Tage inkubiert. Die entsprechenden biotinylierten Anti-Zytokin-Antikörper *(anti-IFN-γ, -IL-4, -IL-5 von Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany; anti-IL-13 von R&D Systems, USA)* wurden anschließend zugegeben und für 2 weitere Std. inkubiert, gefolgt von der Zugabe von alkalischer Phosphatase-konjugiertem Avidin *(Sigma Aldrich Chemie GmbH)* und BCIP/NBT-Substrat *(Sigma Aldrich Chemie GmbH*), bis blaue Spots sichtbar wurden. Diese wurden durch einen automatischen Spot-Zähler (*AID ELISPOT Reader System, AID GmbH, Strassberg, Germany*) ausgezählt. Die Ergebnisse wurden als Anzahl der Spots pro Millionen (10^6) BAL-Zellen angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung der rekombinanten Viren MVA-BRSV-F und MVA-BRSV-G

4.1.1 Klonierung des Vektorplasmides pIIIdhrP7.5-BRSV-F

Die Insertion des BRSV-F-Gens in die Deletion III des MVA-Genoms (MVA-BRSV-F) erforderte die Klonierung und Konstruktion des Vektorplasmides pIIIdhrP7.5-BRSV-F. Dies erfolgte durch die Isolierung des BRSV-F-Gens aus dem Vektor pEVNeo14 und die Linearisierung des Vektors pIIIdhrP7.5 an der „multiple cloning site“ (MCS) durch die Behandlung mit Restriktionsendonukleasen. Beide Fragmente konnten anschließend isoliert und miteinander ligiert werden (Schema siehe Abbildung 19).

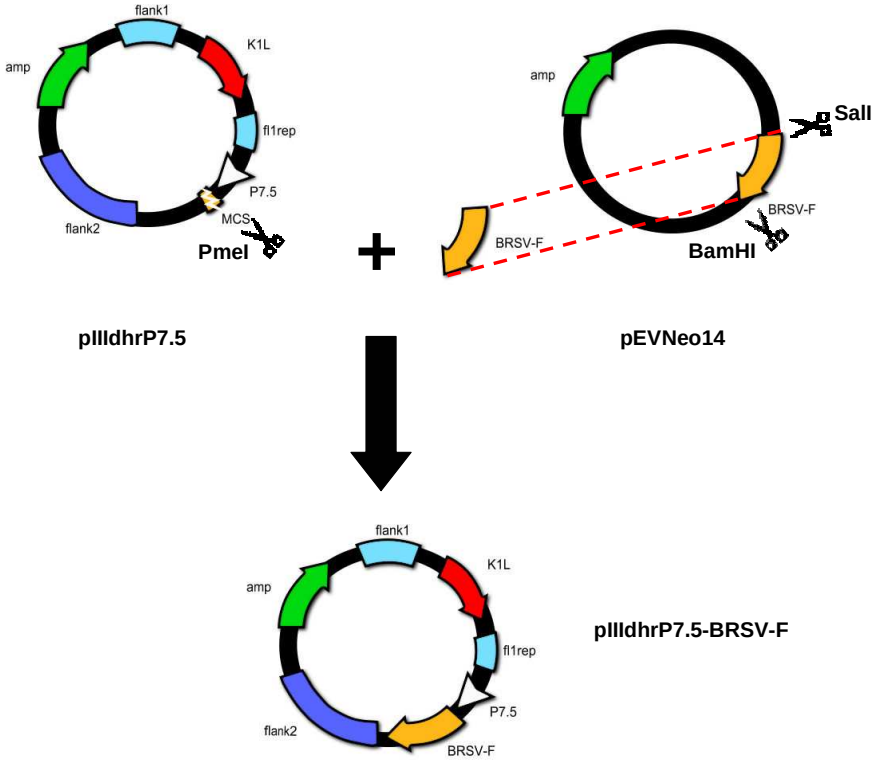


Abbildung 19: Schema zur Klonierung des Vektorplasmides pIIIdhrP7.5-BRSV-F.

4.1.1.1 Aufarbeitung der Vektoren pIIIdhrP7.5 und pEVNeo14 zur Herstellung des Vektorplasmides pIIIdhrp7.5-BRSV-F

Die Herstellung des Vektorplasmides pIIIdhrP7.5-BRSV-F erforderte die Spaltung des MVA-Vektorplasmid pIIIdhrP7.5 (siehe 3.1.6.1.1 und Abbildung 9 auf Seite 38) an der „multiple cloning site“ (MCS) mit der Restriktionsendonuklease PmeI. Die Isolierung des zu inserierenden BRSV-F-Gens erfolgte mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und SalI aus dem Plasmid pEVNeo14 (siehe Seite 39). Da das MVA-Vektorplasmid nach seiner Spaltung mit PmeI an der MCS glatte DNA-Enden aufwies, musste das ausgeschnittene

BRSV-F-Gen zum Auffüllen der Enden, mit T4-DNA-Polymerase *(1U/µl, Roche Diagnostics GmbH*) behandelt werden. Die Aufreinigung des linearisierten Vektorplasmides und die endgültigen Isolierung des BRSV-F-Gens erfolgte nach dem Restriktionsendo-nukleaseverdau und Agarosegel-Elektrophorese. Für das F-Gen konnte hierbei ein zirka 1700 bp großes DNA-Fragment und für den Vektor ein zirka 6000 bp großes Fragment durch Vergleich mit dem mitgeführten DNA-Größenstandard *(1Kb ladder, NEB BioLabs)* bestätigt werden (siehe Abbildung 20).

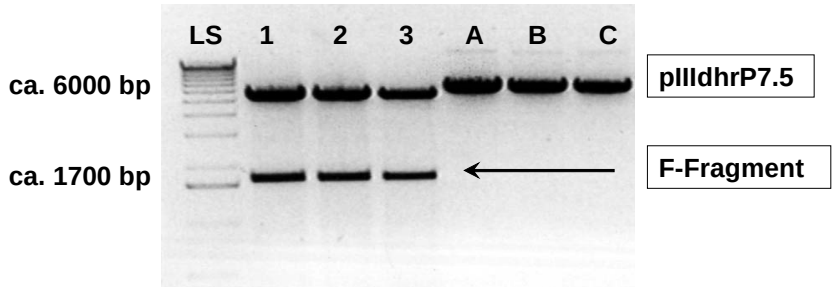


Abbildung 20: Isolierung der BRSV-F-Gensequenz und des MVA-Vektorplasmides pIIIdhrP7.5. Gezeigt sind DNA-Fragmente nach Behandlung mit Restriktionsendonukleasen und nach Auftrennung im 1%igen Agarosegel. In den Spuren 1 bis 3 sichtbar sind jeweils die F-spezifische Bande mit 1700 bp und eine größere Bande, die den Rest des Plasmides pEVNeo14 darstellt. In den Spuren A bis C ist eine Bande von ca. 6000 bp erkennbar, sie stellt das aufgeschnittene MVA-Vektorplasmid pIIIdhrP7.5 dar.

Nach der Isolierung der DNA-Fragmente erfolgte die Ligation der Vektor- und Insert-DNA und die Transformation in elektrokompetente Bakterien (siehe 3.2.1.5 auf Seite 48). 20 Bakterienkolonien konnten, durch Selektion auf Ampicillin-haltigen LB-Agarkulturen, isoliert und deren DNA mit Hilfe der analytischen Plasmidisolierung gewonnen werden. Durch Behandlung mit dem Restriktionsenzym EcoRI und der Auftrennung auf einem 1%igen Agarosegel gelang der Nachweis der, bei richtiger Orientierung des inserierten BRSV-F-Gens, erwarteten DNA-Fragmentgrößen von 4077, 2253, 1070 und 863 (4477, 2253, 673 und 863 bp bei falscher Orientierung, siehe Abbildung 21). Zur Kontrolle erfolgte das Mitführen des mit derselben Restriktionsendonuklease behandelten Ausgangsplasmides pIIIdhrP7.5.

Die Amplifikation der DNA des ausgewählten pIIIdhrP7.5-BRSV-F-Klon 5/3 erfolgte in einer präparativen Plasmidisolierung. Die Reinheit dieses Isolats bestätigte sich durch die Behandlung der DNA mit dem Restriktionsenzym EcoRI (siehe Abbildung 21). Die Übereinstimmung der klonierten BRSV-F-Sequenz mit der bekannten Sequenz (J.P.M. Langedijk, Animal Sciences Group, Wageningen University and Research Centre, Lelystad, Netherlands) konnte durch Sequenzierung der Plasmid-DNA bestätigt werden (siehe Anhang, Sequenzen auf Seite 170). Das generierte Vektorplasmid pIIIdhrp7.5-BRSV-F-Klon 5/3 wurde anschließend zur Herstellung des MVA-BRSV-F verwendet (siehe Seite 171).

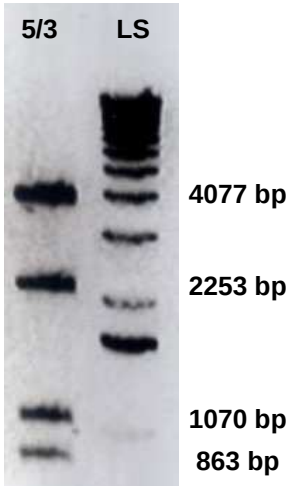


Abbildung 21: Restriktionsverdau von pIIIdhrP7.5-BRSV-F-Klon 5/3 mit EcoRI. Dargestellt sind die DNA-Fragmente nach Auftrennung im Agarosegel in der Größe von 4077, 2253, 1070 und 863 bp, bei richtiger Orientierung des inserierten BRSV-F-Gens. 5/3 = pIIdhrP7.5-BRSV-F-Klon 5/3 und LS = DNA-Längenstandard.

4.1.2 Klonierung des Vektorplasmides pVIΔhrPmH5-BRSV-G zur Herstellung von MVA-BRSV-G

Die Konstruktion des Vektorplasmides pVIΔhrPmH5-BRSV-G diente der Expression BRSV-G-Gen unter der Kontrolle des modifizierten Vacciniapromotors PmH5.

4.1.2.1 Klonierung des Vektors pLW9-G

Die Herstellung eines MVA-Vektorplasmides, das eine Insertion des BRSV-G-Gens im Bereich der Deletion VI des MVA-Genoms unter der Transkriptionskontrolle des modifizierten Vacciniapromotors mH5 ermöglicht, erforderte eine Zwischenklonierung des BRSV-G-Gens in das Plasmid pLW9, welches den vvPmH5 enthält.

Hierfür erfolgte die Präparation des BRSV-G-Gens aus dem Vektorplasmid pBRSVG und die Linearisierung des MVA-Vektorplasmids pLW9 an der „multiple cloning site“ (MCS) (Schema siehe Abbildung 22).

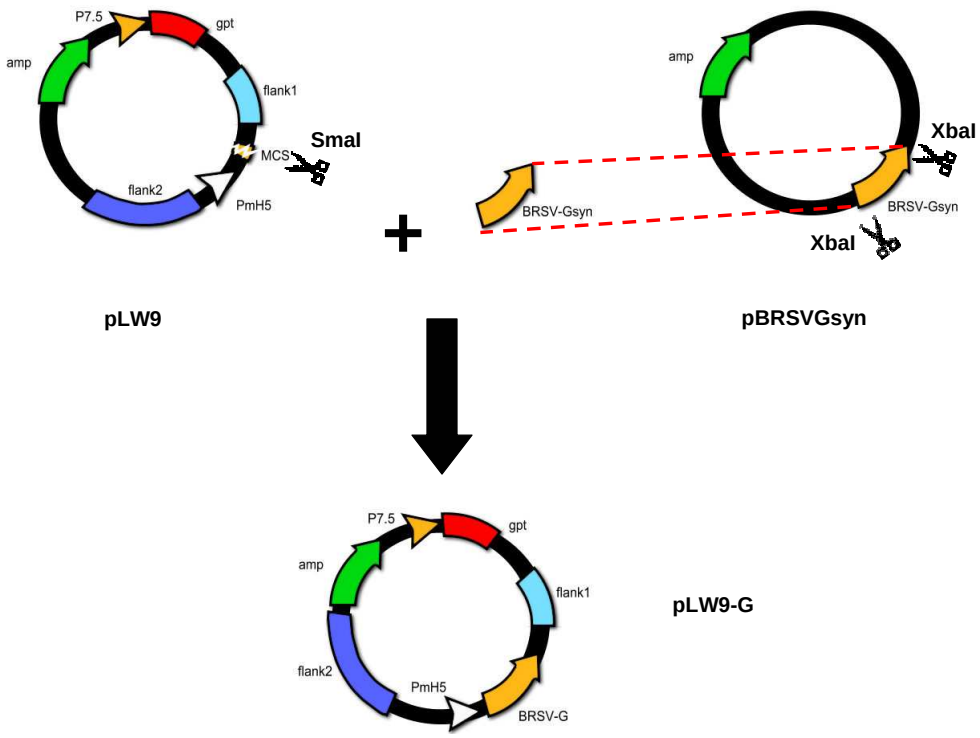


Abbildung 22: Schema zur Zwischenklonierung des BRSV-G-Gens in den Vektor pLW9.

4.1.2.1.1 Aufarbeitung der Vektoren pLW9 und pBRSVG zur Herstellung des Vektorplasmides pLW9-G

Die Linearisierung des Vektorplasmides pLW9 (siehe 3.1.6.1.3 und Abbildung 12) erfolgte mit der Restriktionsendonuklease SmaI und das zu inserierende BRSV-G-Gen konnte aus dem Plasmid pBRSVGsyn (siehe 3.1.6.1.5) mit der Restriktionsendonuklease XbaI isoliert werden. Die Aufreinigung und Präparation der DNA-Fragmente erfolgte durch Agarosegel-Elektrophorese (siehe 3.2.1.2.3), dabei ergaben sich Bandengrößen von zirka 5150 bp für den Vektor pLW9 und zirka 850 bp für das BRSV-G-Fragment (siehe Abbildung 23).

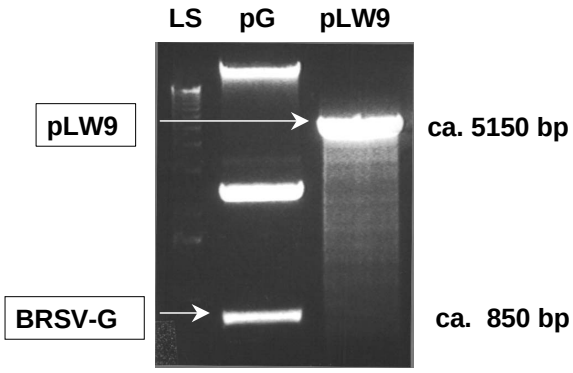


Abbildung 23: Isolierung der BRSV-G-Gensequenz und des MVA-Vektorplasmides pLW9. Gezeigt sind DNA-Fragmente nach Behandlung mit der Restriktionsendonuklease SmaI nach Auftrennung im 1%igen Agarosegel. Erkennbar sind die zirka 850 bp große spezifische Bande für das BRSV-G-Gen und die Bande mit zirka 5150 bp Größe für das linearisierte Vektorplasmid pLW9. pG = Plasmid pBRSVGsyn nach Behandlung mit dem Restriktionsendonuklease XbaI, pLW9 = Plasmid pLW9.

Nach der Ligation der DNA-Fragmente und der Transformation in elektrokompetente Bakterien, konnten 24 Ampicillin-resistente Bakterienkolonien isoliert und deren DNA in einer analytischen Plasmidisolierung (siehe 3.2.1.1.1) extrahiert werden. Die Insertion des BRSV-G-Gens konnte durch Behandlung der DNA der 24 pLW9-G-Klone mit dem Enzym ClaI überprüft und bestätigt werden. Zwei Klone, der Klon1/2 und 1/3, konnten hierbei nach Auftrennung im Agarosegel anhand der erwarteten DNA-Fragmentgrößen von zirka 500 und 5500 bp (siehe Abbildung 24), bei richtiger Orientierung des BRSV-G-Gens im pLW9 Plasmid, identifiziert und in einer präparativen Plasmid-DNA-Isolierung amplifiziert werden. Ein weiterer Kontrollverdau mit den Restriktionsendonukleasen MluI und NruI bestätigte die Richtigkeit der ausgewählten Klone (siehe Abbildung 24). Zur Kontrolle dienten hierbei das Ausgangsplasmid pLW9 und zwei pLW9-G-Klone 1/7 und 1/8. Zusätzlich konnte die Übereinstimmung der klonierten BRSV-G-Gensequenz mit der publizierten Sequenz (KUHNLE et al. 1998)durch eine Sequenzierung mit Oligonukleotiden zur Detektion der Deletion III (siehe 3.1.5.1.1) bestätigt werden (siehe Anhang, Sequenzen auf Seite 170).

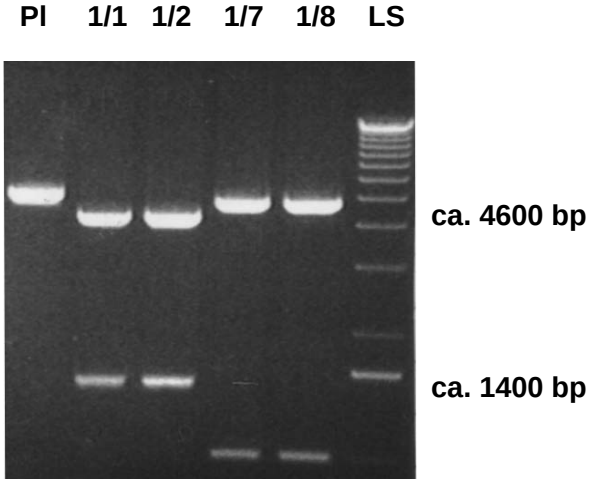


Abbildung 24: DNA-Fragmente ausgewählter Ampicillin-resistenter pLW9-G-Klone. DNA-Fragmente nach Behandlung mit den Restriktionsendonukleasen MluI und NruI und Auftrennung im 1%igen Agarosegel. Sichtbar sind die erwarteten Banden bei richtiger Orientierung des inserierten BRSV-G-Gens in der Größe von zirka 1400 bp und 4600 bp und von 1000 bp und 5000 bp bei falscher Orientierung). Pl = Ausgangsplasmid pLW9; 1/2 und 1/3 = pLW9-G-Klone 1/2 und 1/3; 1/7 und 1/8 = pLW9-G-Klone 1/7 und 1/8 mit, in falscher Orientierung inseriertem G-Gen, LS = Längenstandard.

4.1.2.1.2 Aufarbeitung der Plasmide pLW9-G und pVIΔhrP7.5-sP zur Herstellung des Vektorplasmides pVIΔhrPmH5-BRSV-G

Zur weiteren Klonierung des Vacciniavirus Vektorplasmides, erfolgte die Behandlung des unter 4.1.2.1 hergestellten Plasmides pLW9-G mit den Restriktionsendonukleasen KpnI und PstI. Dabei konnte die BRSV-G-Gensequenz zusammen mit dem modifizierten Vacciniapromotor PmH5 aus dem Plasmid pLW9-G isoliert werden (siehe Abbildung 25). Das Vektorplasmid pVIΔhrP7.5-sP wurde mit den Restriktionsendonukleasen AscI und NotI linearisiert, hierbei konnten gleichzeitig die beiden enthaltenen Promotoren P7.5 und sP

entfernt. Die resultierenden DNA-Fragmente wurden durch Agarosegel-Elektrophorese (siehe Abbildung 26) aufgereinigt.

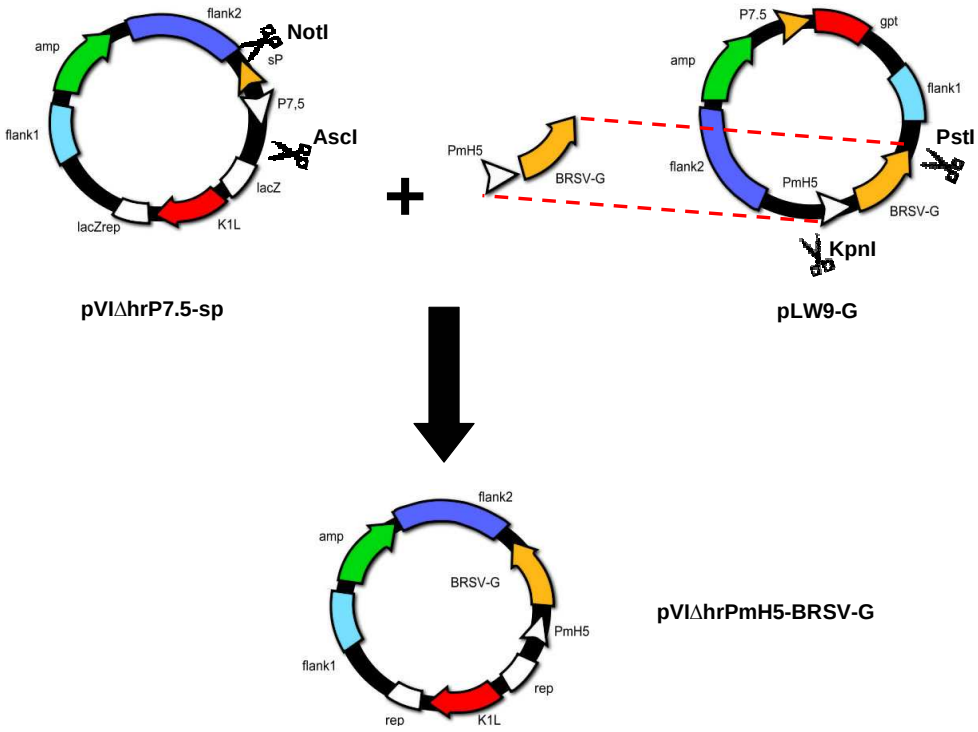


Abbildung 25: Schema zur Klonierung des Vektorplasmides pVIΔhrPmH5-BRSV-G.

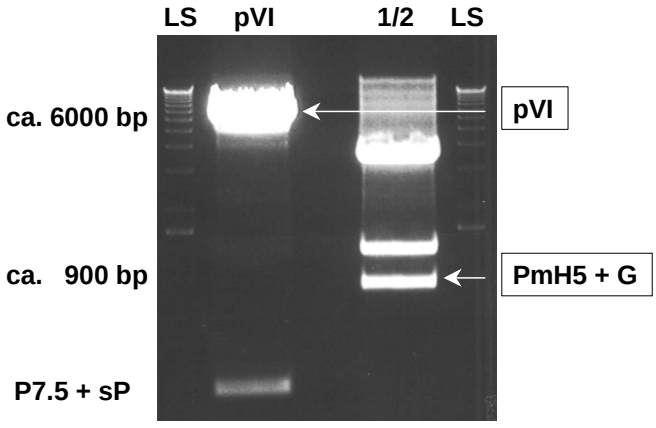


Abbildung 26: Isolierung der BRSV-G-Gensequenz und des linearisierten Vektors pVIΔhr. Gezeigt sind die DNA-Fragmente nach Auftrennung im 1%igen Agarosegel. Sichtbar sind das DNA-Fragment von 6000 bp für das linearisierte MVA-Vektorplasmid pVIΔhr nach dem Ausschneiden der beiden Promotoren p7.5 und sP, sowie das zirka 900 bp große DNA-Fragment, spezifisch für das G-Gen zusammen mit dem Vacciniapromotor PmH5. LS = Längenstandard, pVI = MVA-Vektorplasmid pVIΔhrP7.5-sP, 1/2 = pLW9-G-Klon 1/2.

Nach Transformation und Anzucht auf LB-Platten (Amp^+), konnten 24 Ampicillin-resistente Bakterienkolonien isoliert und für die analytischen Plasmidisolierung (siehe 3.2.1.1.1) verwendet werden. Mit der gewonnenen DNA erfolgte eine Behandlung mit der Restriktionsendonuklease NheI, wobei zur Kontrolle gleichzeitig das Ausgangsplasmid pVIΔhrP7.5-sP mit derselben Restriktionsendonuklease behandelt wurde. Nach Auftrennung im Agarosegel konnten zwei positive Klone (S3 und S8) mit den Banden von 5413 und 1385 bp bei richtiger Orientierung des inserierten BRSV-G-Gens zusammen mit dem Promotor mH5 identifiziert werden (siehe Abbildung 27). Die Amplifikation der DNA des Vektorplasmides pVIΔhrPmH5-BRSV-G-Klon S8 erfolgte in einer präparativen Plasmidisolierung und die Reinheit des Isolats S8 konnte durch die Behandlung mit der Restriktionsendonuklease NheI nochmals bestätigt werden (siehe Abbildung 27). Die Übereinstimmung der klonierten BRSV-G-Gensequenz zusammen mit dem Vacciniapromotor PmH5 mit der bekannten Sequenz (KUHNLE et al. 1998), konnte durch Sequenzierung bestätigt. Nach Bestimmung der Sequenz wurde das Vektorplasmid pVIΔhrPmH5-BRSV-G zur Herstellung des MVA-BRSV-G benutzt (siehe 4.1.3)

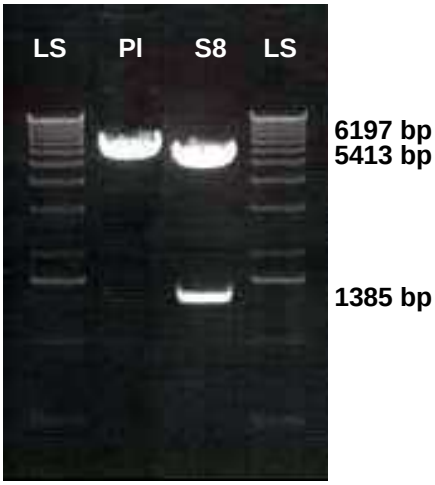


Abbildung 27: Überprüfung des Plasmides pVIΔHR-PmH5-BRSV-G-Klon S8 mit der Restriktionsendonuklease NheI. Die Banden der Größe von 5413 und 804 bp bei richtiger Orientierung des inserierten BRSV-G zusammen mit dem Vacciniapromotor PmH5 sind deutlich sichtbar. Pl = Vektorplasmid pVIΔhrP7.5-sP; S8 = pVIΔhr-PmH5-BRSV-G.

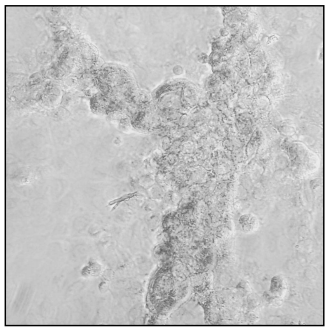
4.1.3 Herstellung von MVA-BRSV-F und MVA-BRSV-G durch homologe Rekombination

Der Einsatz der Vektorplasmide pIIIdhrP7.5-BRSV-F (siehe 4.1.1) und pVIΔhrPmH5-BRSV-G (siehe 4.1.2) für die Transfektion erlaubte die eigentliche Herstellung von MVA-BRSV-F und MVA-BRSV-G.

4.1.3.1 Transfektion, transiente Wirtsselektion, Überprüfung rekombinanter Virusklone und anschließende Entfernung des K1L-Markergens

Die Herstellung rekombinanter MVA, welche die BRSV-Oberflächenproteine F und G exprimieren, erforderte die Durchführung einer Transfektion auf MVA-infizierten HEF-oder

BHK-Zellen mit dem Plasmid pIIIdhrP7.5-BRSV-F-Klon 5/3 (siehe 4.1.1). Dieses Plasmid enthält MVA-Gensequenzen, welche die Deletion III flankieren und somit die Insertion des BRSV-F-Gens unter der Kontrolle des Vacciniapromotors P7.5 in die Deletion III ermöglicht.
Das Ausplattieren des im Transfektionsansatz gewonnen Virusmaterials erlaubte die Isolierung rekombinanter Viren nach bereits einer Passage auf RK13-Zellmonolayern (Einschichtzellkulturen, siehe Abbildung 28, vgl. 3.2.3.1.4).



400 x

Abbildung 28: Aggregate von RK13-Zellen nach Infektion mit MVA-BRSV-F. Durch die transiente K1L-Genexpression können rekombinante MVA auf RK13-Zellen wachsen und bilden typischen Zellhaufen. Oben dargestellt ist ein Zellaggregat nach Infektion von RK13-Zellen mit MVA-BRSV-F in der 3. Passage, bei 400facher Vergrößerung.

Nach der 3. Passage in HEF-Zellen erfolgte, eine Amplifikation zur DNA-Gewinnung (siehe 3.2.3.1.5). Die extrahierte DNA der einzelnen Klone ermöglichte die genetische Überprüfung der Klone mittels PCR-Analyse. Diese wurde bei den MVA-BRSV-F-Isolaten mit Oligonukleotiden zur Detektion der Deletion III (siehe 3.1.5.1.1) durchgeführt.
In Abbildung 29 ist schematisch dargestellt, welche DNA-Fragmentgrößen mit Oligonukleotiden, die spezifisch für den Genombereich der Deletion III (siehe 3.1.5.1.1) sind, in der PCR-Analyse amplifiziert werden können. Die „leere“ Deletionsstelle III im MVAwt-Genom, d.h. ohne Insertion, ergibt mit diesen Oligonukleotiden eine Bande von zirka 700 bp (siehe Abbildung 31). Ist das Fremdgen zusammen mit dem K1L-Markergen in der Deletion III inseriert, erhält man ein entsprechend größeres PCR-Produkt (siehe Abbildung 31), welches sich aus den 800 bp der flanks der Deletion III zusammen mit dem Fremdgen (BRSV-F, mit ca. 1400 bp), dem Vacciniapromotor, den beiden rep („repetitiven Gensequenzen“) und dem K1L-Markergen ergibt. Im Fall von MVA-BRSV-F ist diese Bande zirka 3700 bp groß. Nach intragenomischer Rekombination zwischen den beiden repetitiven Gensequenzen, kann eine knapp 1000 bis 1200 bp kleinere Bande bei der PCR-Analyse mit den Deletions-Oligonukleotiden, von zirka 2600 bp, nachgewiesen werden.

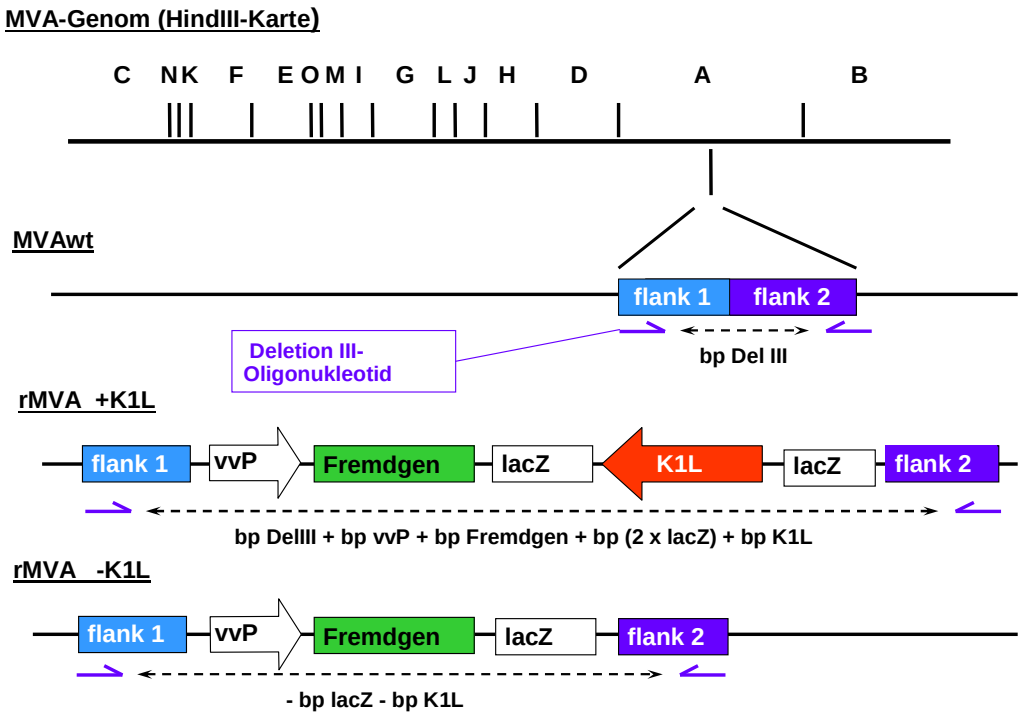


Abbildung 29: Schematische Darstellung der verschiedenen PCR-Amplifikationsprodukte bei der genetischen Überprüfung rekombinanter MVA. Oben ist die HindIII-Karte des MVA-Genoms dargestellt. Darunter ist, hier als Beispiel die Deletion III im MVAwt, mit ihren flankierenden Gensequenzen (flank 1 und flank 2) gezeigt Einzelheiten siehe Text oben. rep = repetitive Gensequenzen, bp= Basenpaare.

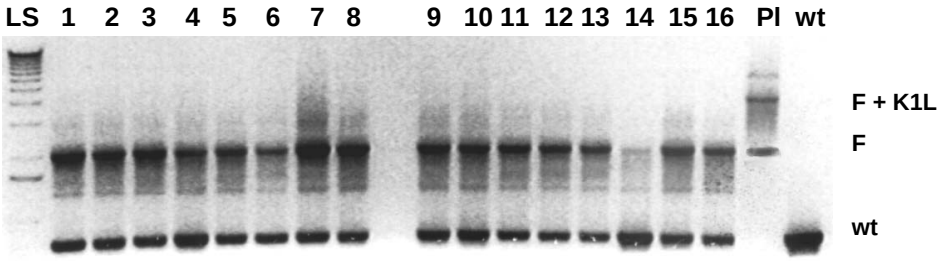


Abbildung 30: Deletion III-spezifische PCR-Untersuchung der DNA verschiedener MVA-BRSV-F-Klone nach der 3. Passage auf RK13-Zellen. Dargestellt ist die Auftrennung Deletion III-spezifischer PCR-Produkte nach Elektrophorese im Agarosegel. Das PCR-Produkt in der Größe von zirka 3700 bp, welches spezifisch für das F-Gen zusammen mit dem K1L-Markergen ist und das 700 bp große Fragment für die „leere Deletion“ des MVAwt.1 bis 16 = verschiedene MVA-BRSV-F-Klone der 3. Passage auf RK13-Zellen, Pl = Vektorplasmid pIIIdhrP7.5-BRSV-F, wt = MVAwt.

Die erfolgreiche klonale Isolierung des MVA-BRSV-F bestätigte die PCR-Analyse der DNA einiger Klone nach der 10. Passage auf RK13-Zellen. Der Grossteil der Klone zeigte das entsprechende DNA-Fragment für das F-Gen und die Abwesenheit einer MVAwt-spezifischen Bande (siehe Abbildung 31).

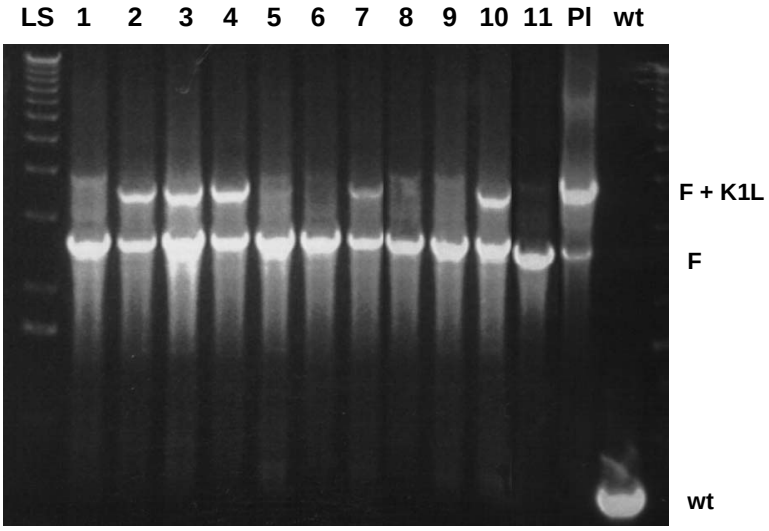


Abbildung 31: Del III-spezifische PCR-Analyse der DNA verschiedener MVA-BRSV-F-Klone nach der 10. Passage auf RK13-Zellen. Dargestellt ist die Auftrennung der PCR-Produkte nach Elektrophorese im Agarosegel. Unten rechts sichtbar ist die spezifische Bande von zirka 700 bp für das MVAwt (= „leere Deletion"). Bei den Klonen 1 bis 11 ist das spezifische Produkt für das F-Gen in der Deletion III von zirka 2700 bp und kein MVAwt-spezifisches PCR-Produkt mehr amplifizierbar. 1 bis 11 = verschiedene MVA-BRSV-F-Klone der 10. Passage auf RK13-Zellen, Pl = Plasmid pIIIdhrP7.5-BRSV-F, wt = MVAwt.

Zur weiteren Überprüfung erfolgte eine PCR-Analyse mit Oligonukleotiden zur Detektion des K1L-Markergens (siehe 3.1.5.2 und Abbildung 32), hierbei ergibt sich ein PCR-Fragment in der Größe von zirka 300 bp.

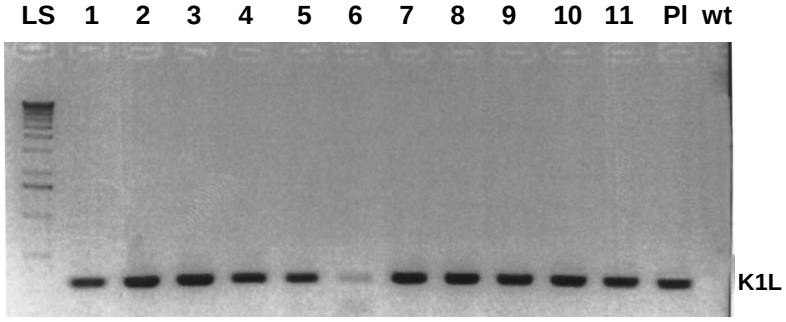


Abbildung 32: K1L-spezifische PCR-Untersuchung der DNA verschiedener MVA-BRSV-F-Klone nach der 10. Passage auf RK13-Zellen. Dargestellt ist die Auftrennung der PCR-Produkte nach Elektrophorese im Agarosegel derselben Klone aus der 10. Passage auf RK13-Zellen wie in Abbildung 31. Bei allen Klonen (1 bis 11) ist das zirka 300 bp große K1L-spezifische DNA-Fragment amplifizierbar. Klon 6 zeigt nur noch eine schwache K1L-spezifische Bande. Legende siehe Abbildung 31.

Um das K1L-Markergen, welches durch repetitive Gensequenzen nur transient in das MVA-Genom eingebracht wurde, deletieren zu können, erfolgte die weitere Passagierung der rekombinanten MVA-Isolate auf BHK- und HEF-Zellen. Nach der 6. Passage auf BHK-Zellen konnte in der PCR-Analyse weiterhin das spezifische PCR-Produkt für das K1L-Gen nachgewiesen werden. Weitere Passagen erfolgten auf HEF-Zellen unter Agaroseüberschichtung. Nach der 2. Passage auf HEF-Zellen konnte nur noch eine sehr schwache Bande für das spezifische K1L-PCR-Produkt bei den beiden untersuchten Klonen 1 und 2 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 33).

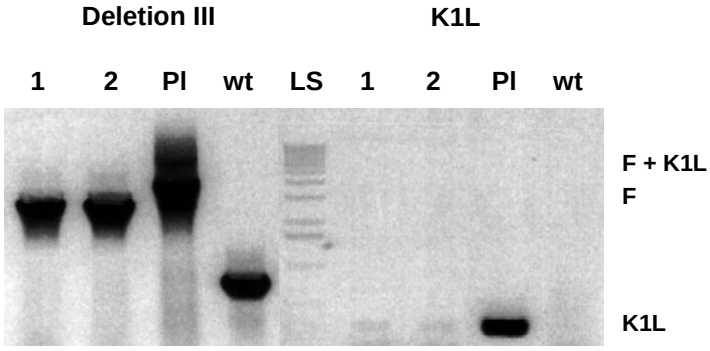


Abbildung 33: PCR-Untersuchung aus DNA-Proben von MVA-BRSV-F-Klonen aus der 2. Passage auf HEF-Zellen nach Auftrennung im Agarosegel. Del III- und K1L-spezifische PCR-Untersuchung zeigt die zirka 300 bp große spezifische Bande für das K1L-Gen (rechte Seite) ist beim Plasmid deutlich sichtbar und bei den beiden Klonen nur noch schwach auszumachen.

Abbildung 34 zeigt das Ergebnis der PCR-Untersuchung nach einer weiteren Passage auf HEF-Zellen unter Agaroseüberschichtung, hierbei konnte bei keinem der untersuchten Klone ein spezifisches K1L-PCR-Produkt nachgewiesen werden. Der MVA-BRSV-F-Klon Nr. 10 wurde zur Amplifikation von Virusstocks ausgewählt.

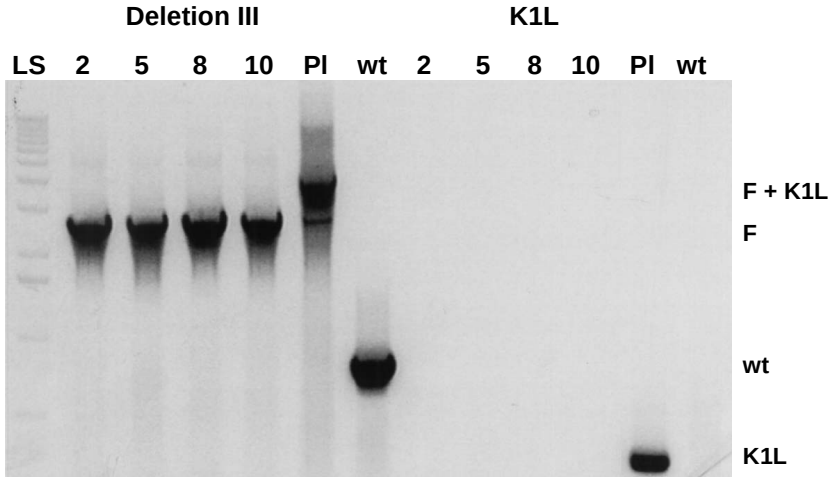


Abbildung 34: PCR-Untersuchung der DNA vier verschiedener MVA-BRSV-F-Klone nach der 3. Passage auf HEF-Zellen unter Agaroseüberschichtung. Die Vermehrung von K1L-spezifischen Oligonukleotiden erlaubte nur noch die Amplifikation einer zirka 300 bp große Bande bei der Plasmidkontrolle (Pl).

Zur Herstellung von MVA-BRSV-G wurde zur Transfektion das Plasmid pVIΔhr-PmH5-BRSV-G-Klon 1/2 (siehe 4.1.2) benutzt, um das synthetische BRSV-G-Gen unter der Kontrolle des modifizierten Vacciniapromotors PmH5 in die Deletion VI des MVA-Genoms inserieren zu können. Die Klonierung erfolgte analog zu der Herstellung von MVA-BRSV-F. Die Überprüfung gewonnener Isolate erfolgte erstmals nach der 3. RK13-Passage durch PCR-Untersuchung mit Oligonukleotiden zur Detektion der Deletion VI (siehe 3.1.5.1.2). Die mit der DNA der MVA-BRSV-G-Klone amplifizierbaren PCR-Produkte für die Deletion VI ergeben sich nach demselben Schema wie in Abbildung 29 auf Seite 81 dargestellt. Die „leere“ Deletion IV im MVAwt-Genom, d.h. die Deletion VI ohne Insertion, ergibt mit diesen Oligonukleotiden eine Bande von zirka 400 bp. Ist das Fremdgen zusammen mit dem K1L-Markergen in der Deletion VI inseriert, erhält man ein entsprechend größeres PCR-Produkt, welches sich aus den 400 bp der flanks der Deletion VI, mit dem Fremdgen (BRSV-G, mit ca. 850 bp), dem Vacciniapromotor, den beiden rep („repetitiven Gensequenzen“) und dem K1L-Markergen zusammensetzt. Im Fall von MVA-BRSV-G ist diese Bande zirka 2700 bp groß. Nach intragenomischer Rekombination zwischen den beiden repetitiven Gensequenzen, kann eine knapp 1000 bis 1200 bp kleinere Bande bei der PCR-Analyse mit den Deletions-Oligonukleotiden, von zirka 1350 bp, amplifiziert werden.

Nach der 5. Passage auf RK13-Zellen konnte für einige der MVA-BRSV-G-Klone anhand der PCR-Analyse, die erwartete Bande für das inserierte G-Gen und die Abwesenheit der MVAwt-Bande, nachgewiesen werden (siehe Abbildung 35).

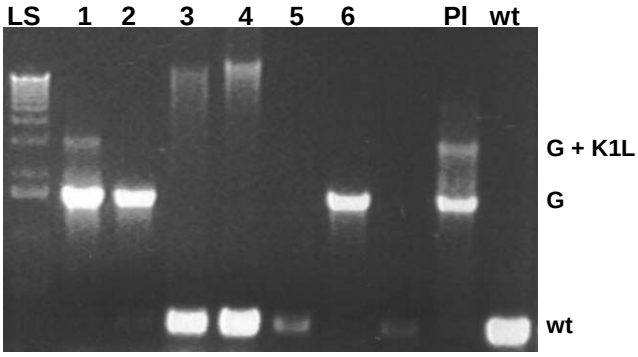


Abbildung 35: PCR-Untersuchung der Deletion VI verschiedener MVA-BRSV-G-Klone aus der 5. Passage auf RK13-Zellen. Dargestellt sind die PCR-Produkte nach Auftrennung im Agarosegel. Sichtbar ist nur noch die spezifische Bande für das G-Gen in der Deletion VI, aber keine MVAwt-spezifische Bande. Beim Plasmid, wie auch beim Klon 1 ist zusätzlich die größere spezifische Bande für das G-Gen, zusammen mit dem K1L-Gen erkennbar. LS = Längenstandard, 1 bis 6 = verschiedene MVA-BRSV-G-Klone der 3. Passage auf RK13-Zellen, Pl = Plasmid pVIΔhrPmH5-BRSV-G, wt = MVAwt.

Zur Entfernung des transienten K1L-Markers erfolgten, analog wie bei der Herstellung von MVA-BRSV-F, Passagen auf HEF-Zellen mit Agaroseüberschichtung (siehe 3.2.3.1.6 auf Seite 61). Die Überprüfung der erfolgreichen Deletion des K1L-Markergens der erhaltenen Klone erfolgte nach jeder Passage durch PCR-Analyse. In Abbildung 36 zeigt die PCR-Untersuchung nach der vierten Passage auf HEF-Zellen keine K1L-spezifische Bande für die meisten MVA-BRSV-G-Isolate nachgewiesen werden.

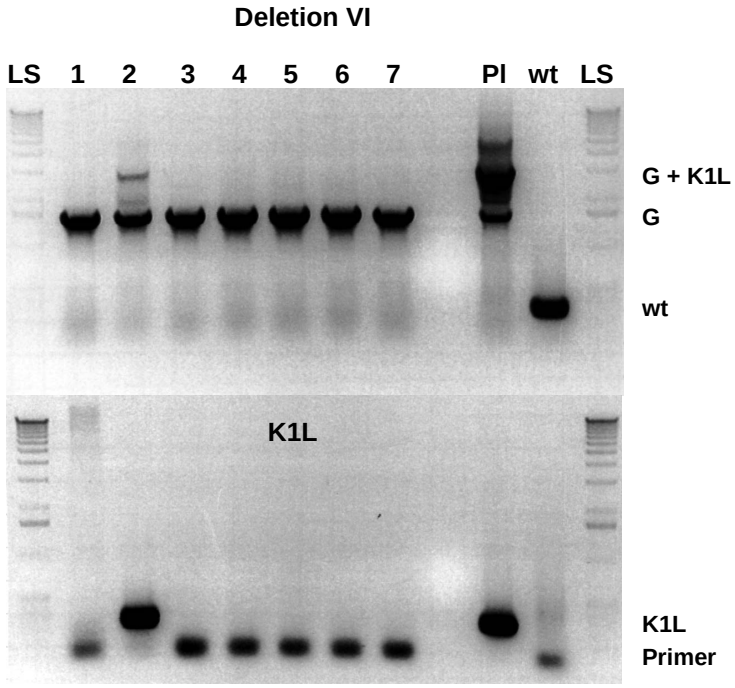


Abbildung 36: PCR-Analyse mit spezifischen Oligonukleotiden viraler DNA verschiedener MVA-BRSV-G-Klone aus der 4. Passage auf HEF-Zellen. Oben dargestellt sind die Bande der Deletion VI-spezifischen PCR nach Auftrennung auf einem 1%igen Agarosegel. Unten ist die K1L-spezifische PCR nach Agarosegel Auftrennung dargestellt. Eine K1L-spezifische Bande ist nur noch bei Klon 2 und der Plasmidkontrolle (Pl) nachweisbar. Legende siehe Abbildung 35.

Nach zwei weiteren Passagen auf HEF-Zellen erfolgte eine weitere PCR-Untersuchung der DNA der gewonnenen Klone. Abbildung 37 zeigt, dass bei allen Klonen keine K1L-spezifisches PCR-Produkt, aber das spezifische PCR-Produkt für das inserierte BRSV-G-Gen amplifizierbar ist.

Zur Amplifikation eines Primärstocks wurde der Klon MVA-BRSV-G Nr.1 ausgewählt und verwendet.

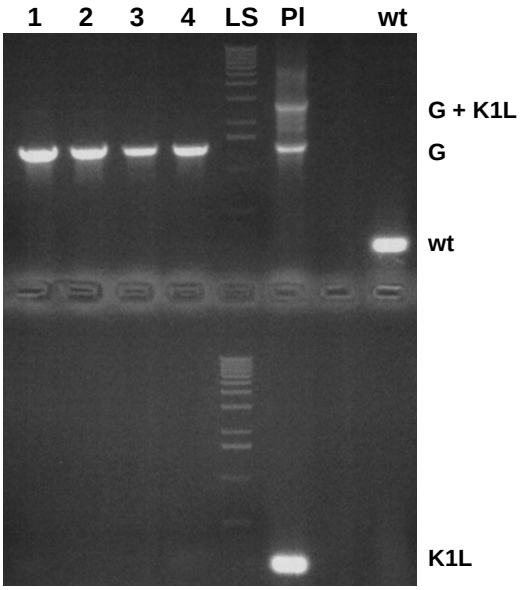


Abbildung 37: PCR-Analyse der DNA vier ausgewählter Klone nach 6 Klonierungspassagen auf HEF-Zellen. Bei allen MVA-BRSV-G-Klonen ist keine K1L-spezifische Bande mehr sichtbar und auch die Deletion VI-spezifische PCR ergibt die spezifische Bande für das G-Gen in der Deletion VI. Legende siehe Abbildung 35.

4.1.3.2 Amplifikation von MVA-BRSV-F und MVA-BRSV-G

Nach der erfolgreichen Deletion des K1L-Markers und der wiederholten Überprüfung der Klone durch PCR konnten jeweils der Klon F Nr. 10 für MVA-BRSV-F und der Klon G Nr. 1 für MVA-BRSV-G ausgewählt und nach dem Schema in Abbildung 16 (siehe Seite 62) zu Virus-Arbeitsstocks amplifiziert werden. Die Herstellung, Überprüfung und Titration der Virusstocks erfolgte wie in den Kapiteln 3.2.3.1.8 und 3.2.3.1.9. beschrieben (siehe Seite 62/63).

4.1.4 Virologische Charakterisierung von MVA-BRSV-F und G

Die virologische Charakterisierung rekombinanter MVA beinhaltet die Überprüfung der korrekten Insertion der Fremdgene und der genetischen Stabilität der amplifizierten Virusstocks mittels PCR-Analyse, die Überprüfung der Expression der Fremdgene durch die rekombinanten MVA mit Hilfe von spezifischen Antikörpern und verschiedenen proteinanalytischen Methoden, sowie Wachstumsuntersuchungen im Vergleich zum MVAwt. Letztere werden durchgeführt um eventuelle Auswirkungen des Einbringens von Fremdgenen in das MVA-Genom auf das Wachstumsverhalten der rekombinanten Viren zu überprüfen.

4.1.4.1 MVA-BRSV-F und –G Virusstocks sind genetisch stabil und die BRSV-Gene sind korrekt inseriert

Zur Qualitätsbeurteilung der Virusstocks wurden die korrekte Insertion und die genetische Stabilität der inserierten rekombinanten Gene im MVA-Genom nach der Amplifikation überprüft. Zu diesem Zweck wurde eine für die jeweilige Insertionsstelle im MVA-Genom spezifische PCR durchgeführt (siehe Schema Abbildung 29, Seite 81).

Die PCR-Untersuchung für MVA-BRSV-F erfolgte mit Oligonukleotiden zur Detektion der Deletion III und des K1L-Markergens (siehe 3.1.5.1.1, Seite 37). Die PCR-Fragmentgrößen ergeben sich aus dem Schema in Abbildung 29 (siehe Seite 81). Diese Überprüfung der viralen DNA des Arbeitsstocks von MVA-BRSV-F bestätigte die erfolgreiche Deletion des Markergens K1L und die Insertion des BRSV-F-Gens in die Deletion III, durch die spezifische Amplifikation eines 2700 bp DNA-Fragmentes (Abbildung 38).

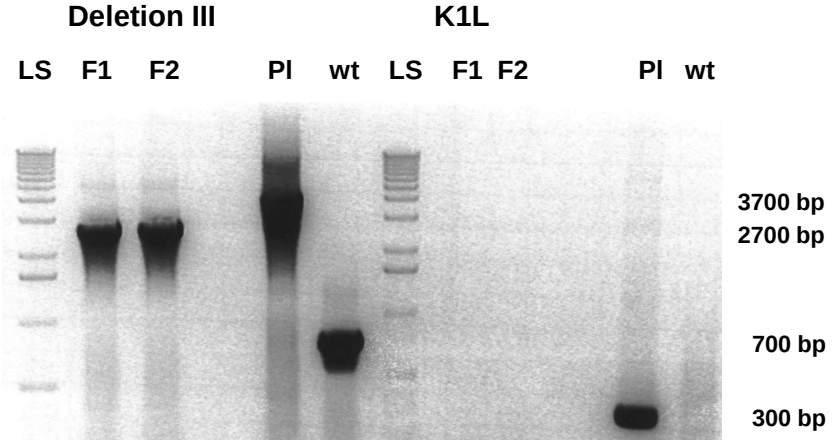


Abbildung 38: PCR-Analyse des Virusstocks von MVA-BRSV-F mit Oligonukleotiden zur Detektion der Deletion III und K1L. F1 und F2 stellen jeweils die DNA aus einem Arbeitsstock und einer Impfstoffpräparation dar. Als Negativkontrolle (-) wurde MVAwt benutzt, als Positivkontrolle (+) das Vektorplasmid pIIIdhrP7.5-BRSV-F. Details siehe Text oben.

Die PCR-Untersuchung von MVA-BRSV-G erfolgte mit Oligonukleotiden zur Detektion der Deletion VI und des K1L-Markergens (siehe 3.1.5.1.2), da das G-Gen hier in die Deletion VI des MVA-Genoms inseriert wurde. Auch bei dieser Analyse der viralen DNA des Arbeitstocks konnte durch die Amplifikation eines spezifischen 2700 bp DNA-Fragmentes, die erfolgreiche Insertion des BRSV-G-Gen in der Deletion VI und durch das Fehlen eines spezifischen K1L-Fragmentes, die Deletion des K1L-Markergens bestätigt werden.

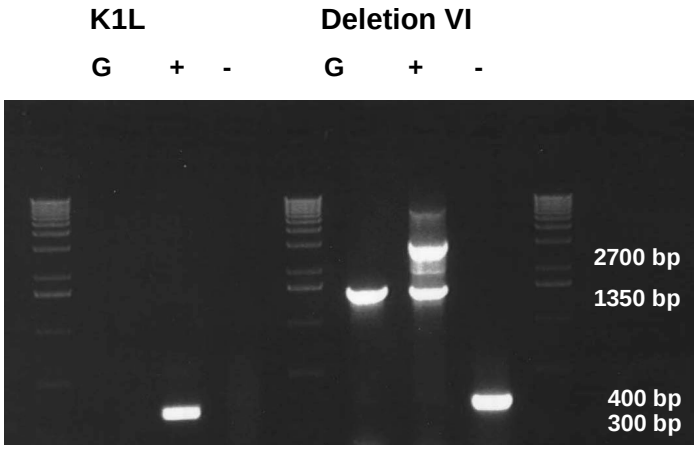


Abbildung 39: PCR-Untersuchung des Virusstocks von MVA-BRSV-G mit Oligonukleotiden zur Detektion der Deletion VI und K1L. Dargestellt sind hier als G, die DNA eines Arbeitsstocks von MVA-BRSV-G, als Negativkontrolle (-) wurde DNA von MVAwt benutzt und als Positivkontrolle Vektorplasmid DNA von pVIΔhrPmH5-BRSV-G. Details siehe im Text oben.

Zusammenfassend zeigen Abbildung 38 und Abbildung 39, dass bei der PCR-Analyse der viralen DNA von MVA-BRSV-F- und –G-Virusstocks mit Deletions-spezifischen Oligonukleotiden, die korrekten Banden für die jeweils inserierten Gene an der Insertionsstelle amplifizierbar waren und somit auch die genetische Stabilität der rekombinanten Viren nachgewiesen wurde. Weiterhin konnte die Abwesenheit des transienten K1L-Markergens bestätigt werden.

4.1.4.2 Überprüfung der Expression der rekombinanten Proteine

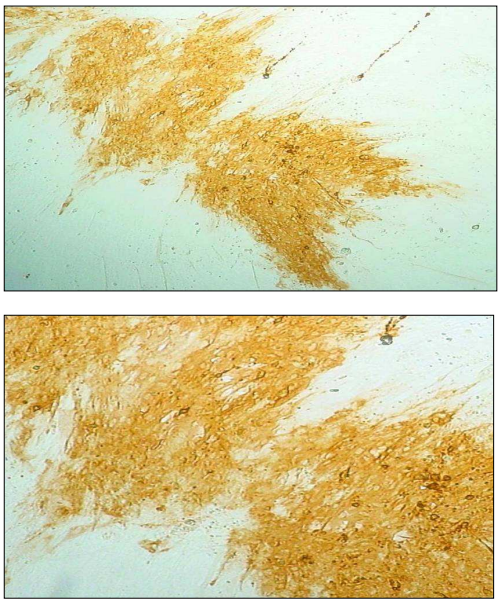
Die virologische Charakterisierung rekombinanter MVA beinhaltet auch den Nachweis der Expression der Fremdgene. Damit soll überprüft werden ob die genetisch stabilen rekombinanten MVA, entsprechend der Erwartung das Fremdgen korrekt transkribieren, die mRNA translatieren und das Zielprotein prozessieren.

4.1.4.2.1 Nachweis der Fremdgenexpression durch Immunfärbung infizierter Zellen

Ein einfacher Expressionsnachweis inserierter Fremdgene stellt die Immunfärbung infizierter Zellen dar.

Infizierte und Fremdgen-exprimierende Zellen, stellen sich als braun gefärbte Infektionsherde oder Foci dar (siehe 3.2.3.1.8 auf Seite 62). Der Nachweis der Expression des F-Proteins erfolgte in MVA-BRSV-F-infizierten Zellen mit Hilfe des monoklonalen Anti-F-Antikörpers (mAb3 siehe 3.1.7.2 auf Seite 41) und der Expression des G-Proteins in MVA-BRSV-G-infizierten Zellen mittels des Anti-G-Antikörpers (mAb20, siehe 3.1.7.3 auf Seite 41). Beide Antikörper wurden jeweils in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. Abbildung 40 und Abbildung 41 zeigen den infizierten HEF-Zellmonolayer (Einschichtzellkultur) nach Immunfärbung. Die braunen Areale stellen MVA-BRSV-F- bzw. MVA-BRSV-G-infizierte Zellfoci dar, welche sich durch die Expression von BRSV-F- bzw.

BRSV-G-Protein und den Nachweis mittels spezifischer monoklonaler Antikörper (mAb3 bzw. mAb20) braun darstellen. Als Negativkontrolle diente eine reaktionslose Immunfärbung von MVAwt-infizierten Zellen mit den jeweiligen monoklonalen Antikörpern.



100 x

400 x

Abbildung 40: Immunfärbung mit monoklonalem Anti-F-Antikörper. Der mit MVA-BRSV-F infizierte HEF-Zelleinschichtrasen wurde nach 48 Stunden fixiert. Die Immunfärbung erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen das BRSV-F-Protein (mAb3) in der Verdünnung 1.1000 und Anti-Maus Peroxidase-gekoppeltem Antikörper, als Sekundärantikörper, in derselben Verdünnung. Als Substrat wurde eine gesättigte Dianisidine-Lösung verwendet. Die Abbildung oben stellt einen MVA-BRSV-F-Focus auf HEF-Zellen bei 100facher Vergrößerung dar. Darunter ist derselbe Infektionsherd bei 400facher Vergrößerung dargestellt.

Die Immunfärbung ermöglichte den einfachen Nachweis der Produktion des BRSV-F, wie auch des BRSV-G-Proteins. Auffällig war bei dieser Untersuchung allerdings der Phänotyp der MVA-BRSV-G-Foci auf HEF-Zellen (siehe Abbildung 41). Diese Foci stellten sich, im Vergleich zu denen von MVAwt und MVA-BRSV-F, als sehr klein dar (siehe Abbildung 40).

100 x

400 x

Abbildung 41: Immunfärbung mit monoklonalem Anti-G-Antikörper. Der mit MVA-BRSV-G infizierte HEF-Zelleinschichtrasen wurde nach 48 Stunden fixiert. Die Immunfärbung erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen das BRSV-G-Protein (mAb20) in der Verdünnung 1.1000 und Anti-Maus Peroxidase-gekoppeltem Antikörper, als Sekundärantikörper, in derselben Verdünnung. Als Substrat wurde eine gesättigte Dianisidine-Lösung verwendet. Die Abbildung oben stellt einen MVA-BRSV-G-Focus auf HEF-Zellen bei 100facher Vergrößerung dar. Darunter ist derselbe Focus bei 400facher Vergrößerung dargestellt.

4.1.4.2.2 Nachweis der Expression von Protein G nach Infektion von HEF-Zellen mit MVA-BRSV-G im Western-Blot

Die Western-Blot-Analyse erlaubte zusätzlich eine quantitative Aussage zum Nachweis der Expression des inserierten BRSV-G-Gens, sowie eine genauere Überprüfung der molekularen Struktur. Zur Detektion des exprimierten G-Proteins wurde der monoklonale Antikörper mAb 20 (LANGEDIJK et al. 1996a) (siehe 3.1.7.3) verwendet. Der Pfeil in Abbildung 42 markiert die zirka 69 kDa große Bande für das G-Protein, diese Größe entspricht der glykosylierten Form des G-Proteins. Zusätzlich sind weitere Banden von zirka 38, 31 und 28 kDa zu erkennen, welche unglykosylierte Formen des G-Proteins darstellen könnten (KUHNLE et al. 1998).

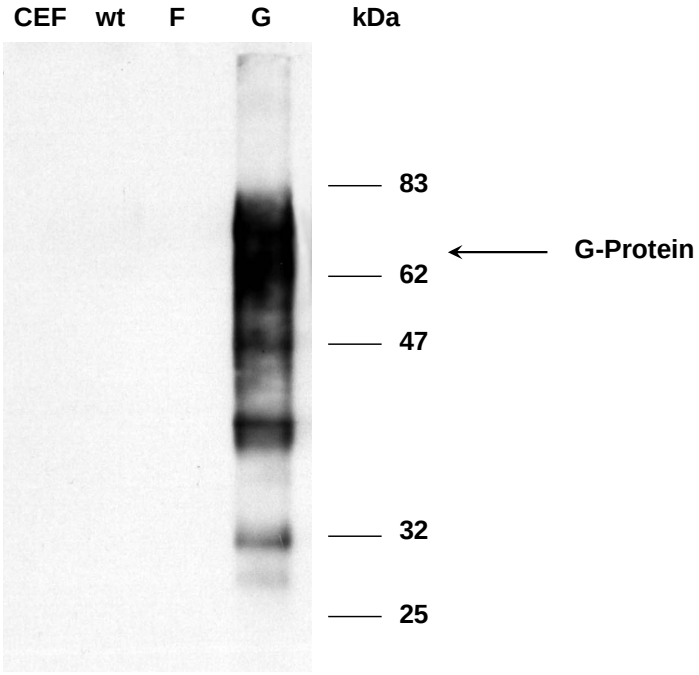


Abbildung 42: Western-Blot-Analyse von Proteinlysaten aus MVA-BRSV-G-infizierten HEF-Zellen. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 10% SDS-Polyacrylamid-Gel. Der mAb20, ein monoklonaler Antikörper gegen das BRSV-G, wurde im Verhältnis 1:000 und als Sekundärantikörper, Anti-Maus-PO, in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt. Die Detektion erfolgte über Chemolumineszenz. Der Pfeil markiert die zirka 69 kDa große Bande für das BRSV-G-Protein. HEF = HEF-Zellkontrolle, uninfizierte Zellen, wt = MVAwt-infizierte HEF-Zellen, F = MVA-BRSV-F-infizierte HEF-Zellen, G = MVA-BRSV-G-infizierte HEF-Zellen.

4.1.4.2.3 Zunahme der Protein G-Expression im zeitlichen Verlauf nach Infektion von HEF-Zellen mit MVA-BRSV-G

Um die zeitliche Zunahme des G-Proteins nach Infektion von HEF-Zellen mit MVA-BRSV-G darstellen zu können wurde zusätzlich eine Proteinkinetik durchgeführt, d.h. zu verschiedenen Zeitpunkten geerntete Proteinlysaten infizierter Zellen gleicher Konzentration wurden in einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und der Western-Blot-Analyse unterzogen (siehe 3.2.2.2). In Abbildung 43 sind die 69 kDa spezifische Bande des Protein G und kleinere unglykosylierten Banden erkennbar. Eine Zunahme des exprimierten G-Proteins während der Infektion ist deutlich zu erkennen.

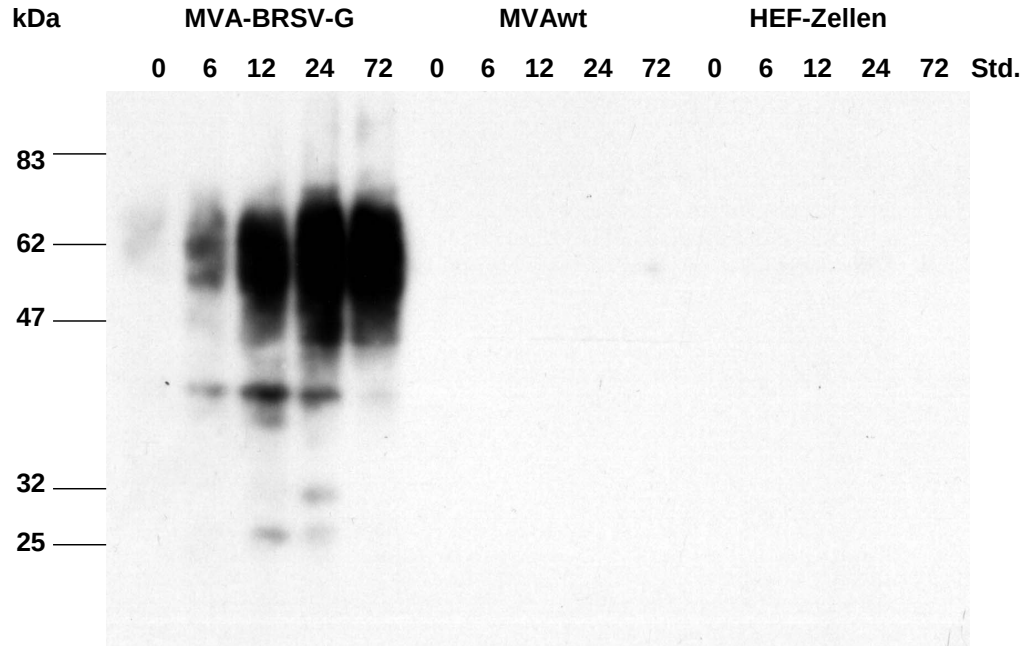


Abbildung 43: Western-Blot-Analyse der Proteinlysate der Kinetik von MVA-BRSV-G-infizierten HEF-Zellen. MVA-BRSV-G-infizierte HEF-Zellen wurden jeweils nach 0, 6, 12, 24 und 72 Stunden geerntet. Zur Negativkontrollen wurden MVAwt-infizierte HEF-Zellen und die Zellen allein zu denselben Zeitpunkten geerntet. Die Proteinmenge der einzelnen Proben wurde bestimmt (siehe 3.2.2.2.2) und jeweils 10 µg Protein auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Detektion der Proteine erfolgte mit Hilfe dem Antikörper mAb 20 in einer Verdünnung von 1:5000 und αmPO 1:10000 durch Chemolumineszenz. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 42.

4.1.4.2.4 Nachweis der Expression des F-Proteins nach Infektion von BHK-Zellen mit MVA-BRSV-F durch radioaktive Markierung

Das Prinzip der radioaktiven Markierung beruht auf dem Einbau von den Schwefel [^{35}S]-haltigen Aminosäuren Methionin und Cystein. Dadurch können die Proteine, welche diese Aminosäuren enthalten, nach Auftrennung auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel durch Fluorographie sichtbar gemacht werden. Das BRSV-F-Protein enthält unter seinen 560 Aminosäuren einen Anteil von 13 Methionin- und 16 Cystein-Molekülen.

Zum Nachweis der Expression des F-Proteins durch MVA-BRSV-F wurden BHK-Zellen infiziert und mit [^{35}S]-haltigem Methionin und Cystein markiert (siehe 3.2.2.3). Als Kontrollen dienten, mit MVAwt-infizierte BHK-Zellen und uninfizierte BHK-Zellen, die auf die gleiche Weise radioaktiv markiert wurden. Das F-Protein wird als F_0-Protein synthetisiert und anschließend in die F_1- und F_2-Untereinheit gespalten, die miteinander über eine Disulfidbrücke verbunden sind (siehe 0). Das F_1-Protein hat eine Größe von zirka 48 kDa und konnte durch die radioaktive Markierung eindeutig nachgewiesen werden (siehe Abbildung 44).

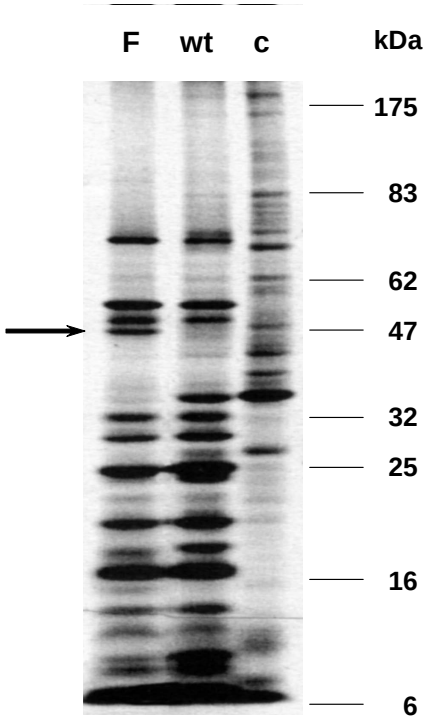


Abbildung 44: [^{35}S]-Methionin- und –Cystein-Markierung infizierter HEF-Zellen nach Infektion mit MVA-BRSV-F und MVAwt. Nach der Infektion wurden die Zellen mit [^{35}S]-markiertem Methionin und Cystein inkubiert, lysiert und in einem 10%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch Fluorographie. Der Pfeil markiert das F_1-Protein. F= MVA-BRSV-F, wt = MVAwt, c = BHK-Zellen.

4.1.4.2.5 Spezifischer Nachweis der Expression des F-Proteins von infizierten HEF-Zellen mit MVA-BRSV-F durch Radioimmunopräzipitation (RIPA)

Um die Spezifität der in 4.1.4.2.4 durch radioaktive Markierung erhaltenen Bande für das F_1-Protein zu bestätigen, erfolgte zusätzlich eine Immunpräzipitation der radioaktiv markierten Proben (= Radioimmunopräzipitation, RIPA, siehe 3.2.2.4) mit dem monoklonalen Anti-BRSV-F-Antikörper (mAb 3, siehe 3.1.7.2, Seite 41 (SCHRIJVER et al. 1997)). Die Gewinnung der Proteinlysate erfolgte in derselben Weise, wie für die [^{35}S]-haltige Methionin- und Cystein-Markierung in 4.1.4.2.4. Mit dem an Protein A Sepharose™ CL-4B *(PAS™, Amersham Bioscience Europe GmbH)* gebundenen mAb 3 konnte die F_1-Protein-spezifische Bande ebenfalls nachgewiesen werden.

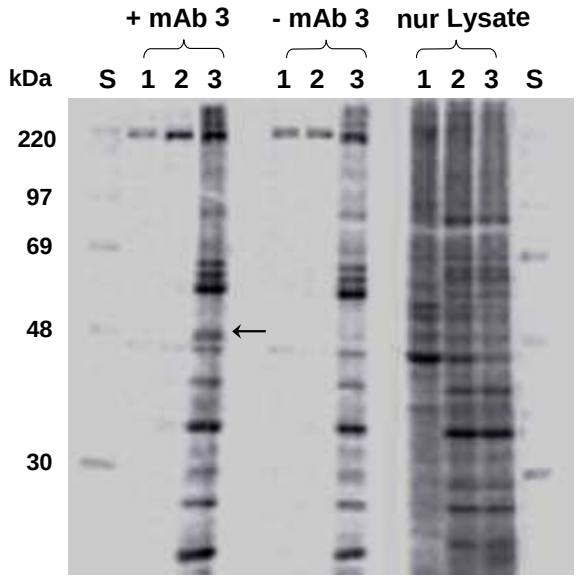


Abbildung 45: Radioimmunopräzipitation des F-Proteins aus Lysaten MVA-BRSV-F-infizierter HEF-Zellen. Die Proben wurden auf einem 10%igem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und die radioaktiven Banden durch Fluorographie sichtbar gemacht. In Abbildung 45 dargestellt, ist das fluorographisch gewonnene Bild des SDS-Polyacrylamid-Gels. Der Pfeil markiert F1-Protein-spezifische Bande. S = [^{14}C]-Marker, 1 = uninfizierte HEF-Zellen, 2 = MVAwt-infizierte HEF-Zellen, 3 = MVA-BRSV-F-infizierte HEF-Zellen, + und –mAb-F = Protein A Sepharose™ CL-4B (*PAS™, Amersham Bioscience Europe GmbH*) wurde mit oder ohne mAb 3 inkubiert.

4.1.4.2.6 Durch MVA-BRSV-F exprimiertes Protein F besitzt Fusionsaktivität

Das F-Protein ist durch seine Fusionsaktivität maßgeblich bei der Virus-Adsorption und dem Eintritt des Virus in die Zelle beteiligt (siehe 2.1.4.1.2 auf Seite 8) Der Nachweis der Funktionalität des von MVA-BRSV-F synthetisierten F-Proteins sollte die korrekte Transkription, Translation und Prozessierung des Fremdgens durch das MVA-Vektorvirus zusätzlich bestätigen.

Das Prinzip dieses Fusionsassays beruht auf dem indirekten Nachweis der Fusion von Zellen durch die Messung der Aktivität des Reporterenzymes Luziferase. In Abbildung 46 ist der Versuchsaufbau schematisch dargestellt. Hierfür wurden die Zellpopulation A mit MVA-BRSV-F oder MVAwt infiziert. Danach erfolgten Transfektion der beiden Zellpopulationen; entweder mit dem Luziferase-Kontrollplasmid (Population A, infiziert, T7Luc, siehe 3.1.6.2.1) oder dem Plasmid pUCIIP7.5-T7Pol (Population B, T7-Pol, siehe 3.1.6.2.2) Das Luziferase-Kontrollplasmid enthält das Luziferase-Gen unter der Kontrolle des T7-Promotors und das Plasmid pUCIIP7.5-T7Pol enthält die T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des Vacciniapromotors P7.5. Nach der Inkubationszeit erfolgte die Trypsinierung der Zellen der Population B und das Zusammenführen mit der Zellpopulation A. Durch die Fusionsaktivität des von MVA-BRSV-F exprimierten Protein F bildeten sich „Synzytien" bzw. „Riesenzellen“ durch die Verschmelzung der beiden Zellpopulation A und B. Durch diese Fusion enthielten die fusionierten Zellen beide Plasmide zusammen mit MVA-BRSV-F. Durch das Vorhandensein des Vaccinia-

Transkriptionsapparates, konnte nun die T7-RNA-Polymerase, welche unter der Kontrolle des Vacciniapromotors P7.5 steht, im Plasmid pT7-Pol transkribiert und translatiert werden. Durch die Bildung der T7-RNA-Polymerase konnte nun auch die Luziferase, die unter der Kontrolle des T7-RNA-Polymerase Promotors steht, transkribiert und translatiert werden. Dieser Vorgang konnte anhand der höheren Luziferase-Aktivität in MVA-BRSV-F-infizierten Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 46).

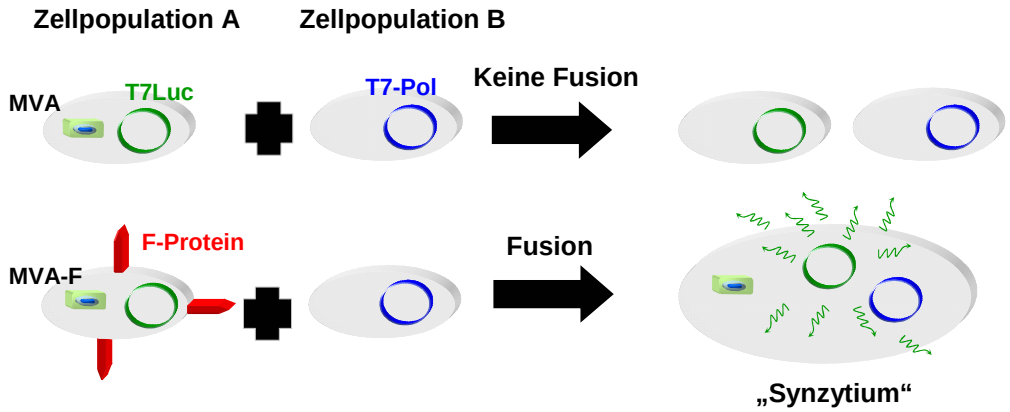


Abbildung 46: Schema zum Fusionsassay. Die Zellpopulation A wird mit MVA-BRSV-F (MVA-F) oder MVAwt infiziert und anschließend mit dem Luziferase-Kontrollplasmid (T7Luc) transfiziert. Die Zellpopulation B wird nur mit dem pUCIIP7.5-T7Pol (T7-Pol) transfiziert. Vier Stunden nach der Transfektion wird die Zellpopulation B trypsiniert, gewaschen und auf die Zellpopulation B gegeben. Wenn es durch Expression des F-Proteins zur Fusion der Zellen kommt, können in einer fusionierten Zelle („Synzytium“) beide Plasmide zusammen mit MVA-BRSV-F vorkommen und das Luziferase-Gen im T7Luc-Plasmid abgelesen werden. Nach Zugabe von Luziferin (Substrat) kann dieses zu Oxyluziferin umgesetzt werden und leuchtet.

In Abbildung 47 ist ersichtlich, dass nach bereits 16 Stunden die Luziferase-Aktivität von MVA-F-infizierten Zellen zirka 5fach und nach 25 Stunden zirka 6fach höher im Vergleich zu MVAwt-infizierten Zellen war. Mit diesem Assay konnte deutlich gezeigt werden, dass das von MVA-BRSV-F exprimierte F-Protein, Fusionsaktivität besitzt.

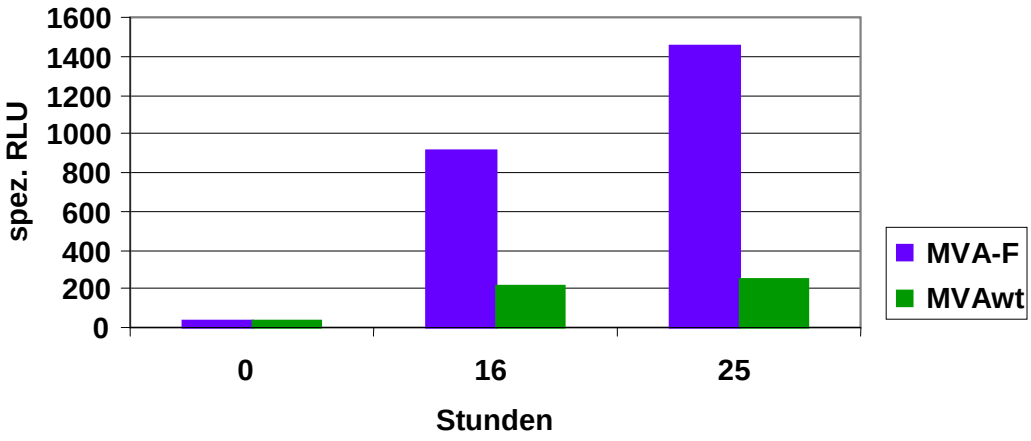


Abbildung 47: Spezifische Luziferase-Aktivität auf HeLa-Zellen. Dargestellt ist hier, eines von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten auf HeLa-Zellen. Die Luziferase-Aktivität in RLU (relative light unit) pro Sekunde wurden auf 1 µg Gesamtprotein normalisiert (= spezifische Luziferase-Aktivität). MVA-BRSV-F (hier vereinfacht MVA-F) ist blau, MVAwt grün dargestellt.

4.1.4.3 Wachstumsverhalten von MVA-BRSV-F und MVA-BRSV-G

Wachstumsuntersuchungen werden zur virologischen Charakterisierung von rekombinanten MVA durchgeführt (siehe 3.2.3.2.2). Sie dienen zur Untersuchung möglicher Auswirkungen der inserierten Fremdgene auf das Wachstumsverhalten von rekombinantem MVA.

Bei der „one step“-Wachstumskurve wird durch die Infektion mit einer hohen MOI (10 pfu pro Zelle) sichergestellt, dass jede Zelle mit mindestens einem Viruspartikel infiziert wird, dadurch kann die Menge neu gebildeter infektiöser Virionen pro infizierter Zelle analysiert werden. Abbildung 48 zeigt die graphische Darstellung der „one step“-Wachstumskurve von MVA-BRSV-F und MVA-BRSV-G im Vergleich zu MVAwt. Mit dem 0-Stundenpunkt konnte die Ausgangsinfektiosität aller drei untersuchten Viren festgestellt werden. Nach 4 Stunden zeigte sich der typische „Knick“ in der „one step“-Wachstumskurve, ein scheinbarer Titerrückgang, welcher durch das Uncoating der Viruspartikel entsteht. Nach weiteren 4 Stunden (insg. 8 Stunden) hatte sich die Infektiosität bei MVAwt schon um fast zwei, bei MVA-BRSV-F nur um eineinhalb und bei MVA-BRSV-G sogar nur um eine log-Stufe erhöht. Nach insgesamt 48 Stunden war die Infektiosität bei MVAwt um dreieinhalb log-Stufen bei MVA-BRSV-F um zweieinhalb und bei MVA-BRSV-G nur um eineinhalb log-Stufen angestiegen. Somit stellt dieses repräsentative Ergebnis aus vier durchgeführten Wachstumsuntersuchungen deutlich dar, dass MVA-BRSV-F und zu einem größeren Ausmaß MVA-BRSV-G ein vermindertes Wachstum bzw. eine verminderte Menge an neu gebildeten Viruspartikeln pro infizierter Zelle, bilden (siehe Abbildung 48).

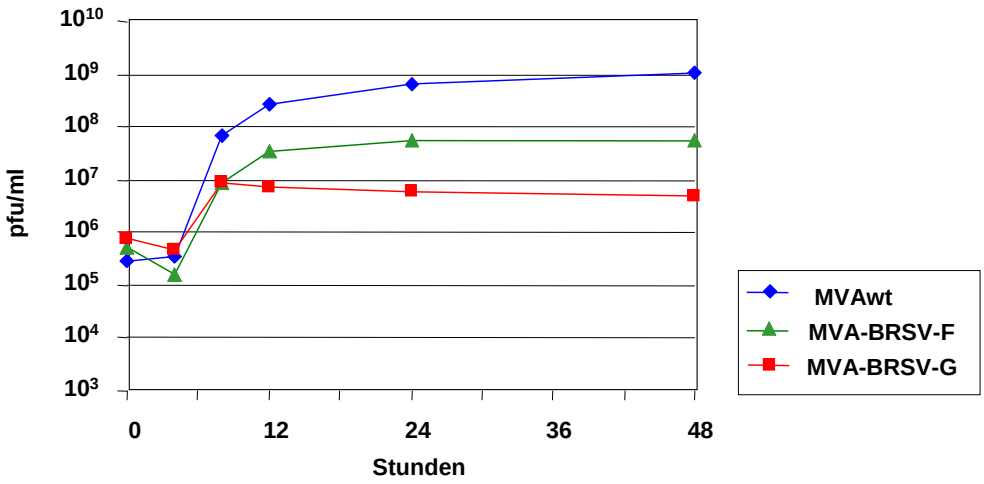


Abbildung 48: „One step“-Wachstumskurve von MVAwt, MVA-BRSV-F und MVA-BRSV-G. HEF-Zellen wurden mit 10 pfu pro Zelle mit MVAwt, MVA-BRSV-F und MVA-BRSV-G infiziert und nach 0, 4, 8, 12, 24 und 48 Stunden geerntet. Danach wurden die einzelnen Erntezeitpunkte auf HEF-Zellen rücktitriert und die Titer bestimmt. Dieses Experiment ist ein repräsentatives Ergebnis aus vier durchgeführten Wachstums-untersuchungen.

Die Überprüfung der Zell- zu Zellausbreitung der rekombinanten MVA, im Vergleich zu MVAwt erfolgte mit der „multiple-step“-Wachstumskurve, bei der HEF-Zellen mit einer niedrigen MOI (0,05 pfu pro Zelle) infiziert werden. Abbildung 49 zeigt die graphische Darstellung der „multiple-step“-Wachstumskurve von MVA-BRSV-F und MVA-BRSV-G im Vergleich mit MVAwt. Nach 12 Stunden hatte sich die Ausgangsinfektiosität beider MVA-BRSV-Rekombinanten um eineinhalb log-Stufen und beim Wildtypvirus um zwei log-Stufen erhöht. Sehr deutlich war allerdings zu erkennen, dass MVA-BRSV-G nach dieser Titerzunahme keine weitere Erhöhung der Infektiosität zeigte. MVA-BRSV-F wies bis 72 Stunden nach der Infektion eine Erhöhung von fast vier bis viereinhalb log-Stufen und MVAwt sogar von fünf log-Stufen auf.

Bei der Untersuchung des „multiple-step“-Wachstums zeigte sich, dass vor allem MVA-BRSV-G eine verminderte Zell- zu Zellausbreitung auf HEF-Zellen hat. Das Virus erreichte im Vergleich zu MVAwt, bis zu zirka zweieinhalb Zehnerpotenzen geringere Titer (siehe Abbildung 49). Bei MVA-BRSV-F handelt es sich um eine nur geringe Wachstumsminderung die um eine Zehnerpotenz niedriger liegt als beim Wildtypvirus.

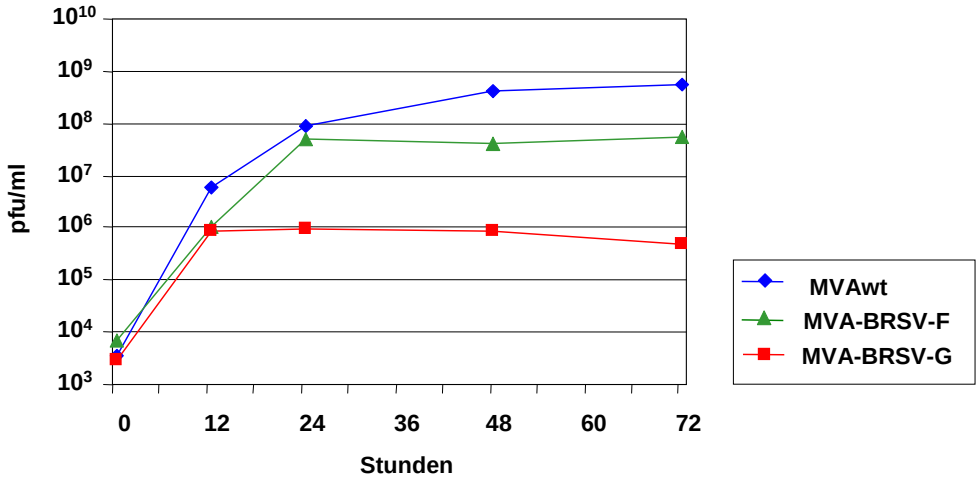


Abbildung 49: „Multiple-step“-Wachstumskurve von MVAwt, MVA-BRSV-F und MVA-BRSV-G. HEF-Zellen wurden mit 0,05 pfu pro Zelle mit MVAwt, MVA-BRSV-F und MVA-BRSV-G eine Stunde infiziert und nach 0, 12, 24, 48 und 72 Stunden geerntet. Danach wurden die einzelnen Erntezeitpunkte auf HEF-Zellen rücktitriert und die Titer bestimmt. Dieses Experiment ist ein repräsentatives Ergebnis aus vier durchgeführten Wachstumsuntersuchungen. Deutlich sichtbar ist das stark verminderte Wachstum von MVA-BRSV-G.

4.1.4.4 Replikationsdefizienzassay von MVA-BRSV-F und MVA-BRSV-G

Zur Untersuchung der erhaltenen Replikationsdefizienz von MVA nach Insertion von Fremdgenen, erfolgte die Durchführung eines Replikationsdefizienzassay. Diese Untersuchung wurde auch in der „Allgemeinen Stellungnahme der ZKBS, 6790-10-74, Juni 2002“, für die Herabstufung von rekombinanten MVA der Risikogruppe 2 auf Risikogruppe 1, vorgestellt. Diese Wachstumsuntersuchung erfolgte auf HeLa-Zellen im Vergleich zu MVAwt und dem replikationskompetenten CVA. Dabei konnte gezeigt werden, dass auch nach

Insertion der BRSV-F oder –G-Gene in das MVA-Genom, keine Replikation des Virus auf Säugerzellen stattfand. Der Titer sank nach 72 Stunden bei MVAwt, MVA-BRSV-F und MVA-BRSV-G sogar um eine Zehnerpotenz ab, während der Titer des replikationskompetenten CVA, dem Vorläufer von MVA, um 4 Zehnerpotenzen zunahm.

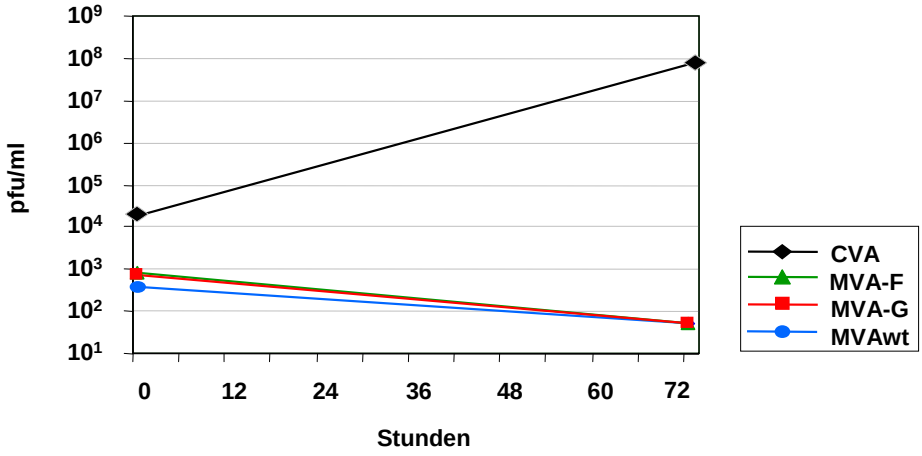


Abbildung 50: Wachstumsuntersuchung von MVA-BRSV-F und MVA-BRSV-G auf HeLa-Zellen. Die Infektion von HeLa-Zellen erfolgte mit 0,05 pfu pro Zelle. Die Ernte der infizierten Zellen erfolgte nach 0 Stunden und nach 72 Stunden. Die Rücktitration wurde auf BHK-Zellen durchgeführt. CVA = Chorioallantois Vacciniavirus Ankara, MVA-F = MVA-BRSV-F, MVA-G = MVA-BRSV-G und MVAwt = MVA-Wildtyp. Die Darstellung einer Geraden durch zwei Punkte, anstelle von Balken, wurde zur besseren Darstellung der Titer-Zu- beziehungsweise -Abnahme gewählt.

4.2 Konstruktion der revertanten Viren MVA-ΔBRSV-F und MVA-ΔBRSV-G

Die Herstellung der revertanten Viren erfolgte durch spezifische Entfernung der inserierten Gene und deren Promotor aus den jeweiligen rekombinanten Viren. Die spezifische Deletion der inserierten Gene erlaubte die Überprüfung der möglichen negativen Beeinflussung der Überexpression des BRSV-G-Gens oder zufällig aufgetretener sekundäre Mutationen im MVA-Genom, welche als Ursache für das unterschiedliche Wachstumsverhalten vermutet wurden.

4.2.1 Plasmide zur Deletion inserierter Gene in der Deletion III und VI des MVA-Genoms

Bei der Konstruktion des MVA-ΔBRSV-F sollte das BRSV-F-Gen mit dem Vacciniapromotor P7.5 aus der Deletion III und zur Herstellung des MVA-ΔBRSV-G das BRSV-G-Gen mit dem Vacciniapromotor PmH5 aus der Deletion VI, entfernt werden. Hierfür mussten aus den entsprechenden MVA-Vektorplasmiden die Promotoren deletiert werden um ein Vektorplasmid zu erhalten, welches nur die Deletion flankierende Gensequenz, die repetitiven Gensequenzen und das K1L-Markergen enthielt. Nach homologer Rekombination dieser Gensequenzen mit denjenigen im MVA-Genom führte dies zur spezifischen

Entfernung des inserierten Gens. In Abbildung 51 ist das Schema zur Herstellung von revertanten Viren dargestellt.

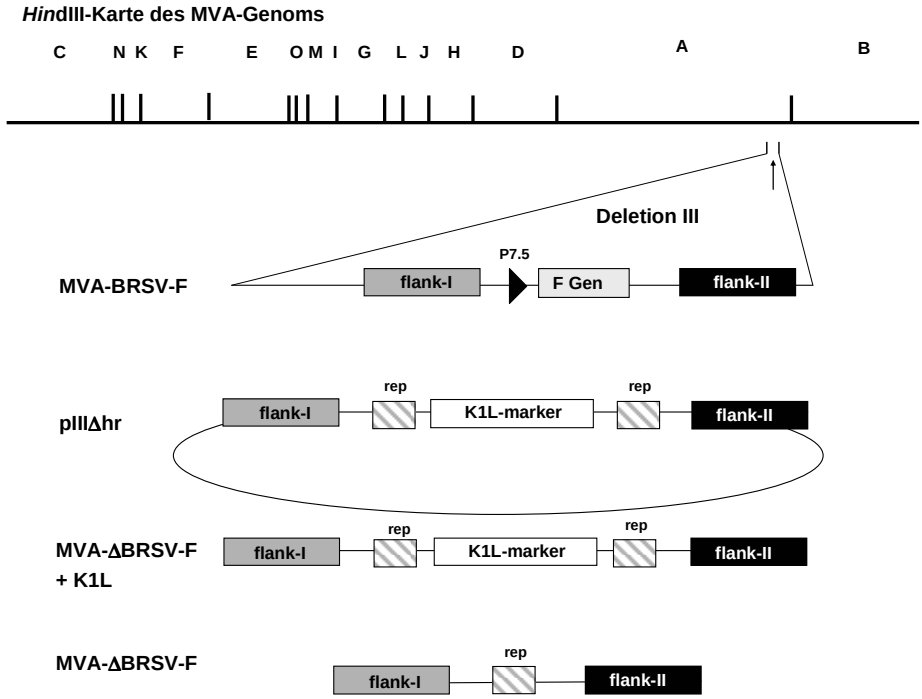


Abbildung 51: Schema zur Herstellung der revertanten Viren am Beispiel der MVA-ΔBRSV-F. Oben gezeigt ist die HindIII-Restriktionsendonuklease-Karte des MVA-Genoms und darunter der Ausschnitt der Deletion III des MVA-BRSV-F, welches das F-Gen und den P7.5 Promotor enthält. Das Plasmid pIIIΔhr besitzt nur die beiden repetitiven Gensequenzen (rep) und das K1L-Markergen. Durch homologe Rekombination zwischen den flank-I und flank-II im Plasmid und im MVA-Genom wird das K1L-Markergen in die Deletion III inseriert und gleichzeitig das BRSV-F-Gen zusammen mit seinem Promotor deletiert. Durch die K1L-Expressionskassette kann das revertante Virus MVA-ΔBRSV-F auf RK13 selektiert werden. Durch Passage der Viren auf HEF- oder BHK-Zellen wird das K1L-Markergen durch intragenomische homologe Rekombination wieder deletiert.

4.2.1.1 Herstellung und Aufarbeitung der Vektoren pIIIΔhr und pVIΔhr

Die Herstellung der revertanten Viren erforderte die Entfernung der Promotoren aus den MVA-Vektorplasmiden pIIIΔhrP7.5 (siehe 3.1.6.1.1, Seite 38) und pVIΔhrP7.5-sP (siehe 3.1.6.1.2, Seite 38). Dazu wurden beide Vektorplasmide mit den Enzymen AscI und NotI verdaut und zur Herstellung von glatten Enden mit Klenow-Enzym *(Roche Diagnostics GmbH)* behandelt (siehe 3.2.1.2.4.1, Seite 45). Nach der Aufreinigung durch Agarosegel-Elektrophorese konnten die Banden für das linearisierte Plasmid isoliert und religiert werden (siehe 3.2.1.4.2). Nach Transformation in elektrokompetente Bakterien erfolgte die Analyse der DNA von jeweils 10 Ampicillin-resistenten Bakterienkolonien mit Hilfe des Enzym EcoRI für die pIIIΔhr-Klone und dem Enzym HindIII für die pVIΔhr-Klone. Hierbei konnten zwei Isolate anhand der DNA-Fragmentgrößen identifiziert und in einer präparativen Plasmid-DNA-Isolierung amplifiziert werden. Die Überprüfung der Reinheit der beiden Klone erfolgte durch Behandlung mit Restriktionsendonukleasen auf (siehe Abbildung 52).

Diese wurden zur Herstellung der revertanten Viren MVA-ΔBRSV-F und MVA-ΔBRSV-G benutzt (siehe 4.2.2).

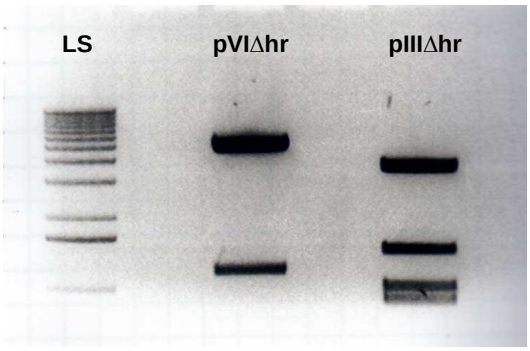


Abbildung 52: DNA-Fragmente nach Behandlung mit Restriktionsendonukleasen und Auftrennung im Agarosegel. Die erwarteten Größen der DNA-Fragmente für das Vektorplasmid pVIΔhr nach HindIII-Kontrollverdau und für das Vektorplasmid pIIIΔhr nach EcoRI-Kontrollverdau sind rechts angegeben. LS = Längenstandard.

4.2.2 Herstellung der revertanten Viren MVA-ΔBRSV-F und MVA-ΔBRSV-G durch homologe Rekombination

In Abbildung 51 ist schematisch das Prinzip der spezifischen Deletion des inserierten BRSV-Gen am Beispiel von MVA-BRSV-F dargestellt. Die MVA-Vektorplasmide pIIIΔhr und pVIΔhr, welche hierfür benutzt wurden, enthalten nur noch das transiente K1L-Markergen und die beiden repetitiven Gensequenzen.

4.2.2.1 Transfektion, transiente Wirtsselektion, Überprüfung rekombinanter Virusklone und Deletion des K1L-Markergens

Die Herstellung der revertanten Viren erforderte die selektive Deletion der inserierten BRSV-Gene F und G aus den entsprechenden rekombinanten MVA. Hierzu erfolgte die Transfektion MVA-BRSV-F- bzw. MVA-BRSV-G-infizierter HEF-Zellen mit den Vektorplasmiden pIIIΔhr bzw. pVIΔhr (siehe 4.2.1, Seite 98). Nach Isolierung einzelner Aggregate rekombinanter Virusklone, erfolgte nach der 3. Passage eine Amplifikation einzelner Klone zur DNA-Gewinnung und anschließender genetischer Überprüfung mittels PCR-Analyse. Daraufhin folgten weitere Passagen auf HEF-Zellen mit Agaroseüberschichtung zur Deletion des K1L-Markergens (siehe 3.2.3.1.6, Seite 61). Abbildung 53 und Abbildung 54 zeigen die PCR-Untersuchung der DNA verschiedener MVA-ΔBRSV-F- und -G-Klone aus der 3. RK13-Passage mit Oligonukleotiden spezifisch für die Deletion III. Hierbei ließ sich jeweils eine spezifische Bande (wt_{RevF}, wt_{RevG}), welche zirka 250 bp größer als das amplifizierbare PCR-Produkt des Wildtypvirus, nachweisen. Diese zusätzlichen 250 Basenpaare resultieren aus den verbleibenden repetitiven Gensequenzen nach deren intragenomischen Rekombination, durch die die Deletion des K1L-Markers erfolgt.

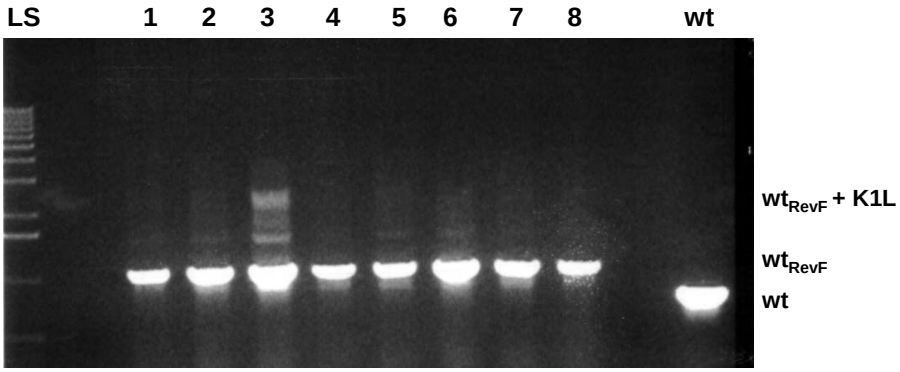


Abbildung 53: K1L- und Deletion VI-spezifische PCR-Untersuchung der DNA verschiedener Klone der MVA-ΔBRSV-F in der 2. Passage auf HEF-Zellen. 1 bis 6 = verschiedene Klone der MVA-ΔBRSV-F aus der 2. Passage auf HEF-Zellen, K1L = spezifische Bande für das K1L-Markergen, wt = Deletion III spezifisch Bande im Wildtypgenom, wt_{RevF}= Deletion III-spezifische Bande der Revertanten F, wt_{RevF} + K1L = spezifische Bande Deletion III vor der Entfernung des Markergens K1L im Genom der Revertante F.

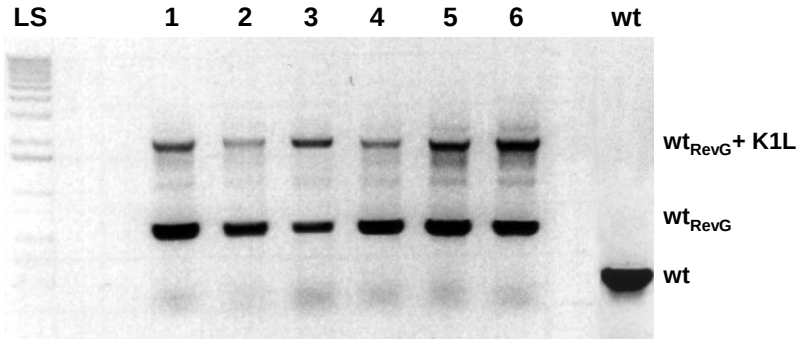


Abbildung 54: K1L- und Deletion III-spezifische PCR-Untersuchung der DNA verschiedener Klone der MVA-ΔBRSV-G in der 2. Passage auf HEF-Zellen. Legende siehe Abbildung 53. 1 bis 6 = verschiedene Klone der MVA-ΔBRSV-G aus der 2. Passage auf HEF-Zellen.

Die erfolgreiche Deletion des K1L-Markergens konnte nach einer weiteren Passage auf HEF-Zellen mit Agaroseüberschichtung bestätigt werden. Der MVA-BRSV-F Revertante Klon F1/1/3 und der MVA-BRSV-G Revertante Klon 6/1/1 wurden auf HEF-Zellen zu Virusstocks amplifiziert und titriert (siehe 3.2.3.1.7 und 3.2.3.1.8 auf den Seiten 61 und 62).

4.2.3 Virologische Charakterisierung der revertanten Viren MVA-ΔBRSV-F und MVA-ΔBRSV-G

Die virologische Charakterisierung der revertanten Viren erfolgte durch PCR-Untersuchungen der DNA der Virusstocks und Wachstumsuntersuchungen im Vergleich mit dem Wildtypvirus, um die Auswirkungen der Deletion der BRSV-Gene auf das Wachstum der revertanten Viren zu untersuchen.

4.2.3.1.1 PCR-Analyse des Genoms der revertanten Viren MVA-ΔBRSV-F und MVA-ΔBRSV-G

Zur Überprüfung der Reinheit des Genoms der Virusstocks der revertanten Viren MVA-ΔBRSV-F und MVA-ΔBRSV-G erfolgte eine PCR-Analyse mit den Oligonukleotiden zur Detektion der Deletion III (siehe 3.1.5.1.1), der Deletion VI (siehe 3.1.5.1.2) und des K1L-Markergens (siehe 3.1.5.2). In Abbildung 55 ist die Dokumentation dieser PCR-Analyse nach Gelelektrophorese durch ein 1%iges Agarosegel dargestellt. Für die Deletion III ergeben sich bei der MVA-ΔBRSV-G und dem MVAwt die typische zirka 700 bp große Bande für die „leere“ Deletion III; im Gegensatz dazu konnte bei der MVA-ΔBRSV-F eine etwa 950 bp große Bande detektiert werden. Diese größere Bande ergibt sich durch den Verbleib der zirka 250 bp großen repetitiven Gensequenzen, die nach intragenomischer Rekombination und Deletion des K1L-Markergens, in der Deletion III verbleibt. Für die Deletion VI ergibt sich bei der MVA-ΔBRSV-F und dem MVAwt eine zirka 400 bp große Bande, während diese bei der MVA-ΔBRSV-G, durch den Verbleib der 250 bp großen repetitiven Gensequenz und der Deletion des K1L-Markergens, zirka 650 bp groß ist. Das K1L-Gen kann nur im Vektorplasmid detektiert werden, da dieser transiente Marker während der Herstellung der revertanten Viren deletiert wurde.

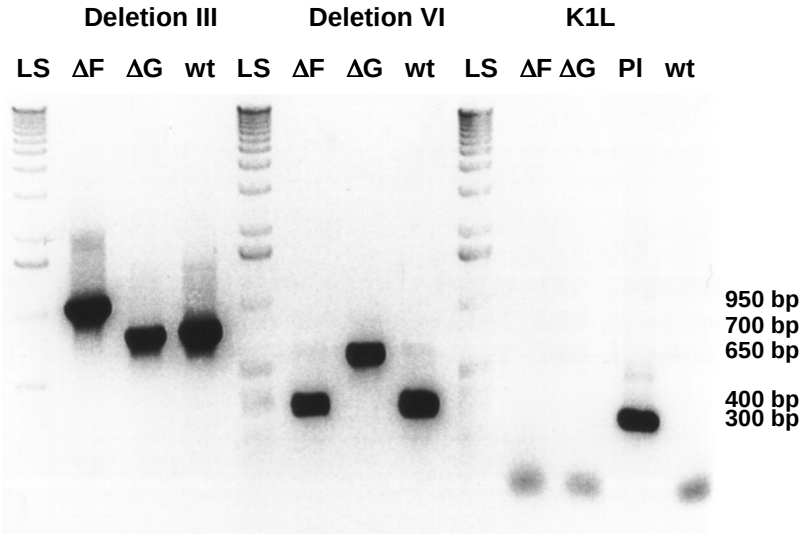


Abbildung 55: PCR-Analyse des Genoms der Virusstock von MVA-ΔBRSV-F und ΔBRSV–G nach Auftrennung auf einem 1%igem Agarosegel. Es wurden jeweils die Deletion III, die Deletion VI und das K1L-Gen mit den entsprechenden Oligonukleotidpaaren detektiert. F = MVA-BRSVΔ-F, G = MVA-ΔBRSV-G, wt = MVAwt, Pl = pIIIΔhrP7.5, M = Marker.

4.2.3.1.2 Wachstumsuntersuchungen der revertanten Viren MVA-ΔBRSV-F und -ΔBRSV-G

Die Herstellung der revertanten Viren erfolgte zur Überprüfung möglicher negativer Beeinflussung der Überexpression der inserierten BRSV-Gene oder zufällig aufgetretener sekundärer Mutationen im MVA-Genom, welche als Ursache für das unterschiedliche Wachstumsverhalten vermutet wurde. Aus diesem Grund waren Wachstumsuntersuchungen der revertanten Viren von vorrangigem Interesse.

Die Wachstumsexperimente wurden wie unter 3.2.3.2.2 auf Seite 64 beschrieben durchgeführt und jeder Zeitpunkt im Doppelansatz titriert. In Abbildung 56 ist die „one step"-Wachstumskurve der beiden revertanten Viren im Vergleich zu MVAwt graphisch dargestellt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass sich das Wachstum des MVA-ΔBRSV-G kaum von dem des MVAwt unterscheidet. Vergleicht man hierzu die „one step"-Wachstumskurve des rekombinanten Gegenstücks (MVA-BRSV-G, siehe Abbildung 48 auf Seite 96) wird dieser Unterschied besonders deutlich. Die MVA-ΔBRSV-F zeigte ein ähnliches Wachstumsverhalten, wie sein rekombinanter Vorfahre, das MVA-BRSV-F (siehe Abbildung 48 auf 96).

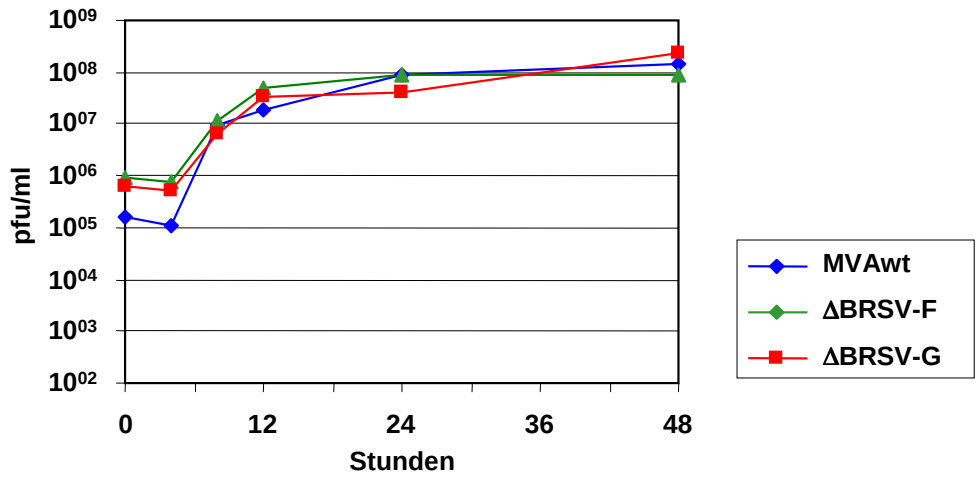


Abbildung 56: „One step"-Wachstumskurve der revertanten Viren. HEF-Zellen wurden mit 10 pfu pro Zelle mit MVAwt, MVA-ΔBRSV-F und MVA-ΔBRSV-G infiziert und nach 0, 4, 8, 12, 24 und 48 Stunden geerntet. Danach erfolgte die Titration der einzelnen Erntezeitpunkte auf HEF-Zellen im Doppelansatz. Dieses Experiment ist ein repräsentatives Ergebnis aus 3 durchgeführten Wachstumskurven.

Auch bei der „multiple-step"-Wachstumskurve war kein Unterschied im Wachstum der revertanten Viren im Vergleich zu MVAwt erkennbar (siehe Abbildung 57).

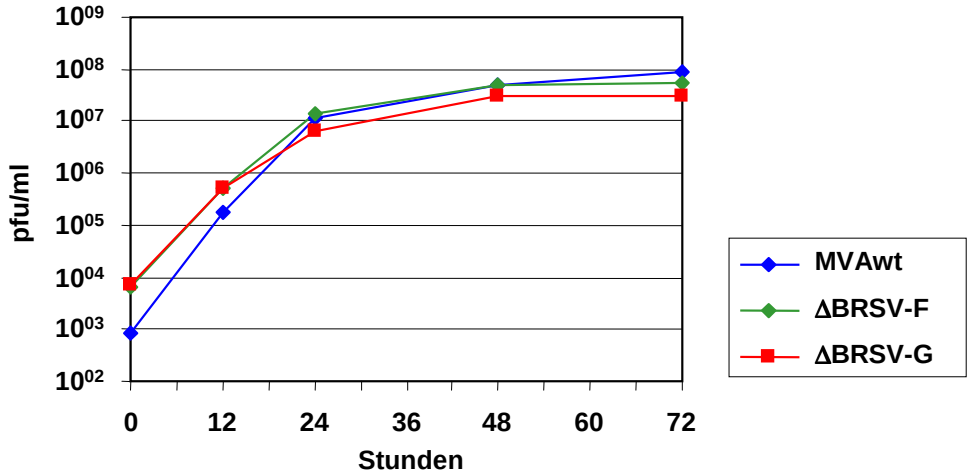


Abbildung 57: „Multiple-step"-Wachstumskurve der revertanten Viren. HEF-Zellen wurden mit 0,05 pfu pro Zelle mit MVAwt, MVA-ΔBRSV-F und MVA-ΔBRSV-G infiziert und nach 0, 12, 24, 48 und 72 Stunden geerntet. Danach wurden die einzelnen Erntezeitpunkte auf HEF-Zellen rücktitriert und die Titer bestimmt. Dieses Experiment ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei durchgeführten Wachstumsuntersuchungen.

Mit der Konstruktion der revertanten Viren konnte nachgewiesen werden, dass das verminderte Wachstum, vor allem von MVA-BRSV-G, nicht auf das MVA-Rückgrat zurückzuführen ist.

4.3 Herstellung von MVA-BRSV-Gneu

Die Ergebnisse aus der Untersuchung der revertanten Viren ließen vermuten, dass die verminderte Wachstumsfähigkeit des MVA-BRSV-G doch eher auf die Expression des BRSV-G-Gens zurückzuführen war. Offenbar hatte hierbei die Expression des BRSV-G-Gens durch den starken synthetischen modifizierten PH5 besondere Auswirkung. Es sollte daher versucht werden, durch Verwendung des eher moderaten transkriptionsaktiven natürlichen Promotors P7.5 ein neues Vektorvirus zur Produktion des BRSV-G-Antigens herzustellen.

4.3.1 Klonierung des Vektorplasmides pIIIΔhrP7.5-BRSV-G zur Herstellung von MVA-BRSV-Gneu

Zur Insertion des BRSV-G-Gens unter der Kontrolle des Promotors P7.5 in die Deletion III des MVA-Genoms, wurde das Vektorplasmid pIIIΔhrP7.5-BRSV-G kloniert. Die Isolierung des BRSV-G-Gens erfolgte aus dem Vektor pBRSVGsyn, welches anschließend in das linearisierte MVA-Vektorplasmid pIIIΔhrP7.5 ligiert wurde (Schema siehe Abbildung 58).

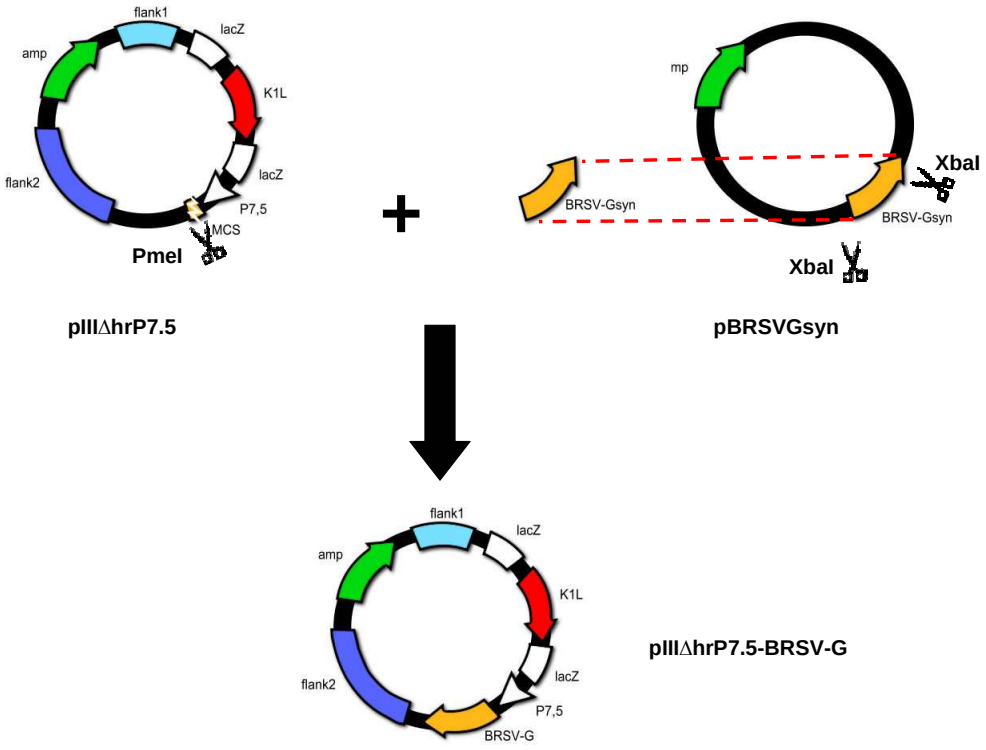


Abbildung 58: Schema zur Klonierung des Vektorplasmides pIIIΔhrP7.5-BRSV-G. Rechts oben dargestellt ist das Plasmid pBRSVGsyn aus dem das BRSV-G-Gen mit Restriktionsendonukleasen ausgeschnitten wurde. Oben links ist das MVA-Vektorplasmid dargestellt, dieses wurde an der „multiple cloning site“ (MCS) aufgeschnitten. Die Ligation der beiden Fragmente sollte zur Bildung des Vektorplasmides pIIIΔhrP7.5-BRSV-G führen.

4.3.1.1 Aufarbeitung der Vektoren pIIIΔhrP7.5 und pBRSVGsyn zur Herstellung des Vektorplasmides pIIIΔhrP7.5-BRSV-G

Die Herstellung dieses Plasmides erforderte die Isolierung des BRSV-G-Gens aus dem Plasmid pBRSVGsyn (siehe 3.1.6.1.5, Seite 40) mit dem Restriktionsendonuklease XbaI (analog wie zur Herstellung des Vektorplasmides pLW9-G, siehe 4.1.2.1 auf Seite 75) und die anschließende Behandlung mit Klenow-Enzym *(Roche Diagnostics GmbH)* zur Herstellung glatter Enden (siehe 3.2.1.2.4.1, Seite 45). Das MVA-Vektorplasmid pIIIΔhrP7.5 (siehe 3.1.6.1.1, Seite 38) wurde mit der Restriktionsendonuklease PmeI linearisiert.

Nach der Transformation und Isolation der DNA von 24 Ampicillin-resistenten Bakterienkolonien konnten diese mit dem Restriktionsenzym ScaI auf die Insertion des BRSV-G-Gens in richtiger Orientierung überprüft werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Zwei Isolate, Klon 9 und 12, wurden ausgewählt und in einer präparativen Plasmid-DNA-Isolierung amplifiziert. Ein Kontrollverdau mit dem Restriktionsenzym SpeI bestätigte die Reinheit dieser Isolate (siehe Abbildung 59). Die Übereinstimmung der klonierten BRSV-G-Gensequenz mit der publizierten Sequenz (KUHNLE et al. 1998) konnte durch Sequenzierung der Plasmid-DNA bestätigt werden. Das Vektorplasmid pIIIΔhrP7.5-BRSV-G

Klon 12 wurde anschließend zur Herstellung des MVA-BRSV-Gneu verwendet werden (siehe 4.3.1).

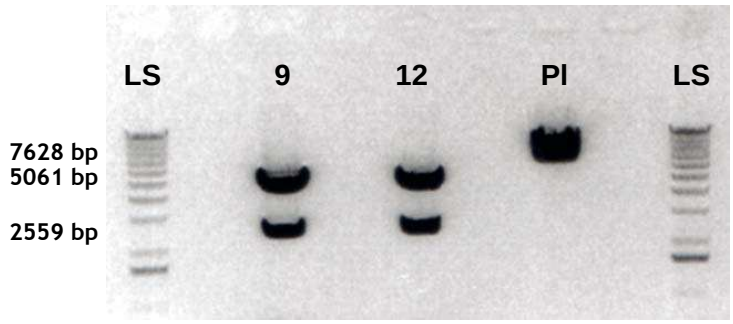


Abbildung 59: Agarosegel mit SpeI-Restriktionsverdau des Vektorplasmides pIIIΔhrP7.5-BRSV-G-Klone 9 und 12. Pl = Vektorplasmid pIIIΔhrP7.5; 9 und 12 = Klone des Vektorplasmides pIIIΔhr-P7.5-BRSV-G. Die erwarteten Banden bei richtiger Orientierung des inserierten BRSV-G von 5061 und 2559 bp sind links dargestellt.

4.3.2 Herstellung von MVA-BRSV-Gneu durch homologe Rekombination

Der Einsatz des Vektorplasmides pIIIΔhrP7.5-BRSV-Gneu für die Transfektion in MVA-infizierte HEF- oder BHK-Zellen erlaubte die Herstellung von MVA-BRSV-Gneu.

4.3.2.1 Transfektion, transiente Wirtsselektion, Überprüfung rekombinanter Virusklone und Deletion des K1L-Markergens

Die Herstellung des MVA-BRSV-Gneu, welches das G unter der Kontrolle des Vacciniapromotors P7.5 exprimieren sollte, erforderte die Durchführung eine stabile Transfektion auf MVAwt-infizierten BHK-Zellen mit dem Plasmid pIIIΔhrP7.5-BRSV-G. Nach der Isolierung einzelner Aggregate auf RK13-Zellen, erfolgte zur genetischen Überprüfung der einzelnen Klone eine PCR-Untersuchung mit Oligonukleotiden für die Deletion III. Analog zum Schema in Abbildung 29, sind bei der PCR-Untersuchung mit Oligonukleotiden spezifisch für die Deletion III verschiedene PCR-Fragmente amplifizierbar. In Abbildung 60 ist diese PCR-Untersuchung der DNA verschiedener Klone in der 2. Passage auf HEF-Zellen nach Auftrennung im 1%igen Agarosegel abgebildet. Die spezifische Bande für die „leere“ Deletion III im MVAwt-Genom, d.h. die Deletion III im Wildtyp Genom ohne Insertion ergibt mit diesen Oligonukleotiden eine Bande von zirka 800 bp. Ist das BRSV-G-Gen zusammen mit dem K1L-Markergen in der Deletion III inseriert, erhält man eine entsprechend größeres, zirka 3100 bp großes, PCR-Produkt, welches sich zusammen setzt aus den 800 bp der flanks der Deletion III, zusammen mit BRSV-G-Gen mit ca. 850 bp, dem Vacciniapromotor, den beiden rep und dem K1L-Markergen. Nach intragenomischer Rekombination zwischen den beiden repetitiven Gensequenzen, kann eine knapp 1200 bp kleinere Bande mit zirka 1900 bp nachgewiesen werden (siehe Abbildung 60).

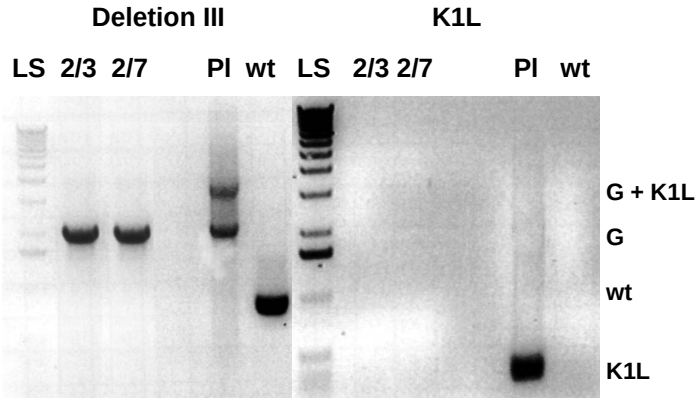


Abbildung 60: Del III- und K1L-spezifische PCR der Klone 2/3 und 2/7 nach der 2. Passage auf HEF-Zellen. 2/3 u. 2/7 = MVA-BRSV-Gneu-Klone 2/3 u. 2/7, Pl = Plasmid pIIIΔhrp7.5-BRSV-Gneu, wt = MVAwt bzw. spezifische Bande für Deletion III im MVAwt-Genom, G = spezifische Bande für das inserierte G-Gen in der Deletion III, G + K1L = spezifische Bande für das inserierte G-Gen zusammen mit dem K1L-Marker in der Deletion III. K1L = spezifische Bande für K1L nach Amplifikation mit K1L-Oligonukleotiden.

Der MVA-BRSV-Gneu-Klon 2/3 wurden zur Amplifikation und Herstellung von Impfstoffpräparationen verwendet.

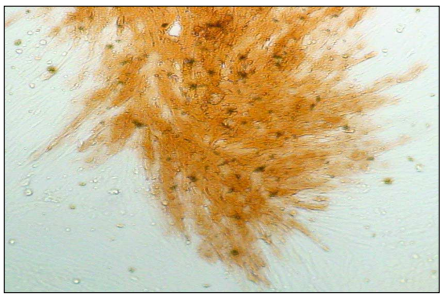
4.3.3 Virologische Charakterisierung

4.3.3.1 Überprüfung der Expression des G-Proteins durch MVA-BRSV-Gneu

4.3.3.1.1 Immunfärbung infizierter Zellen

Der Nachweis der Expression des BRSV-G-Proteins erfolgte nach Infektion von HEF-Zellen mit verschiedenen Virusverdünnung und Detektion des in den infizierten Zellen produzierten Fremdantigens durch Immunfärbung (siehe 3.2.3.1.8). Dabei wurde der monoklonale Antikörper gegen das BRSV-G-Protein (mAb 20)(SCHRIJVER et al. 1997) (siehe 3.1.7.3) verwendet. In Abbildung 61 sind die gefärbten MVA-BRSV-Gneu-Plaques auf HEF-Zellen zu sehen. Auffällig ist hier, dass die Plaquemorphologie von MVA-BRSV-Gneu keinen Unterschied zu MVAwt- oder MVA-BRSV-F-Plaques zeigt, im Gegensatz zu der auffällig kleinen Plaquemorphologie bei MVA-BRSV-G-infizierten HEF-Zellen (siehe Abbildung 41).

100 x



400 x

Abbildung 61: Immunfärbung von MVA-BRSV-Gneu. 100 x = 100fache Vergrößerung, 400 x = 400fache Vergrößerung. MVA-BRSV-Gneu-infizierte HEF-Zellen wurden nach 48 Stunden fixiert und nach Inkubation mit Anti-Vaccinia-Antikörper und α-rPO angefärbt.

4.3.3.1.2 Nachweis der Expression des G-Proteins von MVA-infizierten HEF-Zellen durch Western-Blot-Analyse

Zum Nachweis der Expression des G-Proteins durch das generierte MVA-BRSV-Gneu erfolgte die Durchführung einer Western-Blot-Analyse mit Hilfe des monoklonalen Antikörper mAb 20 (LANGEDIJK et al. 1996a)(siehe 3.2.2.1 auf Seite 49 und 3.1.7.3 auf 41). Hierbei konnte die zirka 69 kDa große spezifische Bande für das BRSV-G-Protein und einige schwächere kleinere Banden, welche die unglykosylierte Formen des G-Proteins dar stellen, nachgewiesen werden (siehe Abbildung 62).

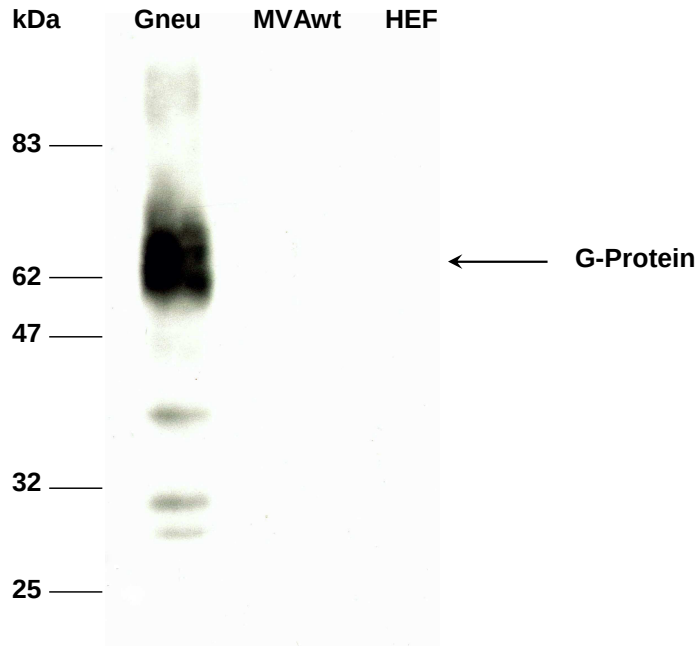


Abbildung 62: Western-Blot-Analyse von Proteinlysaten aus MVA-BRSV-Gneu-infizierten HEF-Zellen. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 10%igen SDS-Polyacrylamid-Gel, die Immunodetektion mit dem mAb 20 in einer Verdünnung von 1:1000, anschließend mit der α-mPO in einer Verdünnung von 1:5000 und die Detektion über Chemilumineszenz. Der Pfeil markiert die zirka 69 kDa große Bande für das G-Protein. Zusätzlich sind weitere kleine Banden sichtbar, welche unglykosylierte Formen des G-Proteins darstellen. HEF = Zellkontrolle, uninfizierte HEF-Zellen, MVAwt = MVAwt-infizierte HEF-Zellen, Gneu = MVA-BRSV-Gneu-infizierte HEF-Zellen.

4.3.3.2 Wachtumsuntersuchungen

Die Konstruktion des MVA-BRSV-Gneu diente unter anderem der Untersuchung der negativen Beeinflussung der Überexpression des BRSV-G-Gens auf den MVA-Lebenszyklus. Darum wurde das BRSV-G-Gen in diesem Virus unter den moderateren Promotor P7.5 gesetzt. Die Ergebnisse der Wachstumsuntersuchungen mit MVA-BRSV-Gneu-infizierten HEF-Zellen waren deshalb von besonderem Interesse.

In der „one step“-Wachstumskurve (siehe Abbildung 63) zeigte das MVA-BRSV-Gneu, im Gegensatz zu MVA-BRSV-G, ein fast identisches Wachstumsverhalten im Vergleich zum Wildtypvirus. Und auch in der „multiple-step“-Wachstumskurve, welche zur Untersuchung der Zell- zu Zellausbreitung dient, verhielt sich das Wachstum von MVA-BRSV-Gneu ebenfalls fast identisch mit dem von MVAwt (siehe Abbildung 64)

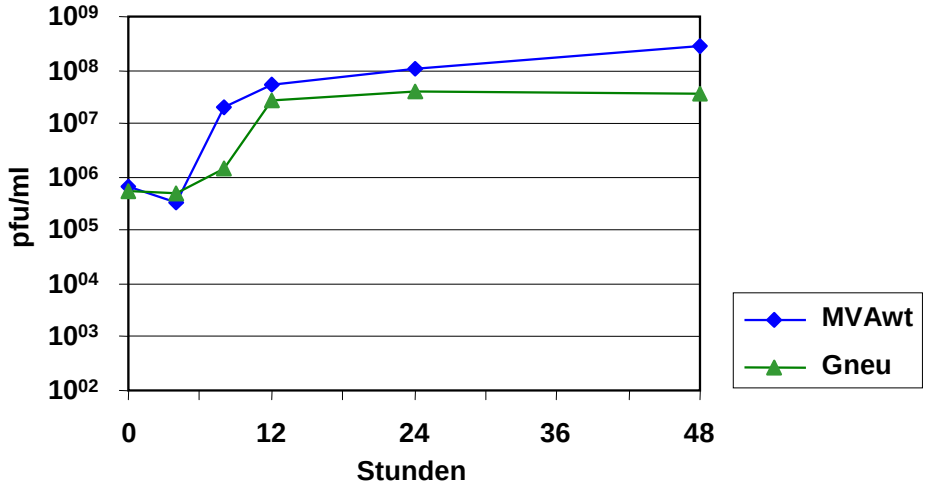


Abbildung 63: „One step"-Wachstumskurve von MVA-BRSV-Gneu. Bei der „one step"-Wachstumskurve werden die HEF-Zellen mit einer hohen MOI (10 pfu pro Zelle) mit MVAwt, MVA-BRSV-Gneu infiziert und nach 0, 4, 8, 12, 24 und 48 Stunden geerntet. Danach wurden die einzelnen Erntezeitpunkte auf HEF-Zellen rücktitriert und die Titer bestimmt. Dieses Experiment ist ein repräsentatives Ergebnis aus vier durchgeführten Wachstums-untersuchungen.

.

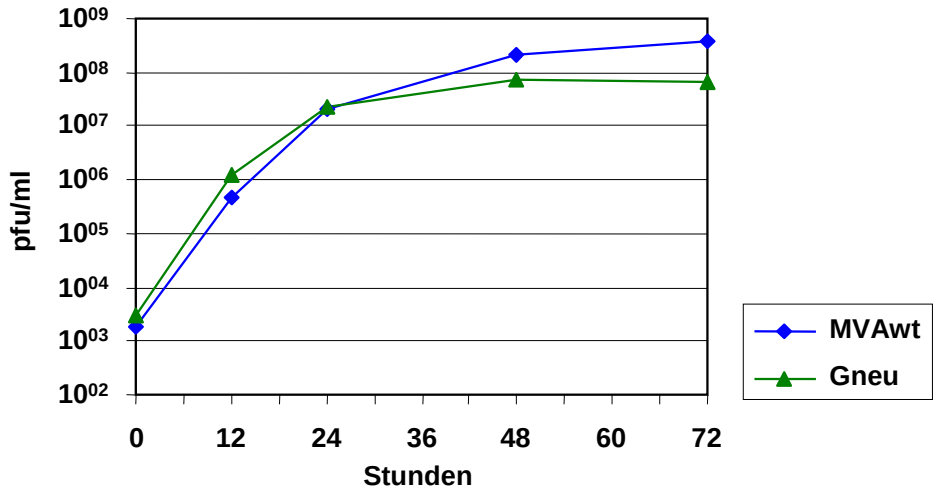


Abbildung 64: „Multiple-step"-Wachstumskurve von MVA-BRSV-Gneu. HEF-Zellen wurden mit 0,05 pfu pro Zelle mit MVAwt, MVA-BRSV-F und MVA-BRSV-G infiziert und nach 0, 12, 24, 48 und 72 Stunden geerntet. Danach wurden die einzelnen Erntezeitpunkte auf HEF-Zellen rücktitriert und die Titer bestimmt. Dieses Experiment ist ein repräsentatives Ergebnis aus vier durchgeführten Wachstumsuntersuchungen.

Diese Ergebnisse konnten die Theorie, der negativen Beeinflussung der Überexpression des BRSV-G-Gens auf das Wachstumsverhalten von MVA-BRSV-G, bestätigen. Die Verwendung eines moderateren Promotors, dem Vacciniapromotor P7.5, anstelle des modifizieren Vacciniapromotors PmH5, konnte die Wachstumsdefizienz aufheben.

4.4 Tiermodelle

4.4.1 MVA-HRSV-F und -G Immunisierung in BALB/c-(H-2^d)-Mäusen

Die Immunisierungsexperimente mit BALB/c-Mäusen entstanden in Zusammenarbeit mit Dr. Wieslawa Olszewska und Prof. Dr. Peter Openshaw vom Imperial College in London, England. Hierbei sollten MVA-HRSV-F und –G (siehe 3.1.4.3, (WYATT et al. 1999)) im Vergleich zu FI-HRSV und MVAwt in einem Vakzinations-Infektionsmodell in H-2^d-Mäusen auf ihre Immunogenität und ihr Pathogenese-Potential anhand verschiedener Parameter untersucht werden (OLSZEWSKA et al. 2004).

Im Folgenden werden zur Vereinfachung, die Bezeichnungen MVA-F für MVA-HRSV-F und MVA-G für MVA-HRSV-G, benutzt.

4.4.1.1 Gewichtsverlust nach Infektion mit RSV

BALB/c-(H-2^d)-Mäuse wurden wie unter 3.2.4.1.1.1 (Seite 66) beschrieben mit MVA-F, MVA-G, MVAwt-oder FI-RSV- immunisiert und anschließend mit RSV-Subtyp A2 infiziert. Nach der Infektion erfolgte eine tägliche Überprüfung und Dokumentation des Gewichts der Mäuse und deren Krankheitszeichen. Alle immunisierten Mäuse, außer der MVAwt-immunisierten Gruppe, verloren während der RSV-Infektion an Gewicht. Den höchsten Gewichtsverlust hatten die MVA-G-immunisierten Mäuse (siehe Abbildung 65).

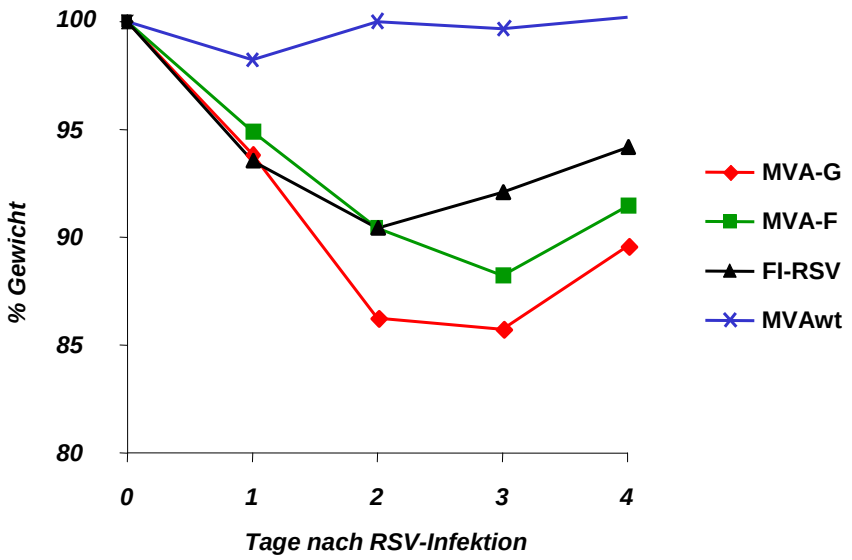


Abbildung 65: Veränderungen im Körpergewicht nach RSV-Infektion. Gruppen von 5 Mäusen wurden mit FI-RSV, MVAwt oder den MVA-Vektorviren, die die HRSV-Oberflächenproteine F oder G exprimierten, geimpft. Angegeben ist hier das Durchschnittsgewicht jeder Gruppe, als prozentualer Anteil des Anfangsgewichts jeder Maus.

4.4.1.2 RSV-Eliminierung aus dem Lungegewebe

Die Bestimmung der Virustiter in den Lungen der infizierten BALB/c-Mäuse erfolgte zwei, vier und sieben Tage nach der RSV-Infektion. Nach zwei Tagen konnte RSV aus den Lungen aller Tiere detektiert werden (zirka 3,2 bis 4,8 x 10^4 pfu pro Lunge). Allerdings war an Tag 4 nur noch in den MVAwt-immunisierten Mäusen RSV nachweisbar (durchschnittlich 8,4 ± 3,6 x 10^3 pfu pro Lunge). In den MVA-F-, MVA-G- oder FI-RSV-(Formalin inaktiviertes RSV) immunisierten Mäusen konnten am Tag 4 kein RSV mehr nachgewiesen werden. In keiner der Mäuse war am Tag 7 RSV nachweisbar.

4.4.1.3 Spezifische Anti-RSV-Antikörperantwort durch MVA-Immunisierung

Die Blutentnahme bei den MVAwt-, MVA-F-, MVA-G- oder FI-RSV-immunisierten BALB/c-Mäusen erfolgte vier Tage nach der intranasalen Infektion mit RSV-Subtyp A2 (siehe 3.1.4.4.1 auf Seite 36). Die Proben wurden im ELISA auf ihren RSV-spezifischen Gesamtantikörpergehalt und die IgG1 und IgG2a Subtypen, getestet. Die höchsten Anti-RSV-Titer induzierte die FI-RSV-Immunisierung (siehe Abbildung 66) Allerdings erreichten die MVA-Impfstoffe ein ausgeglicheneres IgG2a/IgG1 Verhältnis. Der MVA-F-Impfstoff induzierte die höchsten IgG2a-Antikörpertiter (Abbildung 67). Diese Ergebnisse aus dem Serum der Mäuse deuten auf eine eher T_H1-gerichtete Immunantwort nach MVA-Immunisierung hin.

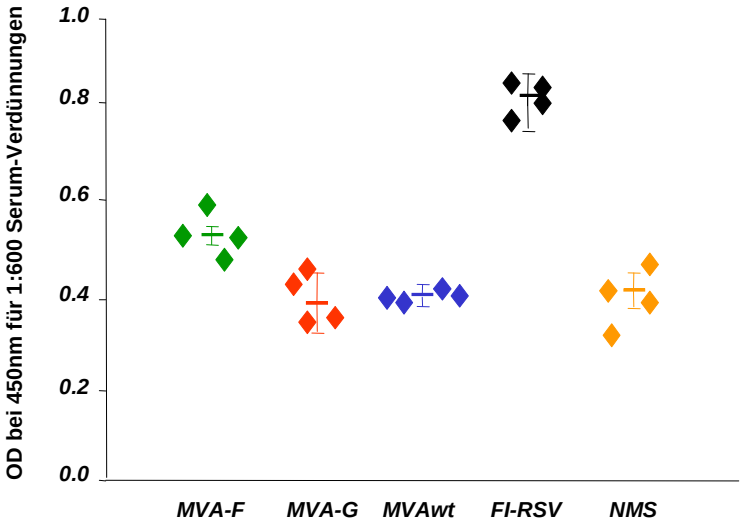


Abbildung 66: Durch die Immunisierung induzierte RSV-spezifische Serum-Antikörper. Gesamt Anti-RSV-IgG-Titer ausgedrückt als OD-Werte von 1:600 verdünntem Serum. NMS = normales Maus-Serum

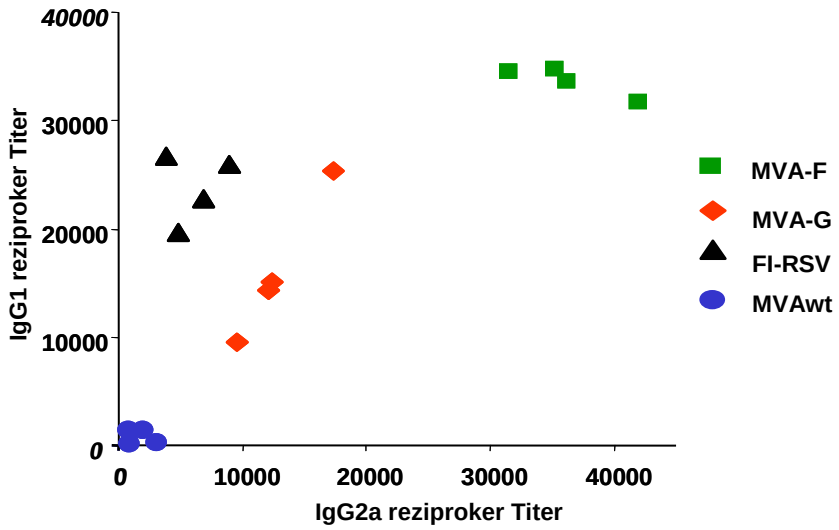


Abbildung 67: Durch die Immunisierung induzierte RSV-spezifische Serum-Antikörper-IgG-Subtypen-Titer. Die Titer wurden aus der Serumverdünnung berechnet, welche denselben Wert der OD der nicht immunisierten Kontrollgruppe hatte. Jeder Punkt entspricht der Serumprobe einer einzelnen Maus.

4.4.1.4 MVA-Immunisierung begünstigt eine T_H1-gerichtete Zytokinproduktion nach RSV-Infektion

Die RSV-Immunpathogenese wird mit einer zu stark T_H2-gerichteten Immunantwort assoziiert. T_H2-Zellen initiieren die humorale Immunantwort. Sie aktivieren naive B-Zellen und regen zur Bildung von Antikörpern an. Diese Aktivierung der B-Zellen (T_H2-gerichtete Immunantwort) wird vor allem durch die Zytokine IL-4- und IL-5-vermittelt, während die T_H1-gerichtete Immunantwort durch IFN-γ vermittelt werden. Somit weisen hohe IFN-γ auf eine eher T_H1-gerichtete Immunantwort, während hohe IL-4- und IL-5-Werte auf eine eher T_H2-gerichtete Immunantwort hinweisen.

IL-12 wird von B-Zellen und Makrophagen gebildet und induziert die T Zell-Differenzierung zu T_H1-Zellen. IL-13 wird von T-Zellen gebildet, stimuliert das B-Zellwachstum und -Differenzierung und inhibiert T_H1-Zellen. IL-18 wird von Makrophagen gebildet und induziert die IFN-γ Produktion von T-Zellen. Außerdem begünstigt IL-18 die T_H1- und später auch die T_H2-Immunantwort. Somit sind hohe IL-12- und IL-18-Zytokinwerte mit einer eher T_H1-gerichteten Immunantwort assoziiert, während hohe IL-13-Werte mit einer T_H2-gerichteten Immunantwort verbunden sind und die T_H1-Immunantwort sogar inhibiert.

Die IL-18- und IL12-Zytokinwerte wurden in BAL-Überständen durch ELISA (siehe 3.2.4.3.2) und die IFN-γ-, IL-4-, IL-5- und IL-13-Werte wurden anhand des Durchschnitts zytokinproduzierende Zellen im ELISPOT bestimmt (siehe 3.2.4.4).

Die Immunisierung mit MVA-F oder MVA-G induzierte eine hohe Zahl IFN-γ-produzierender Zellen (Abbildung 68), wie auch hohe Werte von IL-18- (Abbildung 69) und IL-12-Werte (Abbildung 70) in BAL-Überständen. Diese Konstrukte stimulierten die Lungenzellen, im

Gegensatz zum FI-RSV-Impfstoff, in signifikant geringerem Maße zur Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13 (Abbildung 68, unten). Die mit FI-RSV immunisierten Tiere hatten erhöhte T_H2-Zytokinantworten und im geringen Maße konnten auch T_H1-Zytokine (Abbildung 68 und Abbildung 70) nachgewiesen werden. Allerdings konnte in diesen Tieren kein IL-18 detektiert werden (Abbildung 69).

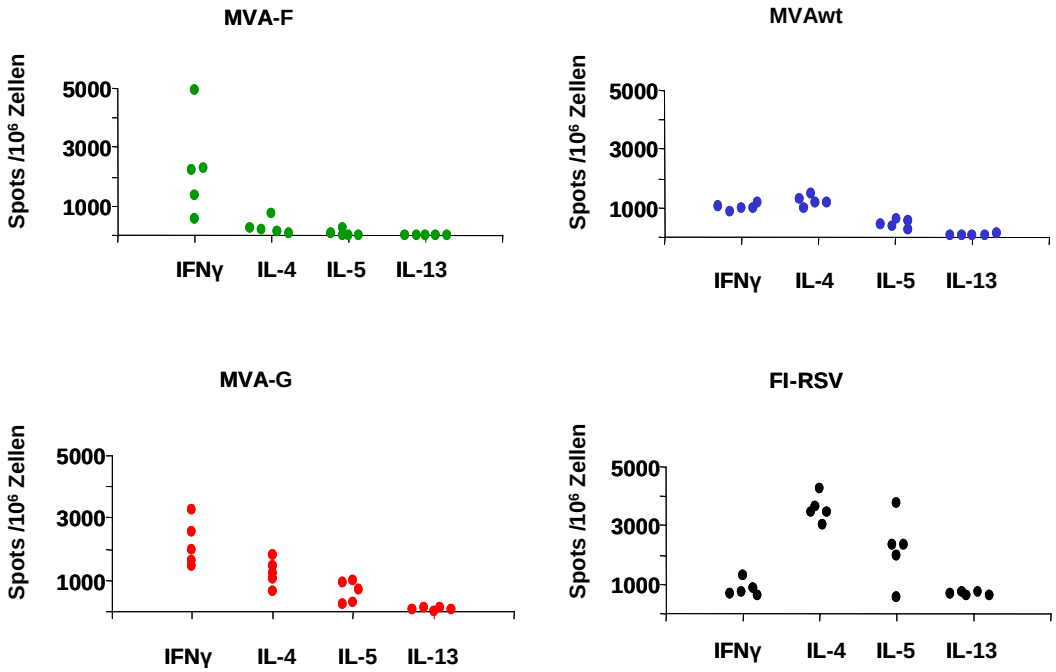


Abbildung 68: Zelluläre Zytokinproduktion nach Immunisierung und RSV-Infektion. Die Mäusegruppen wurden wie beschrieben immunisiert und am Tag 4 nach der Infektion wurden nicht stimulierte Suspensionen von Lungenzellen auf 96-Loch-Platten ausgebracht und die Zytokinproduktion wurde mit dem ELISPOT Assay gemessen. Jeder Punkt stellt eine einzelne Maus dar.

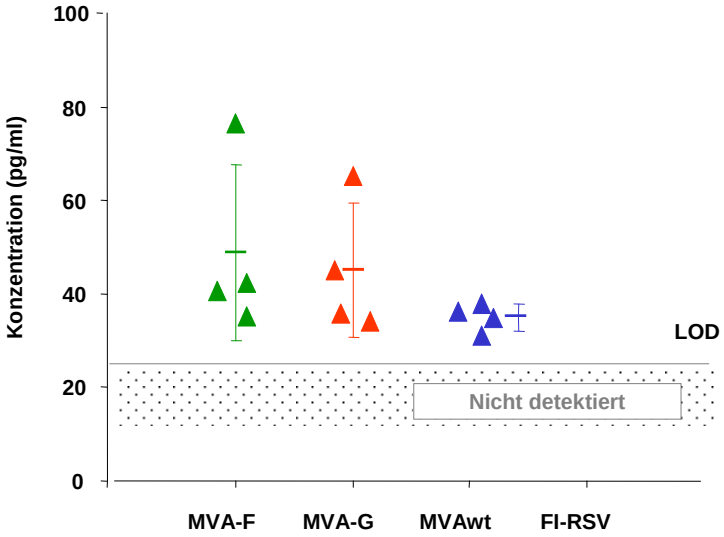


Abbildung 69: IL-18-Zytokin-Messung in BAL-Überständen nach der Immunisierung und RSV-Infektion. Vier Tage nach der Infektion wurden IL-18 Werte in den Überständen der BAL gemessen. Der gepunktete Bereich ist die LOD (Limit of detection, Grenze der Detektion), die 25 pg IL-18/ml beträgt. Jedes Dreieck stellt eine einzelne Maus dar. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind angegeben.

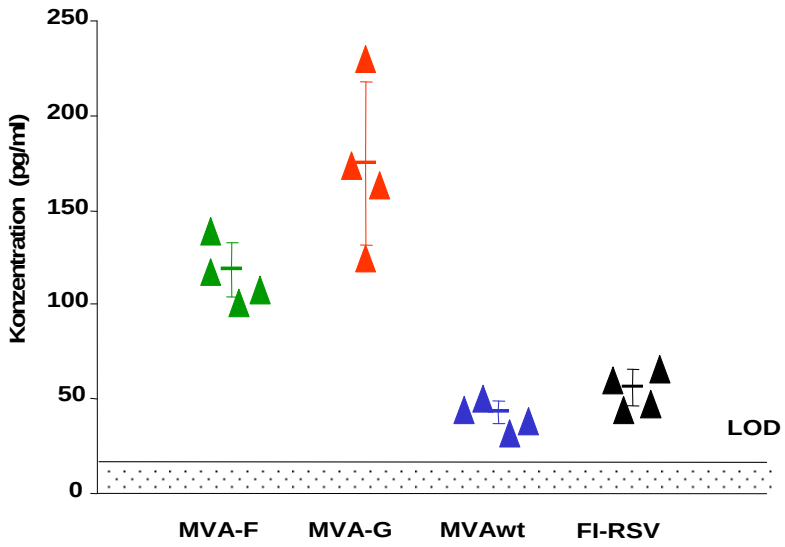


Abbildung 70: IL-12-Zytokin-Messung in BAL-Überständen nach der Immunisierung und RSV-Infektion. Vier Tage nach der Infektion wurden die IL-12 p40 Werte in den BAL-Überständen gemessen. Der gepunktete Bereich ist die LOD (Limit of detection, Grenze der Detektion), die 17,5 pg IL-12 p40/ml beträgt. Jeder Punkt stellt eine einzelne Maus dar. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind angegeben.

4.4.1.5 Immunisierung mit MVA-Impfstoffen induziert keine Lungen-Eosinophilie

Die Immunisierung mit FI-RSV induzierte zwischen 12 und 26% Eosinophile in der BAL der Mäuse (Abbildung 71). Diese Zahlen liegen signifikant höher als die Werte der MVA-immunisierten Mäuse, obwohl bei zwei von fünf Mäusen, welche mit MVA-G immunisiert wurden, 2 bis 3% Eosinophile in der BAL, nachgewiesen werden konnte. Die Vakzination mit MVA-F, sowie mit MVAwt induzierte keine Erhöhung der Eosinophilen in den Lungen der Mäuse. Es konnten keine Unterschiede in der Anzahl anderer Zellen in der BAL zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden.

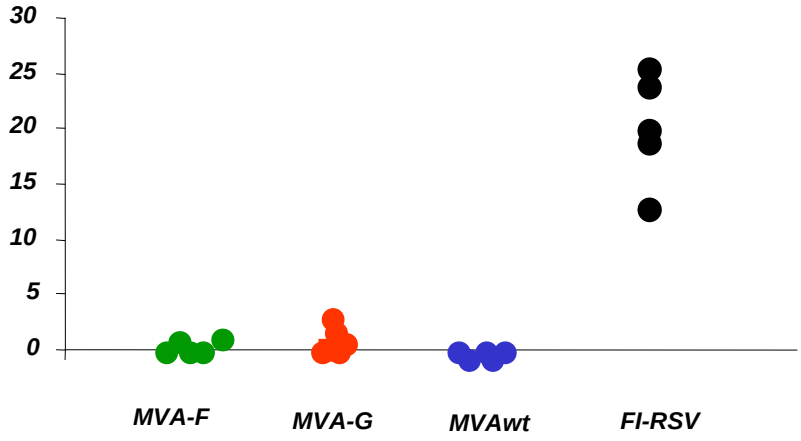


Abbildung 71: Eosinophile in BAL nach der RSV-Infektion in immunisierten Tieren. Die Zellen aus der BAL wurden durch Zytospin auf Objektträger zentrifugiert und mit HE angefärbt. Die eosinophilen Granulozyten werden in % ausgedrückt. Jeder Punkt stellt eine einzelne Maus dar.

4.4.2 Immunisierung von Kälbern mit nachfolgender RSV-Infektion

Im von ANTONIS et al. 2003 entwickelten BRSV-Vakzinations-Infektionsmodell in Kälbern konnte die impfstoffvermittelte Immunpathogenese analog zur der des Menschen beobachtet werden. Aus diesem Grund war die Benutzung dieses Modells zur Untersuchung der MVA-BRSV-Impfstoffkandidaten hervorragend geeignet (ANTONIS et al. 2003).

Die Daten aus den Immunisierungen der Kälber entstanden in Kollaboration mit A.F.G. Antonis, Animal Sciences Group, Wageningen University and Research Centre, Lelystad in den Niederlanden.

Im Folgenden werden zur Vereinfachung, die Bezeichnungen MVA-F für MVA-HRSV-F und MVA-G für MVA-HRSV-G, benutzt.

Es wurden 3 Gruppen mit jeweils 6 Kälbern mit PBS, MVA-F oder MVA-F + MVA-G im Abstand von drei Wochen zweimal immunisiert. Nach 18 Wochen erfolgte eine intranasale Infektion mit einem *in vivo* passagierten BRSV-Isolat des Stammes Odijk.

4.4.2.1 Rektale Körpertemperatur nach BRSV-Infektion

Die Entwicklung der Körpertemperatur in den einzelnen Gruppen nach Infektion ist einer der klinischen Parameter zur Überprüfung der Schuztwirkung der getesteten Impfstoffkandidaten. Die Messung erfolgte nach BRSV-F-Infektion (hier d0) zweimal täglich. Nur die Tiere der Kontrollgruppe, welche Phosphatpuffer (PBS) erhalten hatten, entwickelten stark erhöhte Körpertemperaturen, welche am Tag 5 bis 9 ihr Maximum erreichten. In der Gruppe MVA-F + MVA-G entwickelte keines der Tiere Fieber, in der Gruppe MVA-F zeigten nur 3 Tiere leicht erhöhte Körpertemperatur.

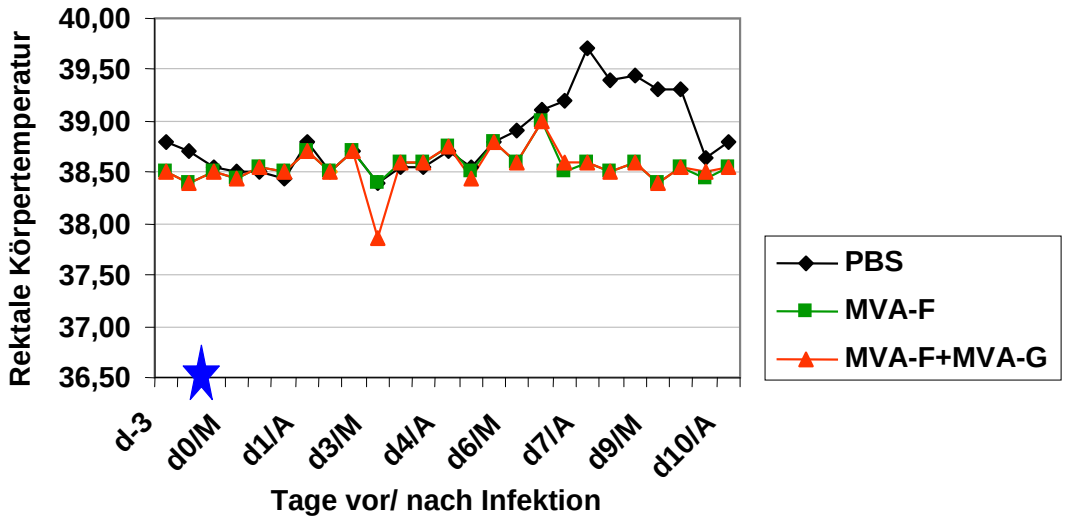


Abbildung 72: Entwicklung der rektalen Körpertemperatur nach BRSV-Infektion. Die Messungen der Körpertemperatur erfolgten nach der BRSV-Infektion (d0) morgens (M) und abends (A). Dargestellt sind die Durchschnittswerte der rektalen Körpertemperatur der Tiere einer Gruppe. MVA-F = MVA-BRSV-F, MVA-G = MVA-BRSV-G, PBS = Phosphatpuffer. Der blaue Stern kennzeichnet den Tag der Infektion mit BRSV.

4.4.2.2 Vaccinia-spezifische Antikörperantworten in den immunisierten Kälbern

Vor dem Ende des Experiments erfolgte die Testung der Serumproben der Kälber der Gruppen MVA-F und MVA-F + MVA-G (vergl. oben, Tabelle 3) vom Tag 0, 12 und 33 auf ihre Vaccinia-spezifischen Antikörperantworten im Anti-Vaccinia-ELISA, um noch vor Abschluss des Experiments den Immunisierungserfolg bei den Kälbern auf Vacciniaebene nachzuweisen. Die Durchführung des ELISA erfolgte, wie unter 3.2.4.3.1 beschrieben. In Abbildung 73 sind die durchschnittlichen Antikörpertiter der 6 Kälber pro Gruppe und deren Standardabweichung dargestellt. Die Seren der einzelnen Kälber wurden jeweils mindestens zweimal im Anti-Vaccinia-ELISA getestet.

Anhand der gemessenen Vaccinia-spezifischen Antikörpertiter konnte der Immunisierungserfolg durch die zwei aufeinanderfolgene Vakzinationen mit den rekombinanten MVA eindeutig nachgewiesen werden.

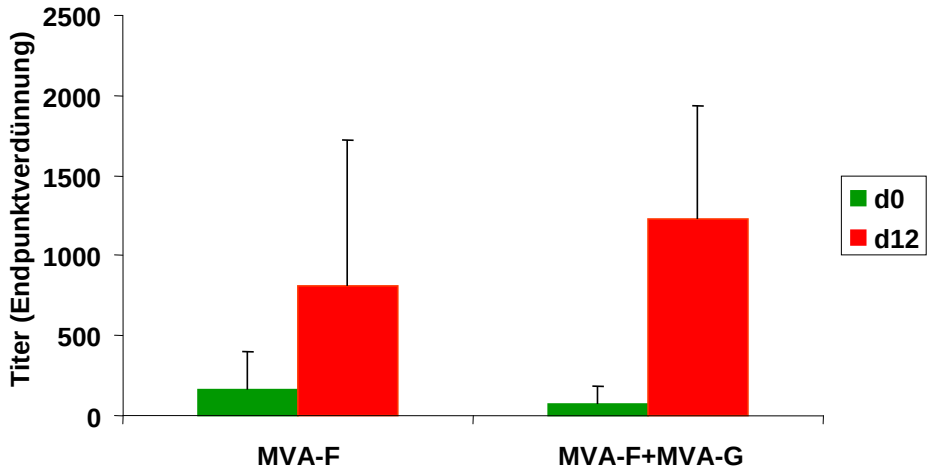


Abbildung 73: Durchschnittliche Anti-Vaccinia-Antikörpertiter an den Tagen 0 und 12. Gezeigt sind die durchschnittlichen Antikörpertiter von je 6 Kälbern pro Gruppe (MVA-F = MVA-BRSV-F und MVA-F + MVA-G = MVA-BRSV-F + MVA-BRSV-G). Die grünen Balken stellen die Serumproben vom Tag 0 (d 0) und die roten Balken vom Tag 12 dar. Es wurden jeweils die Standardabweichungen dargestellt.

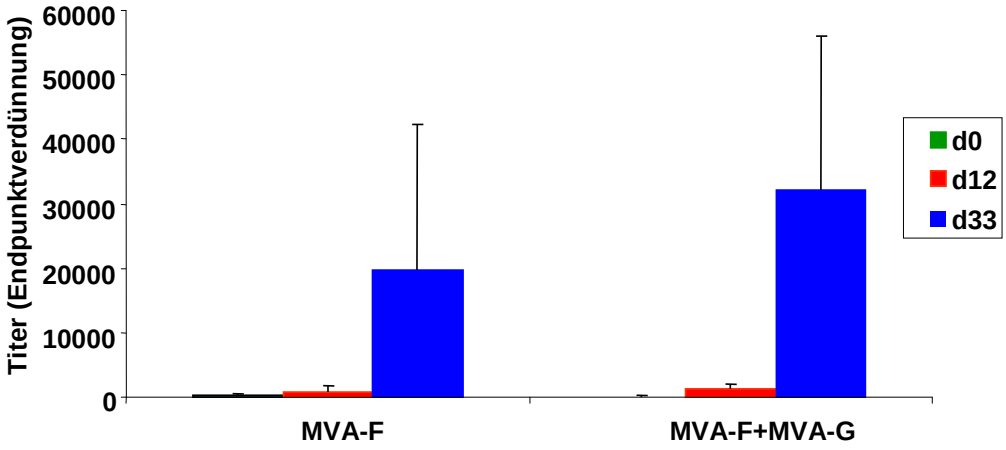


Abbildung 74: Durchschnittliche Anti-Vaccinia-Antikörpertiter im Vergleich an den Tagen 0, 12 und 33. Legende siehe Abbildung 73

4.4.2.3 F-spezifische Antikörperantworten in den immunisierten Kälbern

In diesem ELISA konnten F-spezifische Antikörper in den einzelnen Tieren und Gruppen vor und nach Immunisierung, sowie nach der darauf folgenden Infektion nachgewiesen werden.

Die F-spezifischen Titer der einzelnen Tiere der MVA-F-immunisierten Gruppe lagen im Durchschnitt bei 1:320 vor der Infektion mit BRSV (d126). Die Antikörperantworten der MVA-F- + MVA-G-immunisierten Tiere stiegen bei den meisten Tieren schon am Tag 40 nach Immunisierung auf 1:640. Die Tiere der Kontrollgruppe PBS, bei welchen die Impfung nur mit Pufferlösung erfolgte zeigten auch nach Immunisierung keine F-spezifischen Antikörperantworten. Abbildung 75 zeigt eine Übersicht über die verschiedenen Gruppen und deren F-spezifischen Titer.

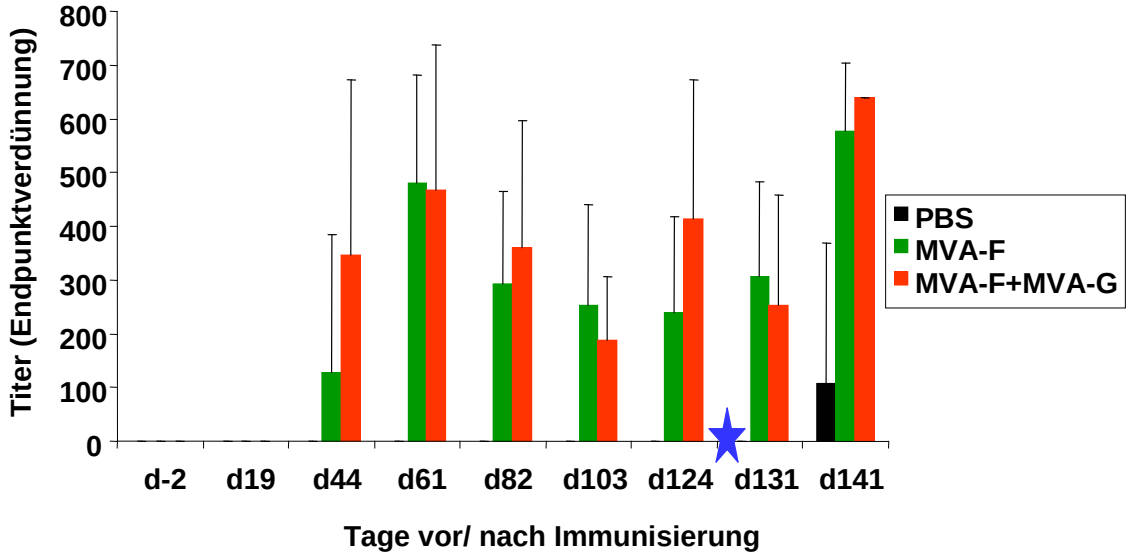


Abbildung 75: Durchschnittliche BRSV-F-spezifische Antikörpertiter. Dargestellt sind die durchschnittlichen Antikörpertiter von je 6 Kälbern pro Gruppe. Die Werte der Tage -2 (d-2) bis 141 (d141) sind mit Standardabweichung dargestellt. Der blaue Stern markiert den Zeitpunkt der BRSV-Infektion am Tag 126.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte die Brauchbarkeit von rekombinantem MVA zur Entwicklung von Impfstoffen gegen Infektionen mit Respiratorischen Synzytialviren untersucht werden. Hierzu erfolgte die Herstellung rekombinanter MVA, welche die BRSV-Oberflächen-Glykoproteine F und G des Stammes Odijk exprimieren. Diese Viren wurden anschließend virologisch charakterisiert und *in vivo* in einem Kälber-BRSV-Infektionsmodell als Impfstoff getestet.

Des Weiteren wurden Impfstoffe auf der Basis rekombinanter MVA, die die F- und G-Gene von HRSV exprimieren in einem Maus-HRSV-Infektionsmodell getestet (freundlicherweise von B. Moss, NIH, Bethesda, USA zur Verfügung gestellt (WYATT et al. 1999)).

5.1 MVA-BRSV rekombinante Viren

Die Untersuchung neuer experimenteller Impfstoffe basiert auf der Annahme, dass gegen diese Oberflächenantigene-gerichtete Immunantworten ausreichend sein sollten, um schützende Immunität nach Impfung zu induzieren. Die Ergebnisse der Charakterisierung anderer MVA-Testimpfstoffe gegen andere virale Erreger von respiratorischen Erkrankungen unterstützten diese These (SUTTER et al. 1994b; STITTELAAR et al. 2001; BISHT et al. 2004). Die Beurteilung der prinzipiellen Eignung rekombinanter MVA erfordert zuerst eine sorgfältige *in vitro*-Charakterisierung. Wie sich in dieser Arbeit zeigte, sind gerade diese virologischen Untersuchungen von größter Bedeutung, um wirklich brauchbare Testimpfstoffe für die *in vivo*-Prüfung auszuwählen.

5.1.1 Wachstumsverhalten der rekombinanten MVA-BRSV

Die virologische Charakterisierung rekombinanter MVA schließt die Durchführung von Experimenten zur vergleichenden Untersuchung der Vermehrungsfähigkeit der Viren ein. Mit Hilfe dieser Experimente kann möglicher Einfluss der Fremdgeninsertion auf die Replikationsfähigkeit von MVA festgestellt werden.

Die Durchführung von Ein-Schritt- bzw. Mehr-Schritt-Wachstumsanalysen hat sich dabei als das derzeit anerkannte beste Untersuchungsverfahren erwiesen (STAIB et al. 2004).

Mit einer Ein-Schritt-Wachstumskurve kann die Menge der gebildeten Viruspartikel pro Zelle untersucht werden, während mit der Mehr-Schritt-Wachstumskurve zusätzlich auch die Zell- zu Zellausbreitung der gebildeten Viruspartikel überprüft werden kann.

Bei der Untersuchung des Replikationsvermögens der rekombinanten MVA auf HEF-Zellen im Vergleich zu MVAwt (siehe 4.1.4.3), zeigte MVA-BRSV-G sowohl im Ein-Schritt-Experiment, wie auch in der Mehr-Schritt-Analyse ein vermindertes Wachstum, d.h. es wurden weniger infektiöse Viruspartikel pro Zelle neu gebildet. Eine solche Wachstumseinschränkung könnte sich vor allem im Hinblick auf eine im industriellen

Maßstab durchzuführende Impfstoffproduktion als nachteilig erweisen. Bereits 1996 beschrieben WYATT et al. (WYATT et al. 1996) eine ähnliche Beobachtung bei der Konstruktion von rekombinanten Vacciniaviren zur Expression von Parainfluenzavirus 3 Genen. Hierbei wurde festgestellt, dass MVA, wie auch in größerem Ausmaß Vacciniavirus Western Reserve (WR), welche das Hämagglutinin-Neuraminidase-Gen (HN) und das Fusion Gen (F) unter der Kontrolle des starken synthetischen Vacciniapromotors sP exprimierten, eine vermindertes Vermehrungsfähigkeit zeigten. Da dieses Phänomen bei Vektorviren aus zwei unterschiedlichen Stämmen von Vacciniavirus, unter Verwendung von verschiedenen Insertionsstellen im Virusgenom und bei Experimenten mit verschiedenen Zelllinien, festgestellt wurde, lag die Annahme nahe, dass zumindest eines der neu gebildeten Proteine die Ursache für die Wachstumshemmung sein könnte. Unterstützend hierfür sind Hinweise, dass eine Überexpression von rekombinanten Glykoprotein zytotoxische Wirkung haben kann (ORY et al. 1996; YOSHIDA et al. 1997; GAGNON et al. 2003; ZHANG et al. 2004). Daraufhin konstruierten WYATT et al. (1996) MVA, welche nur eines der beiden Proteine unter der Kontrolle des sP enthielten. Hierbei stellte sich heraus, dass das MVA-PIV-F ein normales Wachstums zeigte, während MVA-PIV-HN in seiner Replikation stark eingeschränkt war. 1986 hatten SPRIGGS et al. bereits ein rekombinantes WR Vacciniavirus hergestellt, welches das PIV3-HN-Gen unter der Kontrolle des Vacciniavirus-spezifischen Promotors P7.5 exprimierte. Da bei diesem Virus keine Wachstumseinschränkungen bekannt waren (SPRIGGS et al. 1986), vermutete WYATT und Mitarbeiter (1996), dass die Replikationsdefizienz des MVA-PIV-HN-Virus mit dem Gebrauch des synthetischen Promotors sP zusammen hängen könnte. Diese Annahme wurde durch die Konstruktion eines weiteren MVA-PIV3-HN, welches das HN-Gen unter der Kontrolle des transkriptionell moderateren modifizierten Vacciniapromotors PmH5 enthielt, bestätigt. Das neu konstruierte MVA-PmH5-PIV3-HN replizierte auf HEF-Zellen genauso effizient wie das nicht rekombinante MVAwt (WYATT et al. 1996).

Bei der Charakterisierung von rekombinanten Vacciniaviren sind daher die Unterschiede in der Transkriptionsstärke von Vacciniapromotoren ebenfalls von Interesse. WYATT et al. (1996) prüften die Expression des *E. coli* lacZ-Gens in Vacciniavirus Western Reserve Rekombinanten (rWR), jeweils unter der Kontrolle der Vaccinia-Tandempromotoren PmH5, P7.5, sP oder dem späten Vacciniapromotor P11 standen (WYATT et al. 1996). Nach der Infektion von BS-C-1-Zellen erfolgte die Testung der ß-Galaktosidase-Enzymaktivität in der Anwesenheit und Abwesenheit eines Inhibitors der viralen DNA-Replikation getestet. Somit konnte die Aktivität der nur frühen viralen Genexpression im Vergleich zu der Aktivität von früher und später pockenviraler Expression untersucht werden. In der Abwesenheit des Inhibitors (= frühe + späte Genexpression) war die Aktivität der Promotoren in absteigender Reihenfolge sP → P11 → PH5 → P7.5. In der Anwesenheit des Inhibitors

(= nur frühe Genexpression) war die Aktivität wie folgt: PmH5 → sP → P7.5 → P11. Der Vacciniapromotor PmH5 ist somit als sehr starker früher Promotor und eher moderater später Promotor einzuschätzen, während der P7.5 als moderat aktiver früher Promotor und eher schwacher später Promotor anzusehen ist (WYATT et al. 1996).

Das erste in dieser Arbeit beschriebene und als replikationsdefizient befundene MVA-BRSV-G exprimiert das Glykoprotein G-Gen (BRSV-G) unter der Kontrolle des modifizierten Vacciniapromotors PmH5 inseriert in die Deletion VI des MVA-Genoms. Die Feststellung der Ursache der verminderten Wachstumsfähigkeit konnte durch die Herstellung von revertanten Viren (MVA-ΔBRSV-G, siehe 4.2.2) vorangetrieben werden. Die Untersuchung dieser Revertanten ermöglichte es, unabhängig aufgetretene Veränderungen im MVA-Genom des MVA-BRSV-G auszuschließen. Daher wurde für weitere Untersuchungen das neue rekombinante MVA konstruiert, welches das BRSV-G-Gen unter der Kontrolle des moderaten Vacciniapromotors P7.5 (MVA-BRSV-Gneu, siehe 4.3.1) enthielt. Mit diesem Virus sollten mögliche Einflüsse der Überexpression des BRSV-G unter der Kontrolle des starken PmH5-Promotors untersucht werden.

Das revertante MVA-ΔBRSV-G, wie auch das neue Vektorvirus MVA-BRSV-Gneu zeigten keine Wachstumsunterschiede im Vergleich mit Wildtyp MVA auf. Hiermit konnten eventuell aufgetretene genetische Veränderungen, wie Deletionen oder Mutationen, im Genom des MVA-BRSV-G als Ursache für Wachstumshemmung eindeutig ausgeschlossen werden. Mit der Wachstumsuntersuchung des MVA-BRSV-Gneu konnte belegt werden, dass die Stärke des Promotors bzw. daraus folgend auch die Menge des gebildeten G durch das rekombinante MVA, wie schon von WYATT et al. (1996) für das MVA-PIV3-HN beschrieben und die MVA-Replikation stört (WYATT et al. 1996). Ob eine direkte toxische Wirkung des BRSV-G-Proteins hierfür verantwortlich sein könnte, bleibt durch weitere Untersuchungen zu klären (WYATT et al. 1996).

5.1.2 Immunogenität und Schutzwirkung der MVA-BRSV-Impfstoffe.

5.1.2.1 Rindermodell

Die *in vivo*-Testung der MVA-BRSV-Rekombinanten erfolgte in einem Kälber Infektionsmodell. In Abbildung 18 (Seite 68) ist das Immunisierungs- und Infektionsschema dargestellt. Die Impfung der Kälber erfolgte jeweils zweimal im Abstand von drei Wochen mit 1x 10^8 pfu und nach 18 Wochen erfolgte eine Belastungsinfektion mit BRSV des Stammes Odijk. Die verschiedenen Untersuchungen, welche aus den Proben, die während des Experiments gewonnen wurden, durchgeführt werden sollten, sind in 3.2.4.2 auf Seite 67 aufgeführt.

Klinische Parameter nach BRSV-Belastung, wie die rektale Körpertemperatur der Kälber, konnten eine Schutzwirkung der MVA-BRSV-Impfstoffkandidaten besonders deutlich zeigen. Die MVA-geimpften Tiere zeigten lediglich moderate Erhöhungen der Körpertemperatur während in der PBS-immunisierten Kontrollgruppe, alle Tiere Fieber entwickelten. Für die Wirksamkeit des MVA-Impfstoffes spricht auch, dass bei der Testung verschiedener anderer BRSV-Impfstoffkandidaten im Kälbermodell bedeutend höhere Körpertemperaturen nach der Belastungsinfektion festgestellt werden konnten (WEST et al. 1999).

Serumproben der Kälber konnten schon vor Ablauf des *in vivo* Abschnittes des Experiments auf ihren Gehalt an Vaccinia-spezifischen Antikörpern nach der ersten und zweiten Immunisierung untersucht werden. Die Titer nach der ersten Immunisierung stiegen in der MVA-BRSV-F-immunisierten Gruppe im Durchschnitt auf 1:640 und in der MVA-BRSV-F- und MVA-BRSV-G-immunisierten Gruppe auf 1:1260. Diese Vaccinia-spezifischen Antikörperantworten konnten nach der zweiten Immunisierung drastisch verstärkt werden (Titer von 1:16000 bis 1:32000). Diese Vaccinia-spezifischen Antikörpertiter liegen im Bereich von Antikörperantworten, die nach MVA-Impfung in anderen Tiermodellen zur Prüfung Orthopockenvirus-spezifischer Immunität gemessen werden konnten (STITTELAAR et al. 2001; WYATT et al. 2004; COULIBALY et al. 2005; MESEDA et al. 2005). Die Untersuchungen boten die Möglichkeit schon vor Abschluss des Experiments bzw. vor der BRSV-Infektion der Kälber den prinzipiellen Erfolg der Immunisierung zu überprüfen und zu bestätigen. Die F-spezifischen Antikörperantworten der MVA-F-immunisierten Gruppe lagen im Durchschnitt bei 1:320, bei den MVA-F- + MVA-G-immunisierten Tiere stiegen die Titer schon am Tag 40 nach Immunisierung auf 1:640. Die mit den rekombinanten MVA-induzierbaren F-spezifischen Antikörperantworten bewegen sich damit in demselben Bereich wie nach Impfung mit lebend BRSV-Impfstoff oder FI-BRSV (ANTONIS et al. 2003).

5.2 MVA-HRSV-Rekombinante

Die Untersuchung der rekombinanten MVA-HRSV-Viren, welche die Oberflächenproteine F und G der Respiratorischen Synzytialviren des Menschen (HRSV) produzieren, erfolgte in einem Immunisierungs-Infektionsexperiment in BALB/c-Mäusen in Zusammenarbeit mit Dr. Wieslawa Olszewska und Prof. Dr. Peter Openshaw vom Imperial College in London, England. Hierbei wurden die Mäuse zweimal im Abstand von 3 Wochen mit MVA-HRSV-F (MVA-F), MVA-HRSV-G (MVA-G), MVAwt mit jeweils 1x 10^8 pfu geimpft und zusätzlich eine Gruppe mit Formalin-inaktiviertem RSV A2 (FI-RSV) immunisiert. Nach weiteren drei Wochen erfolgte eine Infektion mit HRSV-Subtyp A2.

5.2.1 Immunogenität und Schutzwirkung der MVA-HRSV-Impfstoffe

Das Infektionsmodell in BALB/c-Mäusen konnte zeigen, dass die Immunisierung mit rekombinanten MVA, welche die HRSV-Oberflächenproteine F und G exprimieren, im Vergleich zum FI-HRSV-Impfstoff (Formalin inaktiviertem RSV) eine stärker T_H1-gerichtete Immunantwort anregen. Die ausgeglicheneren IGg1- und IgG2a-Antikörperantworten (siehe Abbildung 67), die höhere IL-12-Werte in der Lunge (siehe Abbildung 70), die höhere Zahl an IFN-γ-produzierenden Zellen, welche weniger IL-4 und IL-5 produzierten (siehe Abbildung 68), weisen auf eine T_H1-gerichtete Immunantwort hin. Keines der Tiere, das mit MVA-F immunisiert wurde entwickelte eine Lungen-Eosinophilie (siehe Abbildung 71) Bei den mit MVA-G-immunisierten Mäusen, zeigten von 5 Mäusen nur zwei Tiere 2 bis 3% eosinophile Granulozyten in der Lunge, diese Tiere wiesen auch die höchsten Werte an IL-4 und IL-5 sowie die niedrigsten IFN-γ-sekretierenden Zellen auf. Im Gegensatz dazu induzierte die FI-RSV-Immunisierung nur mittelmäßige IFN-γ-, IL-12- und IL-18-Level, während die IL-4-, IL-5- und IL-13-Werte signifikant höher lagen als in allen anderen Impfgruppen. Die niedrigen T_H1-und die hohen T_H2-assoziierten Zytokinwerte korrelierten mit der starken Lungen-Eosinophilie.

Ein RSV-spezifischer Impfstoff sollte vor allem vor der Replikation des Virus in den Lungen schützen. Zwei Tage nach der Infektion mit RSV konnten zwar noch in allen Tieren Virus aus den Lungen isoliert werden, aber schon zwei Tage später waren in den MVA-F- und MVA-G-immunisierten Tiere, wie in den FI-RSV geimpften Mäusen, keine infektionstüchtigen RSV in den Lungen nachweisbar. Nur in der Gruppe, welche MVAwt als Impfstoff erhalten hatten, konnte am 4. Tag nach der Infektion noch RSV aus den Lungen isoliert werden.

Alle drei Impfstoffe führten nach der Infektion zu einem Gewichtsverlust bei den Mäusen. Nur die Mäuse der Kontrollgruppe, welche MVAwt erhielten zeigten nach der Infektion keinen Gewichtsveränderungen. Allerdings zeigten die Zytokin- und Antikörperantworten eine klare T_H1-gerichtete Immunantwort, was vermuten lässt, dass das induzierte klinische Bild durch einen anderen Mechanismus ausgelöst wird, als bei der T_H2-gerichteten Immunpathogenese durch FI-RSV.

MVA exprimiert, im Gegensatz zu anderen Vacciniaviren, keine löslichen viralen Rezeptoren/Inhibitoren für IFN-γ, IFN-α/β, Tumornekrosefaktor und CC Chemokine, sondern induziert nach Infektion selbst hohe Mengen an Typ 1-Interferonen (BLANCHARD et al. 1998; HORNEMANN et al. 2003; ISHII et al. 2005). Im HRSV-Mausmodell können hohe IL-12-Werte, IFN-γ-Werte erhöhen, die IL-4- und –5-Expression vermindern und die Lungen-Eosinophilie verhindern (HUSSELL et al. 1997). Außerdem unterstützt IL-18 die T_H1-gerichtete Immunantwort von IL-12 (NAKANISHI et al. 2001). In den MVA-Impfgruppen wurden hohe IL-12- und IL-18-Werte in den Lungen nachgewiesen (siehe Abbildung 69 und Abbildung 70).

Die RSV-Immunpathogenese ist mit der Produktion von T_H2-Zytokinen assoziiert (GRAHAM et al. 1993; WARIS et al. 1996; DE SWART et al. 2002; LEGG et al. 2003). In allen MVA-Gruppen konnten keine hohen T_H2-Zytokine nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur FI-RSV-Immunisierung, begünstigten beide Impfstoffe, MVA-F und MVA-G, die Produktion von IFN-γ, IL-12 und IL-18.

WARIS et al. konnten 1996 mit Vacciniavirus Western Reserve Vektoren, welche das HRSV-G und –F-Protein exprimieren (rWR-G, rWR-F) in Mäusen zeigen, dass rWR-F eine $CD8^+$-T-Zellantwort mit T_H1-gerichteter Immunantworten, während rWR-G eine starke $CD4^+$-T-Zellantwort und T_H2-gerichtete Immunantworten induziert (WARIS et al. 1996). Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten mit MVA-F, ähnliche Immunantworten, wie Waris et al. mit rWR-F, nachweisen. Jedoch ist die T_H2-gerichtete Immunantwort auf eine Impfung mit rWR-G, mit MVA-G nicht induzierbar. Somit lieferten diese Experimente mit MVA-HRSV-G keine Hinweise auf eine G-Protein-assoziierte Immundysregulation.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass der FI-RSV-Impfstoff zwar hoch immunogen ist und somit die RSV-Replikation in den Mäusen partiell unterbinden kann, jedoch induziert er eine schwere Immunpathogenese, welche mit einer starken Lungen-Eosinophilie, geringen T_H1-und erhöhten T_H2-assoziierten Zytokinproduktion verbunden ist. Im Gegensatz dazu begünstigte die MVA-F- oder MVA-G-Immunisierung eine ausgewogene humorale Immunantwort, T_H1-assoziierte Zytokinproduktion und keine Induktion von Eosinophilen in den Lungen. Es scheint als ob die RSV-Erkrankung und Immunpathogenese nicht eine Folge von unkontrollierter RSV-Replikation ist, sondern eher auf einer Immundysregulation beruht, welche zu mindestens partiell auf die RSV-Proteine selbst zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate anderer Untersuchungen in Mäusen (GRAHAM et al. 1993; WARIS et al. 1996) und in Makakenaffen (DE SWART et al. 2002).

5.3 Was spricht für MVA als RSV-Impfstoff

Als einer der größten Vorteile von MVA als Impfvektor gilt seine Replikationsdefizienz. Diese wurde durch Wachstumsuntersuchungen auf verschieden Zelllinien eingehend erforscht (MEYER et al. 1991; SUTTER und MOSS 1992; CARROLL und MOSS 1997; DREXLER et al. 1998; BLANCHARD et al. 1998). Die *in vitro*-Replikationsdefizienz wird in Beobachtungen in *in vivo*-Experimenten bestätigt: z.B. die Unfähigkeit der Bildung von Pockenläsionen nach Skarifizierung oder intradermaler Applikation von MVA (STICKL und HOCHSTEIN-MINTZEL 1971); die Avirulenz in Erwachsenen, Neugeborenen oder bestrahlten Mäusen (WERNER et al. 1980; MEYER et al. 1991); die Sicherheit in immunsupprimierten Makaken (STITTELAAR et al. 2001); die sehr schnelle Eliminierung von MVA in Mäusen nach intraperitonealer Applikation (RAMIREZ et al. 2000). In den letzten Jahren wurden mehrere Impfstoffkandidaten in ersten klinischen Studien geprüft (HILL et al. 2000; CORONA GUTIERREZ et al. 2002; HANKE et al. 2003;

MCCONKEY et al. 2003; COSMA et al. 2003). Die unschädliche Verabreichung von hohen Dosen rekombinantem MVA an HIV-infizierte Individuen, zeigte deutlich das hohe Sicherheitsprofil dieses Vektorsystems (COSMA et al. 2003; HARRER et al. 2005). Damit ist MVA auch ein viel versprechender Vektorkandidat für die Entwicklung von hochimmunogenen aber ausreichend gut verträglichen Impfstoffen bei Kleinkindern, welche bei der RSV-Infektion die Zielgruppe darstellen.

Eine weitere vorteilhafte Eigenschaft ist, dass MVA, trotz seiner Replikationsdefizienz in humanen und in den meisten Säugetier-Zellen, rekombinante Proteine auf der Basis aller Vacciniavirus-spezifischen Genklassen exprimieren und sowohl humorale als auch zelluläre Immunantworten induzieren kann.

Bei Säuglingen und Kleinstkindern, wie auch bei Kälbern, stellen vorhandene maternale Antikörper im Serum der Patienten ein Problem bei Impfungen dar. Impfstoffe können durch maternale Antikörper inaktiviert werden können. Im Jahr 2000 testeten ZHU et al. rekombinante Vacciniaviren, die die Masernvirus-Oberflächenproteine F und H exprimierten, in neugeborenen Rhesusaffen mit maternalen Antikörpern gegen Masernvirus oder mit passiv übertragenen Immunglobulinen. Die Impfung zeigte zwar Einbussen in ihrer Wirksamkeit, d.h. die humoralen Immunantworten, sowie die zytotoxischen T-Zellantworten (CTL) waren reduziert, trotzdem konnten nach Belastungsinfektion mit Masernvirus geringere Viruslast und Krankheitserscheinungen bei den Neugeborenen festgestellt werden (ZHU et al. 2000). Somit konnte durch rekombinante Pockenvirusvektoren auch bei Vorhandensein von maternalen Antikörpern ein gewisser Schutz bzw. ein leichterer Verlauf der Erkrankung erreicht werden.

In ähnlicher Weise kann eine Orthopockenvirus-spezifische Immunität die Wirksamkeit der rekombinanten Vacciniavirus-Impfstoffe beeinträchtigen. Die Verwendung verschiedener Impfrouten oder von kombinierten Immunisierungsprotokollen zur Erstanregung Antigen-spezifischer Antworten kann hier jedoch Abhilfe schaffen (BELYAKOV et al. 1999; RAMIREZ et al. 2000).

Im Jahr 2000 verglichen RAMIREZ et al. die B- und T-Zellantworten von MVA-Rekombinanten im Vergleich zu Vacciniavirus Western Reserve-(WR-)Rekombinanten in BALB/c-Mäusen. Die Expression der Fremdantigene war nach sechs Stunden in den MVA-infizierten Tieren höher als in WR-infizierten Mäusen. Die Autoren konnten zeigen, dass die zellulären Immunantworten auf ein Fremdantigen mit MVA sogar höher waren, als mit WR. MVA-induzierte eine T_H1-gerichtete Immunantwort und die proinflammatorische Zytokine IL-6 und Tumornekrosefaktor (RAMIREZ et al. 2000). Die Tatsache, dass MVA die Fähigkeit verloren hat, viele Vacciniavirus-spezifische Immunevasionsfaktoren zu produzieren, spricht ebenfalls für eine bessere Impfstoffeignung des MVA. In der Tat zeigten bereits erste Untersuchungen von rekombinanten MVA-Impfstoffen im Vergleich zu

herkömmlichen Vacciniavektoren eine bessere Immunogenität der rekombinanten MVA (SUTTER et al. 1994b; HIRSCH et al. 1996). Nichtsdestotrotz findet sich noch eine Reihe von aktiven Virusgenen im MVA-Genom, deren Produkte immuninhibierende Wirkung haben könnten. Es besteht also sogar die Möglichkeit, dass durch weitere gezielte gentechnologische Modifikationen in Zukunft noch wirksamere MVA-Impfstoffe entwickelt werden könnten. STAIB et al. präsentierten 2005 eine MVA-Mutante, die durch Inaktivierung des IL1β-Rezeptorgens, eine höhere Virus-spezifische $CD8^+$-Gedächtnis-T-Zellantwort anregen konnte. Diese Mutante könnte ebenfalls als erste Grundlage für die schrittweise Herstellung zukünftiger MVA-Vektoren genutzt werden (STAIB et al. 2005).

Schließlich ist die Möglichkeit MVA mit heterologen Impfsystemen zu kombinieren ein weiterer Vorteil. Experimente mit kombinierten Impfungen zeigen, dass MVA eine sehr effektive Vakzine zur Amplifikation von z.B. durch DNA-Vakzinierung erstinduzierten Immunantworten ist (SCHNEIDER et al. 1998; MCCONKEY et al. 2003; MOORTHY et al. 2003; BERTLEY et al. 2004; GHERARDI et al. 2004; AMARA et al. 2005). Somit könnte eine Kombination verschiedener Impfvektoren genutzt werden um die Immunogenität, insbesondere von Problemantigenen (wie z.B. HIV-und RSV-Antigenen) zu verstärken.

5.4 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass rekombinante MVA-Viren durchaus als neuartige Impfstoffe gegen Infektionen mit Respiratorischen Synzytialviren genutzt werden könnten. Wichtige Erkenntnisse schließen hierbei ein:

(i) RSV-Zielantigene, wie z. B. die Glykoproteine F und G der Virushülle, können mit Hilfe rekombinanter MVA-Viren effizient synthetisiert und verabreicht werden;

(ii) die Herstellung von Vektorviren mit großer genetischer Stabilität und unbeeinträchtigter Vermehrungsfähigkeit, ermöglicht prinzipiell eine Impfstoffproduktion im industriellen Maßstab;

(iii) die MVA-vermittelte Verabreichung von RSV-Antigenen (insbesondere das F-Antigen) induziert im Mausmodell eher T_H1-gerichtete bzw. ausgeglichene T_H1/T_H2-Immunantworten und scheint somit deutlich weniger anfällig für eine RSV-Antigen assoziierte Immunpathogenese als z.B. Impfstoffe auf der Grundlage von mit Formalin-inaktivierten RSV;

(iv) schließlich sind die ersten Ergebnisse aus der *in vivo*-Untersuchung von MVA-BRSV-Testimpfstoffen in Kälbern viel versprechend hinsichtlich der Impfstoffsicherheit beziehungsweise -verträglichkeit, sowie hinsichtlich einer Schutzwirkung bei Belastungsinfektion.

5.5 Ausblick

Zukünftige Untersuchungen von MVA-BRSV- beziehungsweise MVA-HRSV-Testimpfstoffen im Rindermodell bzw. im Makakenmodell werden noch neue Aufschlüsse zur Eignung und Optimierung dieser Impfstoffkandidaten geben. Gleichzeitig könnten diese Versuche auch zur besseren Aufklärung der Mechanismen der RSV-assoziierten Immunpathogenese, bei Mensch und Rind, beitragen. In erster Linie erscheint in solchen Experimenten jedoch die Prüfung von weiteren RSV-Antigenen, die Verwendung verschiedener Applikationsrouten (z.B. intranasale Verabreichung) sowie die kombinierte Anwendung von MVA-Impfstoffen und heterologen RSV-spezifischen Vakzinen (z.B. DNA-Impfstoffen, rekombinanten Adenoviren etc.) als sehr viel versprechend.

6 Zusammenfassung

Yasemin Süzer

Untersuchung von rekombinantem Vacciniavirus MVA zur Entwicklung von Impfstoffen gegen Infektionen mit Respiratorischen Synzytialviren

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

und

Abteilung Virologie des Paul-Ehlich-Instituts

Eingereicht im Januar 2007

189 Seiten, 75 Abbildungen, 4 Tabellen, 335 Literaturangaben, 1 Anhang

Schlüsselwörter: Modifiziertes Vacciniavirus Ankara (MVA), Respiratorische Synzytialviren (RSV), Pockenvirus, Vektorimpfstoff, Tiermodell

In dieser Arbeit wurden Vektorimpfstoffe auf der Basis rekombinanter Vacciniaviren hinsichtlich ihrer Eignung zur Immunisierung gegen Infektionen mit Respiratorischen Synzytialviren (RSV) untersucht.

Hierfür standen genetisches Material und Viruspräparationen des Respiratorischen Synzytialvirus des Rindes (BRSV, Stamm Odijk) sowie des Respiratorischen Synzytialvirus des Menschen (HRSV, Subtyp A2) sowie rekombinante Vacciniaviren MVA-HRSV-F bzw. MVA-HRSV-G zur Verfügung.

Rekombinante MVA-Viren, welche die Gene der BRSV-Oberflächenproteine G und F (MVA-BRSV-F, MVA-BRSV-G, MVA-BRSV-Gneu), sowie Viren in welchen die Fremdgensequenzen durch Deletion wieder entfernt sind (Revertante Viren MVA-ΔBRSV-F und MVA-ΔBRSV-G), wurden gentechnologisch hergestellt. Alle rekombinanten MVA-Viren wurden molekular-virologisch charakterisiert und dienten zur Gewinnung und Prüfung von Testimpfstoffen im Tiermodell. Die Untersuchungen zeigen:

1. Alle neu konstruierten rekombinanten MVA-BRSV-Viren produzierten nach Infektion von Zellkulturen die erwünschten Zielantigene, die BRSV-Glykoproteine F und G. Für das durch MVA-Expression hergestellte BRSV-F-Glykoprotein konnte außerdem die biologische Funktionalität in einem Fusionstest in infizierten HeLa-Zellen nachgewiesen werden.

2. Die Charakterisierung der Genome aller MVA-BRSV- sowie MVA-HRSV-Vektorviren bestätigte die exakte Insertion der Fremdgensequenzen im anvisierten Genombereich und zeigte die genetische Stabilität der Virusisolate nach Passagierung.

3. Bei der Untersuchung des Wachstumsverhaltens von MVA-BRSV-F und MVA-BRSV-G zeigte sich die eingeschränkte Vermehrungsfähigkeit des Virus MVA-BRSV-G. Die Konstruktion und Untersuchung der revertanten Viren MVA-ΔBRSV-F und MVA-ΔBRSV-G belegte die Koproduktion des G-Proteins als Ursache des verminderten Replikationsvermögens. Dieser für ein mögliches Impfvirus erhebliche Nachteil konnte durch die Verwendung eines moderateren Vacciniavirus-Promotors zur Fremdgenexpression (rekombinantes Virus MVA-BRSV-Gneu) behoben werden.

4. Die Prüfung von Testimpfstoffen auf der Grundlage der rekombinanten MVA-HRSV-Viren in einem Maus-HRSV-Infektionsmodell zeigte, dass MVA-HRSV-Impfstoffe, im Gegensatz zu Impfstoffen aus mit Formalin-inaktiviertem HRSV, Immunantworten mit einem ausgewogenen T_H1/T_H2-assoziierten Zytokinprofil induzierten. Eine infolge von Immunisierung verstärkte Einwanderung eosinophiler Zellen (Marker für Immunpathogenese) in die Lungen HRSV-infizierter Tiere, konnte nach MVA-Impfung nicht beziehungsweise in nur sehr geringem Ausmaß festgestellt werden (OLSZEWSKA *et al.* 2004).

5. Wichtige erste Daten hinsichtlich der Verträglichkeit, Immunogenität und Schutzwirkung rekombinanter Impfstoffe auf der Basis von MVA-BRSV-F und MVA-BRSV-G konnten in einem Kälber BRSV-Infektionsmodell erhoben werden. Die zweimalige Immunisierung mit MVA-Impfstoff verlief bei allen Tieren ohne feststellbare Nebenwirkungen und die Anregung Vaccinia- bzw. BRSV-F-spezifischer Antikörper bestätigte die Immunogenität der Vektorvakzinen. Schließlich belegten klinische Daten, insbesondere die fehlende Fieberreaktion bei Impflingen nach BRSV-Belastungsinfektion, die Schutzwirkung der MVA-BRSV-Impfstoffe.

Insgesamt unterstützen die erzielten Ergebnisse dieser Arbeiten die weitere präklinische und klinische Untersuchung von MVA-Vektorimpfstoffen zur wirksameren und sichereren Bekämpfung von Infektionen mit Respiratorischen Synzytialviren.

7 Summary

Yasemin Süzer

Evaluation and construction of recombinant modified vaccinia virus Ankara as candidate vector vaccine against infections with respiratory syncytial viruses

Institute for Animal Hygiene and Veterinary Public Health Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

and

Department of Virology, Paul-Ehrlich-Institute

Submitted in January 2007

189 pages, 75 figures, 4 tables, 335 references, 1 appendix

Keywords: modified vaccinia virus Ankara (MVA), respiratory syncytial virus (RSV), poxvirus, vector, animal model

This study investigated vector vaccines based on recombinant vaccinia virus MVA for their suitability to immunize against infections with respiratory syncytial viruses.

Genetic material and virus stocks of bovine respiratory syncytial virus (BRSV, Strain Odijk) and human respiratory syncytial virus (HRSV, Strain A2) and recombinant vaccinia viruses MVA-HRSV-F and MVA-HRSV-G were provided and used in this study.

The project work included the genetical engineering of recombinant MVA expressing gene sequences encoding the BRSV surface proteins G and F (MVA-BRSV-F, MVA-BRSV-G, MVA-BRSV-Gneu) and the secondary generation of mutant viruses in which recombinant gene sequences have been removed (revertant viruses MVA-ΔBRSV-F, MVA-ΔBRSV-G). All recombinant MVA were carefully characterized in *in vitro* experiments and served for generation of vaccine preparations being tested in animal model systems. The investigations demonstrate:

1. All recombinant MVA-BRSV viruses produced the target antigens (BRSV-F and -G proteins) upon tissue culture infections. Functional activity of BRSV-F protein was demonstrated in a cell fusion assay using virus-infected HeLa cells.

2. The characterization of the genomes of all MVA recombinant viruses confirmed the correct insertion of foreign gene sequences into the target site of the MVA genome and demonstrated the genetic stability of the vector viruses upon tissue culture passage.

3. *In vitro* studies on virus growth revealed a reduced replicative capacity of the recombinant virus MVA-BRSV-G. Construction and growth analysis of revertant viruses MVA-ΔBRSV-F and MVA-ΔBRSV-G demonstrated that over expression of BRSV-G protein caused this replication deficiency which could be avoided by using a more moderate vaccinia virus promoter for transcriptional control of recombinant gene expression (recombinant virus MVA-BRSV-Gneu).

4. Upon characterization in a mouse-HRSV challenge model candidate vaccines based on recombinant MVA-HRSV viruses, in contrast to formalin inactivated HRSV, and induced a well balanced T_H1 and T_H2 cytokine profile. In addition, none of the MVA-HRSV-F vaccinated animals and only two of the MVA-HRSV-G immunized mice showed low-level eosinophilia in the lungs after HRSV challenge infection (OLSZEWSKA *et al.* 2004).

5. Vaccination experiments in the calf-BRSV challenge model generated first relevant data on safety, immunogenicity and protective capacity of MVA-BRSV recombinant vaccines. The repeated application of MVA vaccine was well tolerated by all vaccinated animals and the induction of vaccinia- and BRSV-F-specific antibody responses confirmed the immunogenicity of the MVA vector vaccines. Moreover, clinical data (lack of fever response in vaccines) suggested the protective capacity of MVA-BRSV immunization upon BRSV challenge.

The obtained results from these studies clearly support further preclinical and clinical evaluation of recombinant MVA candidate vaccines to immunize against disease caused by RSV infections in cattle and humans.

8 Literaturverzeichnis

Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. The IMpact-RSV Study Group. Pediatrics. 1998;102:531-37.

Aberle JH, Aberle SW, Dworzak MN, Mandl CW, Rebhandl W, Vollnhofer G et al. Reduced interferon-gamma expression in peripheral blood mononuclear cells of infants with severe respiratory syncytial virus disease. Am J Respir Crit Care Med. 1999;160:1263-8.

Amann VL, Lerch RA, Anderson K, Wertz GW. Bovine respiratory syncytial virus nucleocapsid protein: mRNA sequence analysis and expression from recombinant vaccinia virus vectors. J Gen Virol. 1992;73:999-1003.

Amara RR, Sharma S, Patel M, Smith JM, Chennareddi L, Herndon JG et al. Studies on the cross-clade and cross-species conservation of HIV-1 Gag-specific CD8 and CD4 T cell responses elicited by a clade B DNA/MVA vaccine in macaques. Virology. 2005;334:124-33.

Amara RR, Villinger F, Altman JD, Lydy SL, O'Neil SP, Staprans SI et al. Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. Vaccine. 2002;20:1949-55.

Anderson JJ, Harrop JA, Peers H, Turnbull T, Toms GL, Scott R. Recognition of respiratory syncytial (RS) virus proteins by human and BALB/C CD4+ lymphocytes. J Med Virol. 1991;35:165-73.

Antoine G, Scheiflinger F, Dorner F, Falkner FG. The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. Virology. 1998;244:365-96.

Antonis AF, Schrijver RS, Daus F, Steverink PJ, Stockhofe N, Hensen EJ et al. Vaccine-induced immunopathology during bovine respiratory syncytial virus infection: exploring the parameters of pathogenesis. J Virol. 2003;77:12067-73.

Aoyagi M, Shimojo N, Sekine K, Nishimuta T, Kohno Y. Respiratory syncytial virus infection suppresses IFN-gamma production of gammadelta T cells. Clin Exp Immunol. 2003;131:312-7.

Atkins GJ, Sheahan BJ, Liljestrom P. Manipulation of the Semliki Forest virus genome and its potential for vaccine construction. Mol Biotechnol. 1996;5:33-38.

Babiuk LA, Lawman MJ, Ohmann HB. Viral-bacterial synergistic interaction in respiratory disease. Adv Virus Res. 1988;35:219-49.

Babu PG, Selvan A, Christuraj S, David J, John TJ, Simoes EA. A primate model of respiratory syncytial virus infection. Indian J Exp Biol. 1998;36:758-62.

Baez-Astua A, Herraez-Hernandez E, Garbi N, Pasolli HA, Juarez V, Zur HH et al. Low-dose adenovirus vaccine encoding chimeric hepatitis B virus surface antigen-human

papillomavirus type 16 E7 proteins induces enhanced E7-specific antibody and cytotoxic T-cell responses. J Virol. 2005;79:12807-17.

Baker JC, Werdin RE, Ames TR, Markham RJ, Larson VL. Study on the etiologic role of bovine respiratory syncytial virus in pneumonia of dairy calves. J Am Vet Med Assoc. 1986;189:66-70.

Baker JC, Wilson EG, McKay GL, Stanek RJ, Underwood WJ, Velicer LF et al. Identification of subgroups of bovine respiratory syncytial virus. J Clin Microbiol. 1992;30:1120-6.

Bangham CR, Cannon MJ, Karzon DT, Askonas BA. Cytotoxic T-cell response to respiratory syncytial virus in mice. J Virol. 1985;56:55-9.

Bangham CR, McMichael AJ. Specific human cytotoxic T cells recognize B-cell lines persistently infected with respiratory syncytial virus. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986;83:9183-7.

Barr J, Chambers P, Pringle CR, Easton AJ. Sequence of the major nucleocapsid protein gene of pneumonia virus of mice: sequence comparisons suggest structural homology between nucleocapsid proteins of pneumoviruses, paramyxoviruses, rhabdoviruses and filoviruses. J Gen Virol. 1991;72 (Pt 3):677-85.

Baxby D. Edward Jenner's Inquiry; a bicentenary analysis. Vaccine. 1999a;17:301-7.

Baxby D. The orgins of vaccinia virus--an even shorter rejoinder. Soc Hist Med. 1999b;12:139.

Beeler JA, van Wyke Coelingh K. Neutralization epitopes of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus: effect of mutation upon fusion function. J Virol. 1989;63:2941-50.

Belknap EB, Baker JC, Patterson JS, Walker RD, Haines DM, Clark EG. The role of passive immunity in bovine respiratory syncytial virus-infected calves. J Infect Dis. 1991;163:470-6.

Belshe RB, Richardson LS, London WT, Sly DL, Lorfeld JH, Camargo E et al. Experimental respiratory syncytial virus infection of four species of primates. J Med Virol. 1977;1:157-62.

Belyakov IM, Moss B, Strober W, Berzofsky JA. Mucosal vaccination overcomes the barrier to recombinant vaccinia immunization caused by preexisting poxvirus immunity. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96:4512-7.

Belyakov IM, Wyatt LS, Ahlers JD, Earl P, Pendleton CD, Kelsall BL et al. Induction of a mucosal cytotoxic T-lymphocyte response by intrarectal immunization with a replication-deficient recombinant vaccinia virus expressing human immunodeficiency virus 89.6 envelope protein. J Virol. 1998;72:8264-72.

Bembridge GP, Lopez JA, Bustos R, Melero JA, Cook R, Mason H et al. Priming with a secreted form of the fusion protein of respiratory syncytial virus (RSV) promotes interleukin-4 (IL-4) and IL-5 production but not pulmonary eosinophilia following RSV challenge. J Virol. 1999;73:10086-94.

Bendelja K, Gagro A, Bace A, Lokar-Kolbas R, Krsulovic-Hresic V, Drazenovic V et al. Predominant type-2 response in infants with respiratory syncytial virus (RSV) infection demonstrated by cytokine flow cytometry. Clin Exp Immunol. 2000;121:332-8.

Berthiaume L, Joncas J, Pavilanis V. Comparative structure, morphogenesis and biological characteristics of the respiratory syncytial (RS) virus and the pneumonia virus of mice (PVM). Arch Gesamte Virusforsch. 1974;45:39-51.

Bertley FM, Kozlowski PA, Wang SW, Chappelle J, Patel J, Sonuyi O et al. Control of simian/human immunodeficiency virus viremia and disease progression after IL-2-augmented DNA-modified vaccinia virus Ankara nasal vaccination in nonhuman primates. J Immunol. 2004;172:3745-57.

Bisht H, Roberts A, Vogel L, Bukreyev A, Collins PL, Murphy BR et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein expressed by attenuated vaccinia virus protectively immunizes mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101:6641-46.

Blanchard TJ, Alcami A, Andrea P, Smith GL. Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine. J Gen Virol. 1998;79 (Pt 5):1159-67.

Blount RE, Jr., Morris JA, Savage RE. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. Proc Soc Exp Biol Med. 1956;92:544-9.

Boelen A, Andeweg A, Kwakkel J, Lokhorst W, Bestebroer T, Dormans J et al. Both immunisation with a formalin-inactivated respiratory syncytial virus (RSV) vaccine and a mock antigen vaccine induce severe lung pathology and a Th2 cytokine profile in RSV-challenged mice. Vaccine. 2000;19:982-91.

Bose S, Malur A, Banerjee AK. Polarity of human parainfluenza virus type 3 infection in polarized human lung epithelial A549 cells: role of microfilament and microtubule. J Virol. 2001;75:1984-89.

Bossert B, Conzelmann KK. Respiratory syncytial virus (RSV) nonstructural (NS) proteins as host range determinants: a chimeric bovine RSV with NS genes from human RSV is attenuated in interferon-competent bovine cells. J Virol. 2002;76:4287-93.

Boyton RJ, Openshaw PJ. Pulmonary defences to acute respiratory infection. Br Med Bull. 2002;61:1-12.

Brandenburg AH, Groen J, van Steensel-Moll HA, Claas EC, Rothbarth PH, Neijens HJ et al. Respiratory syncytial virus specific serum antibodies in infants under six months of age: limited serological response upon infection. J Med Virol. 1997;52:97-104.

Brandenburg AH, Kleinjan A, van Het Land B, Moll HA, Timmerman HH, de Swart RL et al. Type 1-like immune response is found in children with respiratory syncytial virus infection regardless of clinical severity. J Med Virol. 2000;62:267-77.

Brandenburg AH, Neijens HJ, Osterhaus AD. Pathogenesis of RSV lower respiratory tract infection: implications for vaccine development. Vaccine. 2001;19:2769-82.

Brockman MA, Knipe DM. Herpes simplex virus vectors elicit durable immune responses in the presence of preexisting host immunity. J Virol. 2002;76:3678-87.

Bryson DG, McFerran JB, Ball HJ, Neill SD. Observations on outbreaks of respiratory disease in housed calves--(1) Epidemiological, clinical and microbiological findings. Vet Rec. 1978a;103:485-9.

Bryson DG, McFerran JB, Ball HJ, Neill SD. Observations on outbreaks of respiratory disease in housed calves--(2) Pathological and microbiological findings. Vet Rec. 1978b;103:503-9.

Bryson DG, McFerran JB, Ball HJ, Neill SD. Observations on outbreaks of respiratory disease in calves associated with parainfluenza type 3 virus and respiratory syncytial virus infection. Vet Rec. 1979;104:45-9.

Bryson DG, McNulty MS, Logan EF, Cush PF. Respiratory syncytial virus pneumonia in young calves: clinical and pathologic findings. Am J Vet Res. 1983;44:1648-55.

Buchholz UJ, Finke S, Conzelmann KK. Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. J Virol. 1999;73:251-59.

Buchholz UJ, Granzow H, Schuldt K, Whitehead SS, Murphy BR, Collins PL. Chimeric bovine respiratory syncytial virus with glycoprotein gene substitutions from human respiratory syncytial virus (HRSV): effects on host range and evaluation as a live-attenuated HRSV vaccine. J Virol. 2000;74:1187-99.

Burke E, Dupuy L, Wall C, Barik S. Role of cellular actin in the gene expression and morphogenesis of human respiratory syncytial virus. Virology. 1998;252:137-48.

Byrd LG, Prince GA. Animal models of respiratory syncytial virus infection. Clin Infect Dis. 1997;25:1363-8.

Cane PA, Pringle CR. Evolution of subgroup A respiratory syncytial virus: evidence for progressive accumulation of amino acid changes in the attachment protein. J Virol. 1995;69:2918-25.

Cannon MJ, Bangham CR. Recognition of respiratory syncytial virus fusion protein by mouse cytotoxic T cell clones and a human cytotoxic T cell line. J Gen Virol. 1989;70 (Pt 1):79-87.

Cannon MJ, Stott EJ, Taylor G, Askonas BA. Clearance of persistent respiratory syncytial virus infections in immunodeficient mice following transfer of primed T cells. Immunology. 1987;62:133-8.

Carroll MW, Moss B. Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line. Virology. 1997;238:198-211.

Cathomen T, Mrkic B, Spehner D, Drillien R, Naef R, Pavlovic J et al. A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain. EMBO J. 1998;17:3899-908.

Chambers P, Pringle CR, Easton AJ. Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins. J Gen Virol. 1990;71 (Pt 12):3075-80.

Chang J, Srikiatkhachorn A, Braciale TJ. Visualization and characterization of respiratory syncytial virus F-specific CD8(+) T cells during experimental virus infection. J Immunol. 2001;167:4254-60.

Chanock R, Roizman B, Myers R. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. Am J Hyg. 1957;66:281-90.

Cheng X, Park H, Zhou H, Jin H. Overexpression of the M2-2 protein of respiratory syncytial virus inhibits viral replication. J Virol. 2005;79:13943-52.

Collins PL, Chanock RM, Murphy BR. Respiratory Syncytial Virus. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, editors. Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 1443-1485.

Collins PL, Huang YT, Wertz GW. Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion (F) glycoprotein of human respiratory syncytial virus. Proc Natl Acad Sci U S A. 1984;81:7683-7.

Collins PL, Mottet G. Post-translational processing and oligomerization of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. J Gen Virol. 1991;72 (Pt 12):3095-101.

Collins PL, Purcell RH, London WT, Lawrence LA, Chanock RM, Murphy BR. Evaluation in chimpanzees of vaccinia virus recombinants that express the surface glycoproteins of human respiratory syncytial virus. Vaccine. 1990;8:164-8.

Collins RA, Camon EB, Chaplin PJ, Howard CJ. Influence of IL-12 on interferon-gamma production by bovine leucocyte subsets in response to bovine respiratory syncytial virus. Vet Immunol Immunopathol. 1998;63:69-72.

Corona Gutierrez CM, Tinoco A, Lopez Contreras M, Navarro T, Calzado P, Vargas L et al. 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. 2002;13:1127-40.

Cosma A, Buhler S, Nagaraj R, Staib C, Hammarin AL, Wahren B et al. Neutralization assay using a modified vaccinia virus Ankara vector expressing the green fluorescent protein is a

high-throughput method to monitor the humoral immune response against vaccinia virus. Clin Diagn Lab Immunol. 2004;11:406-10.

Cosma A, Nagaraj R, Buhler S, Hinkula J, Busch DH, Sutter G et al. Therapeutic vaccination with MVA-HIV-1 nef elicits Nef-specific T-helper cell responses in chronically HIV-1 infected individuals. Vaccine. 2003;22:21-29.

Coulibaly S, Bruhl P, Mayrhofer J, Schmid K, Gerencer M, Falkner FG. The nonreplicating smallpox candidate vaccines defective vaccinia Lister (dVV-L) and modified vaccinia Ankara (MVA) elicit robust long-term protection. Virology. 2005;341:91-101.

Crowe JE, Jr. Host responses to respiratory virus infection and immunization. Curr Top Microbiol Immunol. 1999;236:191-214.

Crowe JE, Jr. Influence of maternal antibodies on neonatal immunization against respiratory viruses. Clin Infect Dis. 2001a;33:1720-7.

Crowe JE, Jr. Respiratory syncytial virus vaccine development. Vaccine. 2001b;20 Suppl 1:32-7.

Dales S, Pogo BG. Biology of poxviruses. Virol Monogr. 1981;18:1-109.

Davis NL, Brown KW, Johnston RE. A viral vaccine vector that expresses foreign genes in lymph nodes and protects against mucosal challenge. J Virol. 1996;70:3781-87.

de Graaff PM, de Jong EC, van Capel TM, van Dijk ME, Roholl PJ, Boes J et al. Respiratory syncytial virus infection of monocyte-derived dendritic cells decreases their capacity to activate CD4 T cells. J Immunol. 2005;175:5904-11.

de Swart RL, Kuiken T, Timmerman HH, Amerongen Gv G, Van Den Hoogen BG, Vos HW et al. Immunization of macaques with formalin-inactivated respiratory syncytial virus (RSV) induces interleukin-13-associated hypersensitivity to subsequent RSV infection. J Virol. 2002;76:11561-9.

Domurat F, Roberts NJ, Jr., Walsh EE, Dagan R. Respiratory syncytial virus infection of human mononuclear leukocytes in vitro and in vivo. J Infect Dis. 1985;152:895-902.

Dreizin RS, Vyshnevetskaia LO, Bagdamian EE, Iankevich OD, Tarasova LB. [Experimental RS virus infection of cotton rats. A viral and immunofluorescent study]. Vopr Virusol. 1971;16:670-6.

Drexler I, Antunes E, Schmitz M, Wolfel T, Huber C, Erfle V et al. Modified vaccinia virus Ankara for delivery of human tyrosinase as melanoma-associated antigen: induction of tyrosinase- and melanoma-specific human leukocyte antigen A*0201-restricted cytotoxic T cells in vitro and in vivo. Cancer Res. 1999;59:4955-63.

Drexler I, Heller K, Wahren B, Erfle V, Sutter G. Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells. J Gen Virol. 1998;79 (Pt 2):347-52.

Earl PL, Americo JL, Wyatt LS, Eller LA, Whitbeck JC, Cohen GH et al. Immunogenicity of a highly attenuated MVA smallpox vaccine and protection against monkeypox. Nature. 2004;428:182-85.

Ellis JA, Philibert H, West K, Clark E, Martin K, Haines D. Fatal pneumonia in adult dairy cattle associated with active infection with bovine respiratory syncytial virus. Can Vet J. 1996;37:103-5.

Elvander M. Severe respiratory disease in dairy cows caused by infection with bovine respiratory syncytial virus. Vet Rec. 1996;138:101-5.

Elvander M, Vilcek S, Baule C, Uttenthal A, Ballagi-Pordany A, Belak S. Genetic and antigenic analysis of the G attachment protein of bovine respiratory syncytial virus strains. J Gen Virol. 1998;79 (Pt 12):2939-46.

Englund JA, Sullivan CJ, Jordan MC, Dehner LP, Vercellotti GM, Balfour HH, Jr. Respiratory syncytial virus infection in immunocompromised adults. Ann Intern Med. 1988;109:203-8.

Everard ML. What link between early respiratory viral infections and atopic asthma? Lancet. 1999;354:527-8.

Facciabene A, Aurisicchio L, La Monica N. Baculovirus vectors elicit antigen-specific immune responses in mice. J Virol. 2004;78:8663-72.

Fearns R, Collins PL. Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. J Virol. 1999;73:5852-64.

Feldman SA, Crim RL, Audet SA, Beeler JA. Human respiratory syncytial virus surface glycoproteins F, G and SH form an oligomeric complex. Arch Virol. 2001;146:2369-83.

Feldman SA, Hendry RM, Beeler JA. Identification of a linear heparin binding domain for human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G. J Virol. 1999;73:6610-7.

Fleming DM, Cross KW. Respiratory syncytial virus or influenza? Lancet. 1993;342:1507-10.

Fogg MH, Parsons KR, Thomas LH, Taylor G. Identification of CD4+ T cell epitopes on the fusion (F) and attachment (G) proteins of bovine respiratory syncytial virus (BRSV). Vaccine. 2001;19:3226-40.

Forsell MN, Li Y, Sundback M, Svehla K, Liljestrom P, Mascola JR et al. Biochemical and immunogenic characterization of soluble human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein trimers expressed by semliki forest virus. J Virol. 2005;79:10902-14.

Frankena K, Klaassen CH, Bosch JC, van de Braak AE, van de Haar AG, van Tilburg FC et al. Double blind field evaluation of a trivalent vaccine against respiratory disease in veal calves. Vet Q. 1994;16:148-52.

Freihorst J, Ogra PL. Mucosal immunity and viral infections. Ann Med. 2001;33:172-7.

Frey ML, Haas L, Harder TC, Kaaden OR, Moennig V, Truyen U. Virusinfektionen einheimischer Haussäugetiere. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag;

Furze J, Wertz G, Lerch R, Taylor G. Antigenic heterogeneity of the attachment protein of bovine respiratory syncytial virus. J Gen Virol. 1994;75 (Pt 2):363-70.

Furze JM, Roberts SR, Wertz GW, Taylor G. Antigenically distinct G glycoproteins of BRSV strains share a high degree of genetic homogeneity. Virology. 1997;231:48-58.

Gaddum RM, Cook RS, Furze JM, Ellis SA, Taylor G. Recognition of bovine respiratory syncytial virus proteins by bovine CD8+ T lymphocytes. Immunology. 2003;108:220-9.

Gagnon CA, Lachapelle G, Langelier Y, Massie B, Dea S. Adenoviral-expressed GP5 of porcine respiratory and reproductive syndrome virus differs in its cellular maturation from the authentic viral protein but maintains known biological functions. Arch Virol. 2003;148:951-72.

Gardner PS, McQuillin J, Court SD. Speculation on pathogenesis in death from respiratory syncytial virus infection. Br Med J. 1970;1:327-30.

Garoff H, Hewson R, Opstelten DJ. Virus maturation by budding. Microbiol Mol Biol Rev. 1998;62:1171-90.

Gershwin LJ, Schelegle ES, Gunther RA, Anderson ML, Woolums AR, Larochelle DR et al. A bovine model of vaccine enhanced respiratory syncytial virus pathophysiology. Vaccine. 1998;16:1225-36.

Gherardi MM, Perez-Jimenez E, Najera JL, Esteban M. Induction of HIV immunity in the genital tract after intranasal delivery of a MVA vector: enhanced immunogenicity after DNA prime-modified vaccinia virus Ankara boost immunization schedule. J Immunol. 2004;172:6209-20.

Ghildyal R, Li D, Peroulis I, Shields B, Bardin PG, Teng MN et al. Interaction between the respiratory syncytial virus G glycoprotein cytoplasmic domain and the matrix protein. J Gen Virol. 2005;86:1879-84.

Gill MA, Palucka AK, Barton T, Ghaffar F, Jafri H, Banchereau J et al. Mobilization of plasmacytoid and myeloid dendritic cells to mucosal sites in children with respiratory syncytial virus and other viral respiratory infections. J Infect Dis. 2005;191:1105-15.

Gimenez HB, Keir HM, Cash P. Immunoblot analysis of the human antibody response to respiratory syncytial virus infection. J Gen Virol. 1987;68 (Pt 5):1267-75.

Girard M, Martin A, van der WS. Potential use of poliovirus as a vector. Biologicals. 1993;21:371-77.

Glezen WP, Paredes A, Allison JE, Taber LH, Frank AL. Risk of respiratory syncytial virus infection for infants from low-income families in relationship to age, sex, ethnic group, and maternal antibody level. J Pediatr. 1981;98:708-15.

Graham BS, Henderson GS, Tang YW, Lu X, Neuzil KM, Colley DG. Priming immunization determines T helper cytokine mRNA expression patterns in lungs of mice challenged with respiratory syncytial virus. J Immunol. 1993;151:2032-40.

Graham BS, Rutigliano JA, Johnson TR. Respiratory syncytial virus immunobiology and pathogenesis. Virology. 2002;297:1-7.

Green M, Brayer AF, Schenkman KA, Wald ER. Duration of hospitalization in previously well infants with respiratory syncytial virus infection. Pediatr Infect Dis J. 1989;8:601-5.

Greensill J, McNamara PS, Dove W, Flanagan B, Smyth RL, Hart CA. Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. Emerg Infect Dis. 2003;9:372-5.

Groothuis JR, Simoes EA, Levin MJ, Hall CB, Long CE, Rodriguez WJ et al. Prophylactic administration of respiratory syncytial virus immune globulin to high-risk infants and young children. The Respiratory Syncytial Virus Immune Globulin Study Group. N Engl J Med. 1993;329:1524-30.

Gruber C, Levine S. Respiratory syncytial virus polypeptides. III. The envelope-associated proteins. J Gen Virol. 1983;64 (Pt 4):825-32.

Guerrero-Plata A, Casola A, Suarez G, Yu X, Spetch L, Peeples ME et al. Differential Response of Dendritic Cells to Human Metapneumovirus and Respiratory Syncytial Virus. Am J Respir Cell Mol Biol. 2005.

Gupta S, Janani R, Bin Q, Luciw P, Greer C, Perri S et al. Characterization of human immunodeficiency virus Gag-specific gamma interferon-expressing cells following protective mucosal immunization with alphavirus replicon particles. J Virol. 2005;79:7135-45.

Haj-Ahmad Y, Graham FL. Development of a helper-independent human adenovirus vector and its use in the transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. J Virol. 1986;57:267-74.

Hall CB, Douglas RG, Jr. Modes of transmission of respiratory syncytial virus. J Pediatr. 1981;99:100-3.

Hall CB, Douglas RG, Jr., Schnabel KC, Geiman JM. Infectivity of respiratory syncytial virus by various routes of inoculation. Infect Immun. 1981;33:779-83.

Hall CB, Hall WJ, Speers DM. Clinical and physiological manifestations of bronchiolitis and pneumonia. Outcome of respiratory syncytial virus. Am J Dis Child. 1979;133:798-802.

Hall CB, Powell KR, MacDonald NE, Gala CL, Menegus ME, Suffin SC et al. Respiratory syncytial viral infection in children with compromised immune function. N Engl J Med. 1986;315:77-81.

Hall CB, Walsh EE, Long CE, Schnabel KC. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. J Infect Dis. 1991;163:693-8.

Hall WJ, Hall CB, Speers DM. Respiratory syncytial virus infection in adults: clinical, virologic, and serial pulmonary function studies. Ann Intern Med. 1978;88:203-5.

Hallak LK, Collins PL, Knudson W, Peeples ME. Iduronic acid-containing glycosaminoglycans on target cells are required for efficient respiratory syncytial virus infection. Virology. 2000a;271:264-75.

Hallak LK, Spillmann D, Collins PL, Peeples ME. Glycosaminoglycan sulfation requirements for respiratory syncytial virus infection. J Virol. 2000b;74:10508-13.

Han LL, Alexander JP, Anderson LJ. Respiratory syncytial virus pneumonia among the elderly: an assessment of disease burden. J Infect Dis. 1999;179:25-30.

Hanke T, Barnfield C, Wee EG, Agren L, Samuel RV, Larke N et al. Construction and immunogenicity in a prime-boost regimen of a Semliki Forest virus-vectored experimental HIV clade A vaccine. J Gen Virol. 2003;84:361-8.

Harrer E, Bauerle M, Ferstl B, Chaplin P, Petzold B, Mateo L et al. Therapeutic vaccination of HIV-1-infected patients on HAART with a recombinant HIV-1 nef-expressing MVA: safety, immunogenicity and influence on viral load during treatment interruption. Antivir Ther. 2005;10:285-300.

Harsten G, Prellner K, Lofgren B, Heldrup J, Kalm O, Kornfalt R. Serum antibodies against respiratory tract viruses: a prospective three-year follow-up from birth. J Laryngol Otol. 1989;103:904-8.

Healy AM, Monaghan ML, Bassett HF, Gunn HM, Markey BK, Collins JD. Morbidity and mortality in a large Irish feedlot; microbiological and serological findings in cattle with acute respiratory disease. Br Vet J. 1993;149:549-60.

Hemming VG, Prince GA. Respiratory syncytial virus: babies and antibodies. Infect Agents Dis. 1992;1:24-32.

Hemming VG, Prince GA, Groothuis JR, Siber GR. Hyperimmune globulins in prevention and treatment of respiratory syncytial virus infections. Clin Microbiol Rev. 1995;8:22-33.

Hemming VG, Prince GA, Horswood RL, London WJ, Murphy BR, Walsh EE et al. Studies of passive immunotherapy for infections of respiratory syncytial virus in the respiratory tract of a primate model. J Infect Dis. 1985;152:1083-7.

Henderson DA. Edward Jenner's vaccine. Public Health Rep. 1997;112:116-21.

Henderson FW, Collier AM, Clyde WA, Jr., Denny FW. Respiratory-syncytial-virus infections, reinfections and immunity. A prospective, longitudinal study in young children. N Engl J Med. 1979;300:530-4.

Henderson J, Hilliard TN, Sherriff A, Stalker D, Al Shammari N, Thomas HM. Hospitalization for RSV bronchiolitis before 12 months of age and subsequent asthma, atopy and wheeze: a longitudinal birth cohort study. Pediatr Allergy Immunol. 2005;16:386-92.

Herrlich A, Mayr A. [Comparative experimental works on cow pox virus vaccines.]. Arch Hyg Bakteriol. 1954;138:479-504.

Hill AV, Reece W, Gothard P, Moorthy V, Roberts M, Flanagan K et al. DNA-based vaccines for malaria: a heterologous prime-boost immunisation strategy. Dev Biol (Basel). 2000;104:171-9.

Hirsch VM, Fuerst TR, Sutter G, Carroll MW, Yang LC, Goldstein S et al. Patterns of viral replication correlate with outcome in simian immunodeficiency virus (SIV)-infected macaques: effect of prior immunization with a trivalent SIV vaccine in modified vaccinia virus Ankara. J Virol. 1996;70:3741-52.

Holzer GW, Gritschenberger W, Mayrhofer JA, Wieser V, Dorner F, Falkner FG. Dominant host range selection of vaccinia recombinants by rescue of an essential gene. Virology. 1998;249:160-6.

Homa FL, Brideau RJ, Lehman DJ, Thomsen DR, Olmsted RA, Wathen MW. Development of a novel subunit vaccine that protects cotton rats against both human respiratory syncytial virus and human parainfluenza virus type 3. J Gen Virol. 1993;74 (Pt 9):1995-9.

Hornemann S, Harlin O, Staib C, Kisling S, Erfle V, Kaspers B et al. Replication of modified vaccinia virus Ankara in primary chicken embryo fibroblasts requires expression of the interferon resistance gene E3L. J Virol. 2003;77:8394-407.

Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. Science. 1993;260:547-9.

Hussell T, Georgiou A, Sparer TE, Matthews S, Pala P, Openshaw PJ. Host genetic determinants of vaccine-induced eosinophilia during respiratory syncytial virus infection. J Immunol. 1998;161:6215-22.

Hussell T, Khan U, Openshaw P. IL-12 treatment attenuates T helper cell type 2 and B cell responses but does not improve vaccine-enhanced lung illness. J Immunol. 1997;159:328-34.

Hussell T, Openshaw PJ. Intracellular IFN-gamma expression in natural killer cells precedes lung CD8+ T cell recruitment during respiratory syncytial virus infection. J Gen Virol. 1998;79 (Pt 11):2593-601.

Ishii KJ, Coban C, Kato H, Takahashi K, Torii Y, Takeshita F et al. A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. Nat Immunol. 2005.

Jackson M, Scott R. Different patterns of cytokine induction in cultures of respiratory syncytial (RS) virus-specific human TH cell lines following stimulation with RS virus and RS virus proteins. J Med Virol. 1996;49:161-9.

Jacobs JW, Edington N. Isolation of respiratory syncytial virus from cattle in Britain. Vet Rec. 1971;88:694.

Jenner E. The origin of the vaccine inoculation. London, Berwick Street, Soho: D.N.Shury; 1801.

Jin H, Cheng X, Zhou HZ, Li S, Seddiqui A. Respiratory syncytial virus that lacks open reading frame 2 of the M2 gene (M2-2) has altered growth characteristics and is attenuated in rodents. J Virol. 2000;74:74-82.

Johnson PR, Spriggs MK, Olmsted RA, Collins PL. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987;84:5625-9.

Jones SM, Feldmann H, Stroher U, Geisbert JB, Fernando L, Grolla A et al. Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses. Nat Med. 2005;11:786-90.

Kalina WV, Woolums AR, Berghaus RD, Gershwin LJ. Formalin-inactivated bovine RSV vaccine enhances a Th2 mediated immune response in infected cattle. Vaccine. 2004;22:1465-74.

Kallewaard NL, Bowen AL, Crowe JE, Jr. Cooperativity of actin and microtubule elements during replication of respiratory syncytial virus. Virology. 2005;331:73-81.

Kanakaraj P, Ngo K, Wu Y, Angulo A, Ghazal P, Harris CA et al. Defective interleukin (IL)-18-mediated natural killer and T helper cell type 1 responses in IL-1 receptor-associated kinase (IRAK)-deficient mice. J Exp Med. 1999;189:1129-38.

Kapikian AZ, Mitchell RH, Chanock RM, Shvedoff RA, Stewart CE. An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine. Am J Epidemiol. 1969;89:405-21.

Karger A, Schmidt U, Buchholz UJ. Recombinant bovine respiratory syncytial virus with deletions of the G or SH genes: G and F proteins bind heparin. J Gen Virol. 2001;82:631-40.

Karron RA, Buonagurio DA, Georgiu AF, Whitehead SS, Adamus JE, Clements-Mann ML et al. Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94:13961-6.

Kim HW, Canchola JG, Brandt CD, Pyles G, Chanock RM, Jensen K et al. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. Am J Epidemiol. 1969;89:422-34.

Kimman TG, Westenbrink F, Schreuder BE, Straver PJ. Local and systemic antibody response to bovine respiratory syncytial virus infection and reinfection in calves with and without maternal antibodies. J Clin Microbiol. 1987;25:1097-106.

Kimman TG, Zimmer GM, Westenbrink F, Mars J, van Leeuwen E. Epidemiological study of bovine respiratory syncytial virus infections in calves: influence of maternal antibodies on the outcome of disease. Vet Rec. 1988;123:104-9.

Kon OM, Kay AB. T cells and chronic asthma. Int Arch Allergy Immunol. 1999;118:133-5.

Krilov LR, Hendry RM, Godfrey E, McIntosh K. Respiratory virus infection of peripheral blood monocytes: correlation with ageing of cells and interferon production in vitro. J Gen Virol. 1987;68:1749-53.

Kuhnle G, Heinze A, Schmitt J, Giesow K, Taylor G, Morrison I et al. The class II membrane glycoprotein G of bovine respiratory syncytial virus, expressed from a synthetic open reading frame, is incorporated into virions of recombinant bovine herpesvirus 1. J Virol. 1998;72:3804-11.

Kyhse-Andersen J. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. J Biochem Biophys Methods. 1984;10:203-9.

La Via WV, Grant SW, Stutman HR, Marks MI. Clinical profile of pediatric patients hospitalized with respiratory syncytial virus infection. Clin Pediatr (Phila). 1993;32:450-4.

La Via WV, Marks MI, Stutman HR. Respiratory syncytial virus puzzle: clinical features, pathophysiology, treatment, and prevention. J Pediatr. 1992;121:503-10.

Lamb RA, Kolakofsky D. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. Fields Virology. Philadelphia: 2001. p. 1305-1340.

Langedijk JP, Middel WG, Schaaper WM, Meloen RH, Kramps JA, Brandenburg AH et al. Type-specific serologic diagnosis of respiratory syncytial virus infection, based on a synthetic peptide of the attachment protein G. J Immunol Methods. 1996a;193:157-66.

Langedijk JP, Schaaper WM, Meloen RH, van Oirschot JT. Proposed three-dimensional model for the attachment protein G of respiratory syncytial virus. J Gen Virol. 1996b;77 (Pt 6):1249-57.

Larsen LE. Bovine respiratory syncytial virus (BRSV): a review. Acta Vet Scand. 2000;41:1-24.

Larsen LE, Tegtmeier C, Pedersen E. Bovine respiratory syncytial virus (BRSV) pneumonia in beef calf herds despite vaccination. Acta Vet Scand. 2001;42:113-21.

Larsen LE, Tjornehoj K, Viuff B, Jensen NE, Uttenthal A. Diagnosis of enzootic pneumonia in Danish cattle: reverse transcription-polymerase chain reaction assay for detection of bovine respiratory syncytial virus in naturally and experimentally infected cattle. J Vet Diagn Invest. 1999;11:416-22.

Lauterbach H, Kerksiek KM, Busch DH, Berto E, Bozac A, Mavromara P et al. Protection from bacterial infection by a single vaccination with replication-deficient mutant herpes simplex virus type 1. J Virol. 2004;78:4020-28.

Legg JP, Hussain IR, Warner JA, Johnston SL, Warner JO. Type 1 and type 2 cytokine imbalance in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis. Am J Respir Crit Care Med. 2003;168:633-39.

Lerch RA, Anderson K, Amann VL, Wertz GW. Nucleotide sequence analysis of the bovine respiratory syncytial virus fusion protein mRNA and expression from a recombinant vaccinia virus. Virology. 1991;181:118-31.

Levine S, Klaiber-Franco R, Paradiso PR. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. J Gen Virol. 1987;68 (Pt 9):2521-4.

Ling R, Pringle CR. Polypeptides of pneumonia virus of mice. II. Characterization of the glycoproteins. J Gen Virol. 1989;70 (Pt 6):1441-52.

Lotthammer KH, Ehlers J. [Epidemiologic studies of the detection of viral infection agents in calf losses in the Weser-Ems region]. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 1990;97:418-20.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193:265-75.

MacDonald NE, Hall CB, Suffin SC, Alexson C, Harris PJ, Manning JA. Respiratory syncytial viral infection in infants with congenital heart disease. N Engl J Med. 1982;307:397-400.

Mackett M, Smith GL, Moss B. Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982;79:7415-9.

Mackett M, Smith GL, Moss B. Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. 1982. Biotechnology. 1992;24:495-9.

Mandl S, Hix L, Andino R. Preexisting immunity to poliovirus does not impair the efficacy of recombinant poliovirus vaccine vectors. J Virol. 2001;75:622-27.

Mandl S, Sigal LJ, Rock KL, Andino R. Poliovirus vaccine vectors elicit antigen-specific cytotoxic T cells and protect mice against lethal challenge with malignant melanoma cells expressing a model antigen. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:8216-21.

Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E, Trinchieri G et al. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. J Exp Med. 1993;177:1199-204.

Mars MH, Bruschke CJ, van Oirschot JT. Airborne transmission of BHV1, BRSV, and BVDV among cattle is possible under experimental conditions. Vet Microbiol. 1999;66:197-207.

Martinez FD, Morgan WJ, Wright AL, Holberg CJ, Taussig LM. Diminished lung function as a predisposing factor for wheezing respiratory illness in infants. N Engl J Med. 1988;319:1112-7.

Martinez I, Melero JA. Binding of human respiratory syncytial virus to cells: implication of sulfated cell surface proteoglycans. J Gen Virol. 2000;81:2715-22.

Mason SW, Aberg E, Lawetz C, DeLong R, Whitehead P, Liuzzi M. Interaction between human respiratory syncytial virus (RSV) M2-1 and P proteins is required for reconstitution of M2-1-dependent RSV minigenome activity. J Virol. 2003;77:10670-76.

Massie B, Gluzman Y, Hassell JA. Construction of a helper-free recombinant adenovirus that expresses polyomavirus large T antigen. Mol Cell Biol. 1986;6:2872-83.

Matheise JP, Walravens K, Collard A, Coppe P, Letesson JJ. Antigenic analysis of the F protein of the bovine respiratory syncytial virus: identification of two distinct antigenic sites involved in fusion inhibition. Arch Virol. 1995;140:993-1005.

Matumoto M, Inaba Y, Kurogi H, Sato K, Omori T. Bovine respiratory syncytial virus: host range in laboratory animals and cell cultures. Arch Gesamte Virusforsch. 1974;44:280-90.

Mayr A, Bachmann PA, Bibrack B, Wittmann G. Zellkulturen. In: Mayr A, Bachmann PA, Bibrack B, Wittmann G, editors. Virologische Arbeitsmethoden. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1974.

Mayr A, Hochstein-Mintzel V, Stickl H. Passage History, Properties and Applicability of Attenuated Vaccinia virus Strain MVA. Infection - Journal for the Clinical Study and Treatment of Infection. 1975;3:6-14.

Mayr A, Munz E. [Changes in the vaccinia virus through continuing passages in chick embryo fibroblast cultures]. Zentralbl Bakteriol [Orig]. 1964;195:24-35.

Mbawuike IN, Wells J, Byrd R, Cron SG, Glezen WP, Piedra PA. HLA-restricted CD8+ cytotoxic T lymphocyte, interferon-gamma, and interleukin-4 responses to respiratory syncytial virus infection in infants and children. J Infect Dis. 2001;183:687-96.

McArthur-Vaughan K, Gershwin LJ. A rhesus monkey model of respiratory syncytial virus infection. J Med Primatol. 2002;31:61-73.

McConkey SJ, Reece WH, Moorthy VS, Webster D, Dunachie S, Butcher G et al. Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans. Nat Med. 2003;9:729-35.

McCormack GP, Clewley JP. The application of molecular phylogenetics to the analysis of viral genome diversity and evolution. Rev Med Virol. 2002;12:221-38.

McInnes E, Sopp P, Howard CJ, Taylor G. Phenotypic analysis of local cellular responses in calves infected with bovine respiratory syncytial virus. Immunology. 1999;96:396-403.

McIntosh K, Masters HB, Orr I, Chao RK, Barkin RM. The immunologic response to infection with respiratory syncytial virus in infants. J Infect Dis. 1978;138:24-32.

Meseda CA, Garcia AD, Kumar A, Mayer AE, Manischewitz J, King LR et al. Enhanced immunogenicity and protective effect conferred by vaccination with combinations of modified vaccinia virus Ankara and licensed smallpox vaccine Dryvax in a mouse model. Virology. 2005;339:164-75.

Meyer H, Sutter G, Mayr A. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. J Gen Virol. 1991;72 (Pt 5):1031-8.

Mills Jt, Van Kirk JE, Wright PF, Chanock RM. Experimental respiratory syncytial virus infection of adults. Possible mechanisms of resistance to infection and illness. J Immunol. 1971;107:123-30.

Modrow S, Falke D, Truyen U. Molekulare Virologie. 2nd ed. Heidelberg - Berlin: Spektrum Akademischer Verlag; 2003.

Mohanty SB, Lillie MG, Ingling AL. Effect of serum and nasal neutralizing antibodies on bovine respiratory syncytial virus infection in calves. J Infect Dis. 1976;134:409-13.

Moorthy VS, Pinder M, Reece WH, Watkins K, Atabani S, Hannan C et al. Safety and immunogenicity of DNA/modified vaccinia virus ankara malaria vaccination in African adults. J Infect Dis. 2003;188:1239-44.

Morrison WI, Taylor G, Gaddum RM, Ellis SA. Contribution of advances in immunology to vaccine development. Adv Vet Med. 1999;41:181-95.

Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol. 1989;7:145-73.

Moss B. Comprehensive Virology. New York: Plenum;

Moss B. Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93:11341-8.

Moss B, Carroll MW, Wyatt LS, Bennink JR, Hirsch VM, Goldstein S et al. Host range restricted, non-replicating vaccinia virus vectors as vaccine candidates. Adv Exp Med Biol. 1996;397:7-13.

Murphy BR, Alling DW, Snyder MH, Walsh EE, Prince GA, Chanock RM et al. Effect of age and preexisting antibody on serum antibody response of infants and children to the F and G glycoproteins during respiratory syncytial virus infection. J Clin Microbiol. 1986a;24:894-8.

Murphy BR, Hall SL, Kulkarni AB, Crowe JE, Jr., Collins PL, Connors M et al. An update on approaches to the development of respiratory syncytial virus (RSV) and parainfluenza virus type 3 (PIV3) vaccines. Virus Res. 1994;32:13-36.

Murphy BR, Prince GA, Walsh EE, Kim HW, Parrott RH, Hemming VG et al. Dissociation between serum neutralizing and glycoprotein antibody responses of infants and children who received inactivated respiratory syncytial virus vaccine. J Clin Microbiol. 1986b;24:197-202.

Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. Annu Rev Immunol. 2001;19:423-74.

Nakano E, Panicali D, Paoletti E. Molecular genetics of vaccinia virus: demonstration of marker rescue. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982;79:1593-96.

Navas L, Wang E, de Carvalho V, Robinson J. Improved outcome of respiratory syncytial virus infection in a high-risk hospitalized population of Canadian children. Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada. J Pediatr. 1992;121:348-54.

Nilsson C, Makitalo B, Berglund P, Bex F, Liljestrom P, Sutter G et al. Enhanced simian immunodeficiency virus-specific immune responses in macaques induced by priming with recombinant Semliki Forest virus and boosting with modified vaccinia virus Ankara. Vaccine. 2001;19:3526-36.

Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. Nature. 1995;378:88-91.

Olszewska W, Suezer Y, Sutter G, Openshaw PJ. Protective and disease-enhancing immune responses induced by recombinant modified vaccinia Ankara (MVA) expressing respiratory syncytial virus proteins. Vaccine. 2004;23:215-21.

Openshaw PJ. Immunity and immunopathology to respiratory syncytial virus. The mouse model. Am J Respir Crit Care Med. 1995;152:59-62.

Openshaw PJ. Potential therapeutic implications of new insights into respiratory syncytial virus disease. Respir Res. 2002;3 Suppl 1:S15-S20.

Openshaw PJ, Culley FJ, Olszewska W. Immunopathogenesis of vaccine-enhanced RSV disease. Vaccine. 2001;20 Suppl 1:27-31.

Openshaw PJ, Dean GS, Culley FJ. Links between respiratory syncytial virus bronchiolitis and childhood asthma: clinical and research approaches. Pediatr Infect Dis J. 2003;22:S58-S64.

Ory DS, Neugeboren BA, Mulligan RC. A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93:11400-06.

Ostler T, Ehl S. Pulmonary T cells induced by respiratory syncytial virus are functional and can make an important contribution to long-lived protective immunity. Eur J Immunol. 2002;32:2562-69.

Paccaud MF, Jacquier C. A respiratory syncytial virus of bovine origin. Arch Gesamte Virusforsch. 1970;30:327-42.

Pala P, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Metcalfe C, Sigurs N, Openshaw PJ. Enhanced IL-4 responses in children with a history of respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy. Eur Respir J. 2002;20:376-82.

Panicali D, Paoletti E. Construction of poxviruses as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982;79:4927-31.

Panicali D, Paoletti E. Construction of poxviruses as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus. 1982. Biotechnology. 1992;24:503-7.

Parrott RH, Kim HW, Arrobio JO, Hodes DS, Murphy BR, Brandt CD et al. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, D.C. II. Infection and disease with respect to age, immunologic status, race and sex. Am J Epidemiol. 1973;98:289-300.

Pedraz C, Carbonell-Estrany X, Figueras-Aloy J, Quero J. Effect of palivizumab prophylaxis in decreasing respiratory syncytial virus hospitalizations in premature infants. Pediatr Infect Dis J. 2003;22:823-27.

Perkus ME, Limbach K, Paoletti E. Cloning and expression of foreign genes in vaccinia virus, using a host range selection system. J Virol. 1989;63:3829-36.

Piedra PA. Clinical experience with respiratory syncytial virus vaccines. Pediatr Infect Dis J. 2003;22:94-9.

Pilette C, Ouadrhiri Y, Godding V, Vaerman JP, Sibille Y. Lung mucosal immunity: immunoglobulin-A revisited. Eur Respir J. 2001;18:571-88.

Pirie HM, Petrie L, Pringle CR, Allen EM, Kennedy GJ. Acute fatal pneumonia in calves due to respiratory syncytial virus. Vet Rec. 1981;108:411-6.

Ponnuraj EM, Springer J, Hayward AR, Wilson H, Simoes EA. Antibody-dependent enhancement, a possible mechanism in augmented pulmonary disease of respiratory syncytial virus in the Bonnet monkey model. J Infect Dis. 2003;187:1257-63.

Power UF, Plotnicky-Gilquin H, Huss T, Robert A, Trudel M, Stahl S et al. Induction of protective immunity in rodents by vaccination with a prokaryotically expressed recombinant fusion protein containing a respiratory syncytial virus G protein fragment. Virology. 1997;230:155-66.

Prehaud C, Takehara K, Flamand A, Bishop DH. Immunogenic and protective properties of rabies virus glycoprotein expressed by baculovirus vectors. Virology. 1989;173:390-99.

Prince GA, Capiau C, Deschamps M, Fabry L, Garcon N, Gheysen D et al. Efficacy and safety studies of a recombinant chimeric respiratory syncytial virus FG glycoprotein vaccine in cotton rats. J Virol. 2000;74:10287-92.

Prince GA, Curtis SJ, Yim KC, Porter DD. Vaccine-enhanced respiratory syncytial virus disease in cotton rats following immunization with Lot 100 or a newly prepared reference vaccine. J Gen Virol. 2001;82:2881-8.

Prince GA, Horswood RL, Berndt J, Suffin SC, Chanock RM. Respiratory syncytial virus infection in inbred mice. Infect Immun. 1979;26:764-6.

Prozzi D, Walravens K, Langedijk JP, Daus F, Kramps JA, Letesson JJ. Antigenic and molecular analyses of the variability of bovine respiratory syncytial virus G glycoprotein. J Gen Virol. 1997;78 (Pt 2):359-66.

Rahman M, Huq F, Sack DA, Butler T, Azad AK, Alam A et al. Acute lower respiratory tract infections in hospitalized patients with diarrhea in Dhaka, Bangladesh. Rev Infect Dis. 1990;12 Suppl 8:899-906.

Ramirez JC, Gherardi MM, Esteban M. Biology of attenuated modified vaccinia virus Ankara recombinant vector in mice: virus fate and activation of B- and T-cell immune responses in comparison with the Western Reserve strain and advantages as a vaccine. J Virol. 2000;74:923-33.

Randhawa JS, Wilson SD, Tolley KP, Cavanagh D, Pringle CR, Easton AJ. Nucleotide sequence of the gene encoding the viral polymerase of avian pneumovirus. J Gen Virol. 1996;77 (Pt 12):3047-51.

Riedel S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. Proc (Bayl Univ Med Cent). 2005;18:21-25.

Roberts A, Buonocore L, Price R, Forman J, Rose JK. Attenuated vesicular stomatitis viruses as vaccine vectors. J Virol. 1999;73:3723-32.

Roberts SR, Compans RW, Wertz GW. Respiratory syncytial virus matures at the apical surfaces of polarized epithelial cells. J Virol. 1995;69:2667-73.

Rohwedder A, Keminer O, Forster J, Schneider K, Schneider E, Werchau H. Detection of respiratory syncytial virus RNA in blood of neonates by polymerase chain reaction. J Med Virol. 1998;54:320-7.

Roman M, Calhoun WJ, Hinton KL, Avendano LF, Simon V, Escobar AM et al. Respiratory syncytial virus infection in infants is associated with predominant Th-2-like response. Am J Respir Crit Care Med. 1997;156:190-5.

Sandbulte MR, Roth JA. T-cell populations responsive to bovine respiratory syncytial virus in seronegative calves. Vet Immunol Immunopathol. 2002;84:111-23.

Sandbulte MR, Roth JA. Priming of multiple T cell subsets by modified-live and inactivated bovine respiratory syncytial virus vaccines. Vet Immunol Immunopathol. 2003;95:123-33.

Scheiflinger F, Dorner F, Falkner FG. Transient marker stabilisation: a general procedure to construct marker-free recombinant vaccinia virus. Arch Virol. 1998;143:467-74.

Schlender J, Bossert B, Buchholz U, Conzelmann KK. Bovine respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize alpha/beta interferon-induced antiviral response. J Virol. 2000;74:8234-42.

Schneider J, Gilbert SC, Blanchard TJ, Hanke T, Robson KJ, Hannan CM et al. Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. Nat Med. 1998;4:397-402.

Schrijver RS, Daus F, Kramps JA, Langedijk JP, Buijs R, Middel WG et al. Subgrouping of bovine respiratory syncytial virus strains detected in lung tissue. Vet Microbiol. 1996;53:253-60.

Schrijver RS, Hensen EJ, Langedijk JP, Daus F, Middel WG, Kramps JA et al. Antibody responses against epitopes on the F protein of bovine respiratory syncytial virus differ in infected or vaccinated cattle. Arch Virol. 1997;142:2195-210.

Shinya K, Fujii Y, Ito H, Ito T, Kawaoka Y. Characterization of a neuraminidase-deficient influenza a virus as a potential gene delivery vector and a live vaccine. J Virol. 2004;78:3083-88.

Siber GR, Leszcynski J, Pena-Cruz V, Ferren-Gardner C, Anderson R, Hemming VG et al. Protective activity of a human respiratory syncytial virus immune globulin prepared from donors screened by microneutralization assay. J Infect Dis. 1992;165:456-63.

Simoes EA. Respiratory syncytial virus infection. Lancet. 1999;354:847-52.

Simoes EA. Overlap between respiratory syncytial virus infection and influenza. Lancet. 2001;358:1382-3.

Simoes EA, Groothuis JR. Respiratory syncytial virus prophylaxis--the story so far. Respir Med. 2002;96 Suppl B:15-24.

Simoes EA, Hayward AR, Ponnuraj EM, Straumanis JP, Stenmark KR, Wilson HL et al. Respiratory syncytial virus infects the Bonnet monkey, Macaca radiata. Pediatr Dev Pathol. 1999;2:316-26.

Smith KA, Stallard V, Roos JM, Hart C, Cormier N, Cohen LK et al. Host range selection of vaccinia recombinants containing insertions of foreign genes into non-coding sequences. Vaccine. 1993;11:43-53.

Smith MH, Frey ML, Dierks RE. Isolation, characterization, and pathogenicity studies of a bovine respiratory syncytial virus. Arch Virol. 1975;47:237-47.

Spaete RR, Frenkel N. The herpes simplex virus amplicon: a new eucaryotic defective-virus cloning-amplifying vector. Cell. 1982;30:295-304.

Spence L, Barratt N. Respiratory syncytial virus associated with acute respiratory infections in Trinidadian patients. Am J Epidemiol. 1968;88:257-66.

Spriggs MK, Olmsted RA, Venkatesan S, Coligan JE, Collins PL. Fusion glycoprotein of human parainfluenza virus type 3: nucleotide sequence of the gene, direct identification of the cleavage-activation site, and comparison with other paramyxoviruses. Virology. 1986;152:241-51.

Srikiatkhachorn A, Braciale TJ. Virus-specific CD8+ T lymphocytes downregulate T helper cell type 2 cytokine secretion and pulmonary eosinophilia during experimental murine respiratory syncytial virus infection. J Exp Med. 1997;186:421-32.

Srinivasakumar N, Ogra PL, Flanagan TD. Characteristics of fusion of respiratory syncytial virus with HEp-2 cells as measured by R18 fluorescence dequenching assay. J Virol. 1991;65:4063-9.

Staib C, Drexler I, Ohlmann M, Wintersperger S, Erfle V, Sutter G. Transient host range selection for genetic engineering of modified vaccinia virus Ankara. Biotechniques. 2000;28:1137-42.

Staib C, Drexler I, Sutter G. Construction and isolation of recombinant MVA. In: Isaacs SN, editor. Vaccinia Virus and Poxvirology Methods and Protocols. Totowa, New Jersey: Humana Press; p. 77-100.

Staib C, Kisling S, Erfle V, Sutter G. Inactivation of the viral interleukin 1beta receptor improves CD8+ T-cell memory responses elicited upon immunization with modified vaccinia virus Ankara. J Gen Virol. 2005;86:1997-2006.

Staib C, Lowel M, Erfle V, Sutter G. Improved host range selection for recombinant modified vaccinia virus Ankara. Biotechniques. 2003;34:694-6.

Staib C, Sutter G. Live viral vectors: vaccinia virus. In: Robinson A, Hudson MJ, Cranage MP, editors. Vaccine Protocols. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2003. p. 51-68.

Stec DS, Hill MG3, Collins PL. Sequence analysis of the polymerase L gene of human respiratory syncytial virus and predicted phylogeny of nonsegmented negative-strand viruses. Virology. 1991;183:273-87.

Stickl H, Hochstein-Mintzel V. [Intracutaneous smallpox vaccination with a weak pathogenic vaccinia virus ("MVA virus")]. Munch Med Wochenschr. 1971;113:1149-53.

Stickl H, Hochstein-Mintzel V, Mayr A, Huber HC, Schafer H, Holzner A. [MVA vaccination against smallpox: clinical tests with an attenuated live vaccinia virus strain (MVA) (author's transl)]. Dtsch Med Wochenschr. 1974;99:2386-92.

Stickl HA. Smallpox vaccination and its consequences: first experiences with the highly attenuated smallpox vaccine "MVA". Prev Med. 1974;3:97-101.

Stittelaar KJ, Kuiken T, de Swart RL, van Amerongen G, Vos HW, Niesters HG et al. Safety of modified vaccinia virus Ankara (MVA) in immune-suppressed macaques. Vaccine. 2001;19:3700-9.

Storch GA, Anderson LJ, Park CS, Tsou C, Dohner DE. Antigenic and genomic diversity within group A respiratory syncytial virus. J Infect Dis. 1991;163:858-61.

Stott EJ, Taylor G. Respiratory syncytial virus. Brief review. Arch Virol. 1985;84:1-52.

Subramanian KN, Weisman LE, Rhodes T, Ariagno R, Sanchez PJ, Steichen J et al. Safety, tolerance and pharmacokinetics of a humanized monoclonal antibody to respiratory syncytial virus in premature infants and infants with bronchopulmonary dysplasia. MEDI-493 Study Group. Pediatr Infect Dis J. 1998;17:110-5.

Sullender WM, Mufson MA, Anderson LJ, Wertz GW. Genetic diversity of the attachment protein of subgroup B respiratory syncytial viruses. J Virol. 1991;65:5425-34.

Sutter G, Moss B. Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89:10847-51.

Sutter G, Ohlmann M, Erfle V. Non-replicating vaccinia vector efficiently expresses bacteriophage T7 RNA polymerase. FEBS Lett. 1995;371:9-12.

Sutter G, Ramsey-Ewing A, Rosales R, Moss B. Stable expression of the vaccinia virus K1L gene in rabbit cells complements the host range defect of a vaccinia virus mutant. J Virol. 1994a;68:4109-16.

Sutter G, Wyatt LS, Foley PL, Bennink JR, Moss B. 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. 1994b;12:1032-40.

Swain SL. Interleukin 18: tipping the balance towards a T helper cell 1 response. J Exp Med. 2001;194:11-4.

Takimoto T, Murti KG, Bousse T, Scroggs RA, Portner A. Role of matrix and fusion proteins in budding of Sendai virus. J Virol. 2001;75:11384-91.

Takimoto T, Portner A. Molecular mechanism of paramyxovirus budding. Virus Res. 2004;106:133-45.

Taylor G, Stott EJ, Furze J, Ford J, Sopp P. Protective epitopes on the fusion protein of respiratory syncytial virus recognized by murine and bovine monoclonal antibodies. J Gen Virol. 1992;73 (Pt 9):2217-23.

Taylor G, Stott EJ, Hughes M, Collins AP. Respiratory syncytial virus infection in mice. Infect Immun. 1984;43:649-55.

Taylor G, Thomas LH, Wyld SG, Furze J, Sopp P, Howard CJ. Role of T-lymphocyte subsets in recovery from respiratory syncytial virus infection in calves. J Virol. 1995;69:6658-64.

Techaarpornkul S, Barretto N, Peeples ME. Functional analysis of recombinant respiratory syncytial virus deletion mutants lacking the small hydrophobic and/or attachment glycoprotein gene. J Virol. 2001;75:6825-34.

Teng MN, Collins PL. The central conserved cystine noose of the attachment G protein of human respiratory syncytial virus is not required for efficient viral infection in vitro or in vivo. J Virol. 2002;76:6164-71.

Thomas M, Bedford-Russell A, Sharland M. Prevention of respiratory syncytial virus infection with palivizumab. Monaldi Arch Chest Dis. 2000;55:333-8.

Tominaga K, Yoshimoto T, Torigoe K, Kurimoto M, Matsui K, Hada T et al. IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1beta for IFN-gamma production from human T cells. Int Immunol. 2000;12:151-60.

Trudel M, Nadon F, Simard C, Belanger F, Alain R, Seguin C et al. Comparison of caprine, human and bovine strains of respiratory syncytial virus. Arch Virol. 1989;107:141-9.

Uttenthal A, Jensen NP, Blom JY. Viral aetiology of enzootic pneumonia in Danish dairy herds: diagnostic tools and epidemiology. Vet Rec. 1996;139:114-7.

Vainionpaa R, Meurman O, Sarkkinen H. Antibody response to respiratory syncytial virus structural proteins in children with acute respiratory syncytial virus infection. J Virol. 1985;53:976-9.

Valarcher JF, Bourhy H, Lavenu A, Bourges-Abella N, Roth M, Andreoletti O et al. Persistent infection of B lymphocytes by bovine respiratory syncytial virus. Virology. 2001;291:55-67.

Valarcher JF, Schelcher F, Bourhy H. Evolution of bovine respiratory syncytial virus. J Virol. 2000;74:10714-28.

Van Den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. Nat Med. 2001;7:719-24.

Van Den Ingh TS, Verhoeff J, Van Nieuwstadt AP. Clinical and pathological observations on spontaneous bovine respiratory syncytial virus infections in calves. Res Vet Sci. 1982;33:152-8.

Van der Poel WH, Brand A, Kramps JA, van Oirschot JT. Respiratory syncytial virus infections in human beings and in cattle. J Infect. 1994;29:215-28.

Van der Poel WH, Kramps JA, Middel WG, van Oirschot JT, Brand A. Dynamics of bovine respiratory syncytial virus infections: a longitudinal epidemiological study in dairy herds. Arch Virol. 1993;133:309-21.

Van der Poel WH, Schrijver RS, Middel WG, Kramps JA, Brand A, van Oirschot JT. Experimental reproduction of respiratory disease in calves with non-cell-culture-passaged bovine respiratory syncytial virus. Vet Q. 1996;18:81-6.

van Schaik SM, Tristram DA, Nagpal IS, Hintz KM, Welliver RC2, Welliver RC. Increased production of IFN-gamma and cysteinyl leukotrienes in virus-induced wheezing. J Allergy Clin Immunol. 1999;103:630-6.

Vardas E, Blaauw D, McAnerney J. The epidemiology of respiratory syncytial virus (RSV) infections in South African children. S Afr Med J. 1999;89:1079-84.

Varga SM, Wissinger EL, Braciale TJ. The attachment (G) glycoprotein of respiratory syncytial virus contains a single immunodominant epitope that elicits both Th1 and Th2 CD4+ T cell responses. J Immunol. 2000;165:6487-95.

Walsh EE, Hruska J. Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: identification of the fusion protein. J Virol. 1983;47:171-7.

Ward KA, Lambden PR, Ogilvie MM, Watt PJ. Antibodies to respiratory syncytial virus polypeptides and their significance in human infection. J Gen Virol. 1983;64 (Pt 9):1867-76.

Waris ME, Tsou C, Erdman DD, Zaki SR, Anderson LJ. Respiratory synctial virus infection in BALB/c mice previously immunized with formalin-inactivated virus induces enhanced pulmonary inflammatory response with a predominant Th2-like cytokine pattern. J Virol. 1996;70:2852-60.

Weigl JA, Puppe W, Belke O, Neususs J, Bagci F, Schmitt HJ. Population-based incidence of severe pneumonia in children in Kiel, Germany. Klin Padiatr. 2005a;217:211-19.

Weigl JA, Puppe W, Belke O, Neususs J, Bagci F, Schmitt HJ. The descriptive epidemiology of severe lower respiratory tract infections in children in Kiel, Germany. Klin Padiatr. 2005b;217:259-67.

Weigl JA, Puppe W, Schmitt HJ. The incidence of influenza-associated hospitalizations in children in Germany. Epidemiol Infect. 2002;129:525-33.

Weir JP, Bajszar G, Moss B. Mapping of the vaccinia virus thymidine kinase gene by marker rescue and by cell-free translation of selected mRNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982;79:1210-14.

Wentink GH, Bongers JH, Ter Laak EA, van Exsel ACA. The role of some pathogens in the etiology of respiratory disease in calves. 1994;483-86.

Werner GT, Jentzsch U, Metzger E, Simon J. Studies on poxvirus infections in irradiated animals. Arch Virol. 1980;64:247-56.

Wertz GW, Collins PL, Huang Y, Gruber C, Levine S, Ball LA. Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985;82:4075-9.

West K, Petrie L, Haines DM, Konoby C, Clark EG, Martin K et al. The effect of formalin-inactivated vaccine on respiratory disease associated with bovine respiratory syncytial virus infection in calves. Vaccine. 1999;17:809-20.

West WH, Lounsbach GR, Bourgeois C, Robinson JW, Carter MJ, Crompton S et al. Biological activity, binding site and affinity of monoclonal antibodies to the fusion protein of respiratory syncytial virus. J Gen Virol. 1994;75 (Pt 10):2813-9.

Whimbey E, Couch RB, Englund JA, Andreeff M, Goodrich JM, Raad I et al. Respiratory syncytial virus pneumonia in hospitalized adult patients with leukemia. Clin Infect Dis. 1995;21:376-9.

Wyatt LS, Earl PL, Eller LA, Moss B. Highly attenuated smallpox vaccine protects mice with and without immune deficiencies against pathogenic vaccinia virus challenge. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101:4590-95.

Wyatt LS, Shors ST, Murphy BR, Moss B. Development of a replication-deficient recombinant vaccinia virus vaccine effective against parainfluenza virus 3 infection in an animal model. Vaccine. 1996;14:1451-8.

Wyatt LS, Whitehead SS, Venanzi KA, Murphy BR, Moss B. Priming and boosting immunity to respiratory syncytial virus by recombinant replication-defective vaccinia virus MVA. Vaccine. 1999;18:392-7.

Yamamoto M, Vancott JL, Okahashi N, Marinaro M, Kiyono H, Fujihashi K et al. The role of Th1 and Th2 cells for mucosal IgA responses. Ann N Y Acad Sci. 1996;778:64-71.

Yoshida Y, Emi N, Hamada H. VSV-G-pseudotyped retroviral packaging through adenovirus-mediated inducible gene expression. Biochem Biophys Res Commun. 1997;232:379-82.

Yui I, Hoshi A, Shigeta Y, Takami T, Nakayama T. Detection of human respiratory syncytial virus sequences in peripheral blood mononuclear cells. J Med Virol. 2003;70:481-89.

Zambon MC, Stockton JD, Clewley JP, Fleming DM. Contribution of influenza and respiratory syncytial virus to community cases of influenza-like illness: an observational study. Lancet. 2001;358:1410-6.

Zhang XY, La Russa VF, Reiser J. Transduction of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells by using lentivirus vectors pseudotyped with modified RD114 envelope glycoproteins. J Virol. 2004;78:1219-29.

Zhu Y, Rota P, Wyatt L, Tamin A, Rozenblatt S, Lerche N et al. Evaluation of recombinant vaccinia virus--measles vaccines in infant rhesus macaques with preexisting measles antibody. Virology. 2000;276:202-13.

Anhang

Geräte und Laborhilfsmittel

A

ART GEL, 100 µl GEL loading (*Molecular Bioproducts Inc., San Diego, USA*)

ART Spitzen, 10 bis 1000 µl (*Molecular Bioproducts Inc., San Diego, USA*)

B

Brutschränke mit CO_2-Anschluss

Function Line UB (*Heraeus Holding GmbH, Hanau, Germany/jetzt Thermo Elektron Corporation, Dreieich, Germany)*

Brutschränke ohne CO_2-Anschluss

Basic 32 l (*Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Germany*)

Blockthermostat

BT 1302 (*HLC Bio Tech – Haep Labor Consult, Bovenden, Germany*)

Blotapparatur → Graphitblotapparatur

C

Cellophanblättern (*Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany*)

D

Doppelelektrophoresekammer

(*Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany*)

Model P10DS (*OWL Scientific, Massachusets, USA*)

E

Einwegkanülen

Sterican® (*B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Germany*)

Einwegspritzen

Omnifix-F® 1 ml (*B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Germany*)

Elektrophorese

Biometra®, Standard Power Pack P25 *(Whatman Biometra, Biometra GmbH i.L., Göttingen, Germany*)

Power-Pac 300 (*Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany*)

Model 200/20 Power Supply (*Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany*)

2301 MACRODRIVE 1 Power Supply (*LKB Instruments, Bromma, Sweden*)

Elektrophoresekammer für horizontale Gelelektrophorese

DNA Sub Cell™ (*Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany*)

Wide Mini sub™ Cell (*Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany*)

Elektroporationsapparat

E. coli Pulser (*Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany*)

Elektroporationsküvetten,

Gene Pulser® Küvetten (*0,2 cm, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany*)

ELISPOT

AID ELISPOT Reader System (*AID GmbH, Strassberg, Germany*)

F

Feinwaage

SPO51 (*Scaltec Instruments GmbH, Göttingen, Germany*)

CP 153 (*Sartorius AG, Göttingen, Germany*)

Filter (→ Sterilfilter)

G

Gefrierschrank

-20℃ Comfort (*Liebherr, Germany*)

-80℃ Ult 2090 (*Revco, Asheville, USA*)

Gelanalysegerät

Gel Doc 2000 (*Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany*) mit UV-Transilluminator, Kamerasystem und der Software Quantitiy One 4.1.1 (*Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany*)

Geltrockner

Gel Drying Frames 24 x 24 cm, Cat.No. AB-110761 (*Diversified Biotech, Boston, USA*)

Cellophan-Folie (*Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany*)

Gelelektrophoreseapparatur → Elektrophoresekammer

Graphitblotapparatur

Trans-Blot SD cell (*Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany*)

Fastblot B33/B34 (*Whatman Biometra, Biometra GmbH i.L., Göttingen, Germany*)

H

Handschuhe

Purple Nitrile® Safeskin, Powder-free Purple Nitrile Exam Gloves (*Hakle-Kimberly Deutschland GmbH, Mainz, Germany*)

Hybridisierungsofen

Shake´n´stack (*Thermo Electron Corporation, Dreieich, Germany*)

I

Inkubationsschüttler

Innova 4430 (*New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen, Germany*)

K

Kältethermostat (*Ecoline RE 112, Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Germany*)

Kryoröhrchen (*1,8 ml, Nalge Nunc International, New York, USA*)

Kühlschrank

UT6-K (*Bauknecht Hausgeräte GmbH, Schorndorf, Germany*)

Kühlzentrifugen

Biofuge fresco (*Heraeus Holding GmbH, Hanau, Germany/jetzt Thermo Elektron Corporation, Dreieich, Germany*)

Megafuge 1.0R (*Heraeus Holding GmbH, Hanau, Germany/jetzt Thermo Elektron Corporation, Dreieich, Germany*)

L

Laborglaswaren

Bechergläser (*50 bis 1000 ml, Schott AG, Mühllheim-Hügelheim, Germany*)

Erlenmeyerkolben (*50 bis 1000 ml, Schott AG, Mühllheim-Hügelheim, Germany*)

Flaschen (*250 bis 1000 ml, Schott AG, Mühllheim-Hügelheim, Germany*)

Messzylinder (*50 bis 1000 ml, Schott AG, Mühllheim-Hügelheim, Germany*)

Luminometer

Orion Microplate Luminometer mit Injection Unit (*Berthold Detection Systems, Pforzheim, Germany*)

M

Magnetrührer

IKA-KOMBIMAG RCO (*IKA®-Labortechnik, Staufen i. Br., Germany*)

IKAMAG® RCT (*IKA®-Labortechnik, Staufen i. Br., Germany*)

Mehrkanalpipetten

Transferpette-12 (*Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Germany*)

Calibra 852 (*Socorex Isba S.A., Ecublens, Schweiz*)

Mikropipetten

Pipetman® P10 bis 1000 (*Gilson International B.V., Bad Camberg, Germany*)

Mikropipettenspitzen → Pipettenspitzen

Microplate-Reader

Microplate Reader®, Model 550 + Microplate Manager® 4,0 (*Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany*)

Mikroskope

Axiovert 25 (*Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany*)

Mikrotiterplatten

96-Loch-Mikrotiterplatten MAXISorb® (*Nalge Nunc International, New York, USA*)

Mikrowellengerät

HF 22024/22034 (*Siemens AG, Karlsruhe, Germany*)

N

Nitrozellulosemembran (*Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany*)

Neutralrot Lösung (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany)

P

PCR-Thermocycler → Thermocycler

Petrischalen

Zellkulturschale (*100 x 20 mm, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany*)

Zellkulturschale (*50 x 20 mm, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany*)

für Bakteriologie (*100 x 20 mm, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany*)

pH-Messgerät

inoLab® (*WTW GmbH, Weilheim, Germany*)

Pipetten

Einwegpipetten, Cellstar® (*1 bis 25ml, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany*)

Pipettenspitzen

Gilson D10 bis D1000 (*Gilson International B.V., Bad Camberg, Germany*)

Pipettenspitzen mit Filter

ART GEL, 100 µl GEL loading (*Molecular Bioproducts Inc., San Diego, USA*)

ART Spitzen, 10 bis 1000 µl (*Molecular Bioproducts Inc., San Diego, USA*)

Pipettierhilfen

Pipetus-akku (*Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Germany*)

accu-jet (*Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Germany*)

pH-Meter

inoLab (*WTW GmbH, Weilheim, Germany*)

Phosphorimager

Personal Molecular imager FX (*Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany*)

Phosphorimagerplatte

Storage Phosphor Screen GP, 20 x 25 cm (*Kodak GmbH, Germany*)

Photometer

GeneQuant RNA/DNA Calculator (*Pharmacia Biotech, Cambridge, England*)

Polypropylenprobenröhrchen

15 ml (*Falcon™, BDBiosciences, Heidelberg, Germany*)

50 ml (*Falcon™, BDBiosciences, Heidelberg, Germany*)

Ponceau S, Na-Salz (*Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*)

Power-Pac

Standard Power Pack P25 (*Whatman Biometra, Biometra GmbH i.L., Göttingen, Germany*)

Power-Pac 300 (*Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany*)

Protein-A-Sepharose™ CL-48 (*PAS™, Amersham Bioscience Europe GmbH, Freiburg, Germany*)

R

Reaktionsgefäße

1, 5 ml (*Eppendorf AG, Hamburg, Germany*)

2, 0 ml (*Eppendorf AG, Hamburg, Germany*)

Röntgenfilm

BioMax MR-1 (*Kodak GmbH, Germany*)

Röntgenfilmentwicklergerät

Curix 60, Type 9462/106 (*Agfa Deutschland Vertriebsgesellschaft mbH & Cie.KG, Köln, Germany*)

Rotoren für Beckmann Optima™ LE-80K

Type 19 (*Beckman Coulter GmbH – Biomedical Research, Krefeld, Germany*)

SW 28 (*Beckman Coulter GmbH – Biomedical Research, Krefeld, Germany*)

SW 41 (*Beckman Coulter GmbH – Biomedical Research, Krefeld, Germany*)

Rotoren für Sorvall

SA-300 (*Heraeus Instruments, Hanau, Germany)*

S

Schüttler (→ Vortexer)

Vortex-Genie 2 (*Scientific Industries Inc., New York, USA*)

REAX 2000 (*Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Germany*)

Sicherheitswerkbänke

Modell HERAsafe HS12 (*Kendro Laboratory Products GmbH. Langensebold, Germany*)

Software

Simplicity 2.0 R1 (*Berthold Detection Systems, Pforzheim, Germany*)

Office 2000/2002 (*Microsoft Corporation, Unterschleißheim, Germany*)

Clone Manager (*Scientific Educational Software, Cary, USA*)

Microplate Manager® 4.0 (*Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany*)

Primer Designer (*Scientific Educational Software, Cary, USA*)

Quantitiy One 4.1.1 (*Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany*)

Reference Manager (*Thomson, ISI ResearchSoft, USA*)

Spannungsgerät

Standard Power Pack P25 (*Whatman Biometra, Biometra GmbH i.L., Göttingen, Germany*)

Power-Pac 300 (*Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany*)

Model 200/20 PowerSupply (*LKB Instruments, Bromma, Sweden*)

2301 MACRODRIVE 1 Power Supply (*LKB Instruments, Bromma, Sweden*)

Spitzen

ART GEL, 100 µl GEL loading (*Molecular Bioproducts Inc., San Diego, USA*)

ART Spitzen, 10 bis 1000 µl (*Molecular Bioproducts Inc., San Diego, USA*)

Sterilfilter

Minisart, 0,2 bis 0,45 µm (*Sartorius AG, Göttingen, Germany*)

Sterile Röhrchen

50 ml (*Falcon™, BDBiosciences, Heidelberg, Germany*)

15 ml (Falcon™, BDBiosciences, Heidelberg, Germany)

Schwenkapparatur

WT 16 (*Whatman Biometra, Biometra GmbH i.L., Göttingen, Germany*)

Polymax 1040 (*Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Germany*)

T

Taumel-Rotator (*neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Germany*)

Thermocycler

GeneAmp 9600 PCR System (*Perkin Elmer®, Boston, USA*)

GeneAmp 2400 (*Perkin Elmer®, Boston, USA*)

Thermoschüttler

Thermomixer 5436 (*Eppendorf AG, Hamburg, Germany*)

Thermostat → Block- oder Kältethermostat

U

Ultraschallgerät

Sonopuls HD 200 (*BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Germany*)

Ultraschallspitzen

TS73 (*BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Germany*)

Ultrazentrifuge

Beckman Optima™ LE-80K (*Beckman Coulter GmbH – Biomedical Research, Krefeld, Germany*)

Ultrazentrifugenröhrchen

UltraClear (*Beckman Coulter GmbH – Biomedical Research, Krefeld, Germany*)

UV-Transilluminator → Geldokumentationssystem

V

Vortexer (→ Schüttler)

Vortex-Genie 2 (*Scientific Industries Inc., New York, USA*)

REAX 2000 (*Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Germany*)

W

Waagen

SPO51 (*Scaltec Instruments GmbH, Göttingen, Germany*)

CP153 (*Sartorius AG, Göttingen, Germany*)

Wasserbad

Model WB22 (*Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Germany*)

Wippschüttler

Typ Unitwist RT (*Uniequip Company, Laborgerätebau & -vertriebs GmbH, Martinsried, Germany*)

CERTOMAT® TC3 (*B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Germany*)

Whatman-Papier

3MM-Papier (*Whatman Biometra, Biometra GmbH i.L., Göttingen, Germany*)

Z

Zählkammer

nach Neubauer (*Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Germany*)

Zellschaber

cell lifter (*Corning Incorporated Life Science, Acton, USA*)

disposable cell scraper (*Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany*)

Zentrifugen

Tischkühlzentrifuge, Biofuge fresco (*Heraeus Instruments, Hanau, Germany*)

Megafuge 1,0R (*Heraeus Instruments, Hanau, Germany*)

Sorvall RC-5C plus (*Heraeus Instruments, Hanau, Germany*)

Ultrazentrifuge: Optima™ LE-80K (*Beckman Coulter GmbH – Biomedical Research, Krefeld, Germany*)

Puffer, Lösungen und Reagenzien

A

Aceton (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany)

Acrylamidstammlösung (*Protogel®, national diagnostic, USA*)

Agarose

- Metaphor® (*Cambrex, Verviers, Belgium*)
- SeaKem® LE (Cambrex, Verviers, Belgium)

Alkalische Phosphatase (*CAP, calf intestinal Phosphatase, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim, Germany*).

Aluminiumhydroxid (*4 mg/ml, Imject Alum, Pierce Biotechnology Inc., Rockford, USA*)

Ammoniumpersulfat (*APS, Merck, Darmstadt, Germany*)

Ampicillin (*Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*)

Antikörper

- Merrettich-Peroxidase-gekoppelter Anti-Kaninchen (*Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., USA*)
- polyklonaler Anti-Vaccinia-Antikörper (*Quartett GmbH, Berlin, Germany*)
- biotinylierter Anti-Maus IgG1 (*Serotec GmbH, Düsseldorf, Germany*)
- biotinyliertem Anti-Maus IgG2a (*Serotec GmbH, Düsseldorf, Germany*)

B

Blockpuffer für den Immunostain

- PBS (pH 7,4)
- 3% FBS

Blockpuffer für Mäuseseren → ELISA-Blockpuffer

Blockpuffer für Rinderseren → ELISA-Blockpuffer

Bovines Serum Albumin (*BSA, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*)

Butanol (*Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*)

C

Carbonat-Bicarbonat Puffer (C-*3041, Carbonat Bicarbonat Buffer Capsules, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*)

$CaCl_2$ (*Calciumchlorid, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*)

Chemilumineszenz

- Lumilight™ (*Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany*)

Chloroform (*Merck, Darmstadt, Germany*)

Coating Puffer → ELISA-Coatingpuffer

Coomassie-Blau G250 (*Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*)

D

DAB-Färbung (*Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*)

DMSO (*Dimethylsulfoxid, Merck, Darmstadt, Germany*)

DNA-Größenstandard (*1Kb ladder, NEB BioLabs, Schwalbach, Germany*)

DNA-Probenpuffer

30 – 40 mg Bromphenolblau

5 ml 20% SDS

10 g Sucrose (Saccharose)

2 ml 0,5 M EDTA-Lösung

ad 20 ml A. bidest.

dNTP (*10 mM, Promega GmbH, Mannheim, Germany*),

DTT (*Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*)

E

E. coli-Stammes ELEKTROMAX™ DH10B™ Cells (*Gibco BRL®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany*)

EDTA (*Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*)

Elektrophoresepuffer für Agarosegel-Elektrophorese (→ TAE-Puffer)

Elektrophoresepuffer für SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese → WB-Laufpuffer (10x)

ELISA-Coatingpuffer (pH9,6)

70 mM $NaHCO_3$

30 mM Na_2CO_3

ELISA-Waschpuffer

44, 5 mM NaCl

0, 3 mM KH_2PO_4

1, 6 mM Na_2HPO_4 x$12H_2O$

0, 3 mM KCl

0, 05% Tween 20

ELISA-Blockpuffer für Mausseren

PBS

10% FBS

0,05% Tween 20

ELISA-Blockpuffer für Rinderseren

PBS

0,05 Tween 20

ELISA Kits

DuoSet ELISA Systems von (*R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA*)

Maus IL-18 ELISA Kit von (*Medical & Biological Laboratories Co., Ltd., MBL, Nagoya, Japan*)

Ethanol (*Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*)

Ethidiumbromid (*Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*)

F

Farbstoffe

Bromphenolblau (*Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*)

Neutralrot Lösung (*Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*)

Ponceau S, Na-Salz (*Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*)

Trypanblau (*Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*)

Fixierungspuffer für RIPA-Gele

50% Isopropanol

10% Eisessig

ad 500 ml A. bidest.

G

Glyzerin (*Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany*)

I

Isoamylalkohol (*Merck, Heidelberg, Germany*)

Isopropanol (*Merck, Heidelberg, Germany*)

K

KCl (*Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*)

Klenow-Enzym (*Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany*)

L

LB-Amp^{+} Nährboden-Platten

LB Medium

Low Melting Point Agarose (*L.M.P. Agarose, Gibco BRL®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany*)

Luziferase-Assay-Systems (*Promega GmbH, Mannheim, Germany*)

M

Methanol (*Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*)

Milchaustauscher (*Denkaveal Start, Denkavit Nederland BV, Voorthuizen, Niederlande*)

N

NaCl (*Merck, Darmstadt, Germany*)

Neutralrot Lösung (*Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*)

O

o-Dianisidine (*Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*)

P

PBS

80 g NaCl

2 g KCl

26,8 g Na2HPO4 – 7H2O

2,4 g KH2PO4

ad 1000ml A. bidest.

mit HCl auf pH 7,4 einstellen

PCR-Master-Mix (*ABgene®, Hamburg, Germany*)

Plasmid-Aufreinigungs-Kits

Plasmid Purification Maxi Kit (*Qiagen GmbH, Hilden, Germany*)

Plasmid Purification Kit (*Qiagen GmbH, Hilden, Germany*)

QiaquickGel Extraktion Kits (*Qiagen GmbH, Hilden, Germany*)

pNPP (*Paranitrophenylphosphat, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*)

Ponceau S, Na-Salz (*Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*)

Ponceau S-Lösung

2, 63 mM Ponceau S, Na-Salz

1% Essigsäure

Proteinase K (*Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*)

Q

Quell-Puffer für RIPA-Gele

20% Ethanol

10% Glycerin

ad 500 ml A. bidest.

Phosphatpuffer (PP) 0,1M pH 8,1:

A. 26,70 g Na2HPO4.2H20 ad 1,5 l A. bidest. (pH 9,09)

B. 1,38 g NaH2PO4.H20 ad 100 ml A. bidest. (pH 5,08)

Zirka 70 ml der Lösung B in die Lösung A geben, bis sich ein von pH 8,1 einstellt

R

RIPA-Fixierungspuffer → Fixierungspuffer

RIPA-Lysispuffer

10 mM Tris pH 7,4

150 mM NaCl

1% Natriumdeoxycholat

1% Triton X-100

RIPA-Quellpuffer → Quellpuffer

S

[^{35}S] Methionin-/Cystein-ProMix (*Amersham Bioscience Europe GmbH, Freiburg, Germany*)

Saccharose (*Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*)

SDS (*Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*)

SDS-Probenpuffer (2x)

150 mM Tris-HCl pH 6,8

1,2% SDS

30% Glycerol

16% β-Mercaptoethanol

Spatelspitze Bromphenolblau

SDS-Probenpuffer (5x)

150 mM Tris pH 6,8

4% SDS

30% Glycerol

16% β-Mercaptoethanol

Spatelspitze Bromphenolblau

T

TAE-Puffer (50x)

242 g Tris-Base

57,1 ml Eisessig

100 ml einer 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,0)

1: 50 mit A. bidest. auf 1x TAE-Puffer verdünnen

TAE-Puffer (1x)

40 mM Tris-Base

1 mM EDTA

(→ TAE-Puffer (50x)

1: 50 mit A. bidest. auf 1x TAE-Puffer verdünnen)

TEMED (*Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany*)

TEN-Puffer (pH 7,8)

20 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

0,15 M NaCl

TE-Puffer

10mM Tris-HCl

0,1mM EDTA (pH 8,0)

Tris-Base (*Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany*)

Tris-HCl (*Tris-hydrochlorid oder Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany*)

Triton-X-100 (*Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*)

Trypanblau (*Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*)

T4-DNA-Polymerase (*1U/µl, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany*)

T4-DNA-Ligase (*1 U/µl, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany*)

Tween-20 (*Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*)

W

Waschpuffer → ELISA

WB-Blockpuffer

PBS

1% BSA

WB-Laufpuffer (10x)

25 mM Tris-Base

192 mM Glycin

1% SDS

WB-Laufpuffer (1x)

1 Teil WB-Laufpuffer (10x)

9 Teile A. bidest.

WB-Lysispuffer → Zelllysispuffer

WB-Transferpuffer (5x Salze)

25 mM Tris-Base

192 mM Glycin

WB-Transferpuffer (1x)

20% WB-Transferpuffer (5x Salze)

20% Methanol

60% A. bidest.

Z

Zelllysispuffer

50 mM Tris-HCl (pH8,0)

150 mM NaCl

0,02% NaN_3

1% Triton X-100 oder NP-40

100 µg/ml PMSF

Sequenzen

BRSV-F Sequenz (1724 bp)

1 ATGGCGGCAA CAGCCATGAG GATGATCATC AGCATCATCT TCATCTCTAC
51 CTATGTGACA CATATCACTT TATGCCAAAA CATAACAGAA GAATTTTATC
101 AATCAACATG CAGTGCAGTT AGTAGAGGTT ACCTTAGTGC ATTAAGAACT
151 GGATGGTATA CAAGTGTGGT AACAATAGAG TTGAGCAAAA TACAAAAAAA
201 TGTATGTAAC AGTACTGATT CAAAAGTGAA ATTAATAAAG CAAGAACTAG
251 AAAGATACAA CAATGCAGTA GTGGAATTGC AGTCACTTAT GCAAAATGAA
301 CCGGCCTCCT CCAGTAGAGC AAAAAGAGGG ATACCAGAGT TGATACATTA
351 TAAAAGAAAC TCTACAAAAA AGTTTTATGG GCTAATGGGC AAAAAGAGAA
401 AAAGGAGATT TTTAGGATTC TTGCTAGGTA TTGGATCTGC TATTGCAAGT
451 GGTGTAGCAG TGTCCAAAGT ACTACACCTG GAGGGAGAGG TGAATAAAAT
501 TAAAAATGCA CTGCTATCCA CAAATAAAGC AGTAGTTAGT CTATCCAATG
551 GAGTTAGTGT CCTAACTAGC AAAGTACTTG ATCTAAAGAA CTATATAGAC
601 A AAGAGCTTC TACCTAAAGT TAACAATCAT GATTGTAGGA TATCCAACAT
651 AGCAACTGTG ATAGAATTCC AACAAAAAAA CAATAGATTG TTGGAAATTG
701 CTAGGGAATT TAGTGTAAAT GCTGGTATTA CCACACCCCT CAGTACATAC
751 ATGTTGACCA ATAGTGAATT ACTATCACTA ATTAATGATA TGCCTATAAC
801 G AATGACCAA AAAAAGCTAA TGTCAAGTAA TGTTCAAATA GTCAGGCAAC
851 AGAGTTATTC CATTATGTCA GTGGTCAAAG AAGAGGTCAT GGCTTATGTT
901 GTACAATTAC CTATTTATGG AGTTATAGAC ACCCCCTGTT GGAAACTACA
951 CACCTCTCCA TTATGCACCA CTGATAATAA AGAAGGGTCA AACATCTGCT
1001 TAACTAGGAC AGATCGTGGG TGGTATTGTG ATAATGCAGG CTCTGTGTCT
1051 TTTTTCCCTC AGGCAGAGAC ATGTAAAGTA CAATCAATAG AGTGTTCTGT
1101 GACACAATGA ACAGTTTAAC TCTGCCTACT GATGTTAACT TATGCAACAC
1151 TGACATATTC AATGCAAAGT ATGACTGTAA AATAATGACA TCTAAAACTG
1201 ACATAAGTAG CTCTGTAATA ACTTCAATAG GAGCTATTGT ATCATGCTAT
1251 GGGAAGACAA AATGTACAGC CTCTAATAAA AATCGTGGAA TCATAAAGAC
1301 TTTTTCCAAT GGGTGTGATT ATGTATCAAA CAAAGGAGTT GATACTGTAT
1351 CTGTTGGTAA CACACTATAT TATGTAAATA AGCTAGAGGG GAAAGCACTC
1401 TATATAAAGG GTGAACCAAT TATTAATTAC TATGATCCAC TAGTATTTCC
1451 TTCTGATGAG TTTGATGCAT CAATTGCCCA AGTAAACGCA AAAATAAACC
1501 AAAGCCTGGC TTTCATACGT CGATCTGATG AGTTACTTCA CAGTGTAGAT
1551 GTAGGAAAAT CCACCACAAA TGTAGTAATT ACTACTATTA TCATAGTGAT
1601 AGTAGTAGTG ATATTAATGT TAATAGCTGT AGGATTACTG TTTTACTGTA
1651 AGACCAGGAG TACTCCTATC ATGTTAGGAA AGGATCAGCT TAGTGGTATC
1701 AACAATCTTT CCTTTAGTAA ATGA

BRSV-G-Sequenz ((KUHNLE et al. 1998), 854 bp)

1 ATGTGGCACA GGCTCAGGCA CGCCAGGTTA CCCTCGCACG TGCTGCACGG
51 GACGTACGGC AGCGTCTGGA AGTTGTTGTG GTCCTGGTGG TTCTCCGGCG
101 GTATCGATCC GCTCGGGTTG ATCGGCGGCT TGCGCGTCGC CGGCAGCGTG
151 CTCTGGCCTT TGATCTTGCG GTTCTGCGTC TCGTTCGTGC TGTGGCCATA
201 CGTGATGCCG CGCGTCGTGT CGATGTTCAG CAGCTGGCTT AAGGTCGTGC
251 TCTGGATGCT CGTGTGCGTG CTCTTGTAGT TGTGCTCCGT GAAGAACGGG
301 CTCGTGTGGT TCTGCGGCTG CTGCGTCTGC TGGATCGTCG GCTTCGACGT
351 CGGCTTCGCC TTCGCGTTGC CCACGGAGAT GTAGATGATC GCCGTGATGA
401 CCAGGCTCGT CAGCGTGATC ATCGCGAGCG TGCTCAGCGC CGTCTGGACC
451 AGGCTCTTCA GGTTGAACTT GTACAGGCAG CTCAGGCCGA CGATGAAGTA
501 CTTGCTAGCC TTCCACGCGC GCTTCAGCGT CTTGAACTTC AGGTGGTGCG
551 TGTGGTTGCT CATACTTGTA AGCTCTAGGG GGATCCTCTA GAGTCAACCT
601 TATTTATGAT TATTTCTCGC TTTCAATTTA ACACAACCCT CAAGAACCTT
651 TGTATTTATT TTCAATTTTT AGCGATCCCC AACAGATCCG TTTAACGAAG
701 ACGACGAAGA AGCCGACGAA GACGACGATC CACCACCGCA CTAGTCCGGA
751 GACGAAGCTC CAGCCGAAGA ACAACACGGC GACGCCGCAG CAAGGCATCC
801 TGAGCAGCA CGGAGCACCA CACGAACCAG AGCACGACGC AGATCTGAAA
851 AAAA

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Gerd Sutter bin ich für die Bereitstellung des Themas, meines Arbeitsplatzes, für die Unterstützung und sein stetes Interesse an dieser Arbeit und seine hilfreiche Diskussionsbereitschaft zu sehr großem Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. Uwe Truyen bin ich für die freundliche Übernahme der Betreuung dieser Arbeit und sein stetes Interesse an dieser Arbeit ebenfalls zu sehr großem Dank verpflichtet.

Besonders danke ich Frau Dr. Simone Hornemann für die freundliche und geduldige Betreuung und die gute Einführung in die „Geheimnisse der Molekularbiologie“.

Ganz besonders möchte ich auch Frau Dr. Caroline Staib für die Übernahme der Betreuung, für Ihre stets tatkräftige Unterstützung während der Planung und der Durchführung dieser Arbeit, für die Anregungen und das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit und Ihre Aufmunterungen, danken.

Für die fruchtbare Zusammenarbeit möchte ich mich bei Dr. Wieslawa Olszewska und Prof. Dr. Peter Openshaw vom Imperial College in London bedanken.

Für die außerordentlich freundliche Arbeitsatmosphäre und die stets unermüdlich entgegengebrachte gegenseitige Hilfe und Unterstützung bedanke ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe „Virale Vektoren“ an der GSF in München.

Besonders möchte ich mich bei Marcus Meyr („McMeyr“) für die stets unermüdliche Unterstützung bei jeglichen „Compüter-“ und anderen „Problemen", bedanken. Bei Ronny Ljapoci („Roniator“) für Seine überaus hilfreichen Tipps und Anregungen bei Versuchsdurchführungen. Bei Robert Baier („Taekwondo, Feng Shui und Tai Chi“) und Marianne Löwel („Schasmeng“), die beide eine sehr große Hilfe waren, von der Molekularbiologie bis zu den Weisheiten des Lebens. Außerdem möchte ich mich bei Andrea Troppmann und Kerstin Zarniko für Ihre Hilfe in allen Lebenslagen bedanken („DankeDankeDanke“) und natürlich bei meiner allerliebsten „Labormama“ Eliane Bilir.

Außerdem möchte ich mich bei meiner neuen Gruppe am Paul-Ehrlich-Institut bedanken, insbesondere bei Frau PD Dr. Barbara Schnierle, Dr. Holger Ludwig, Thomas Schulz und Melanie Kremer, für Ihre Unterstützung bei der endgültigen Fertigstellung.

Zusätzlich möchte ich ganz besonders herzlich Mirko Poppe danken, der mir mit viel Geduld, Liebe und Hilfsbereitschaft zur Seite stand.

Ganz besonders herzlich danke ich meinen Eltern, Monika und Erol Süzer und meiner Schwester, Suzan Süzer, die mir stets und immer und die größte Stütze sind und mir dadurch auch die Anfertigung dieser Arbeit ermöglichten.