

**Untersuchung von Modifiziertem Vaccinia Ankara  
Virus (MVA) zur Induktion Cytomegalovirus (CMV)  
spezifischer T-Zell-Antworten**

**Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Christin Flechsig**

**aus Würzen**

**Würzburg, 2011**

Eingereicht am: 01.07.2011

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Dandekar

1. Gutachter: PD Dr. Jürgen Löffler

2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Rudel

Tag des Promotionskolloquiums: 27.07.2011

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

## Erklärungen

Die vorliegende Arbeit wurde im Labor für Immuntherapie und Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation der Medizinischen Klinik und Poliklinik II des Universitätsklinikums Würzburg der Bayerischen Julius-Maximilians Universität Würzburg angefertigt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit

### **Untersuchung von Modifiziertem Vaccinia Ankara Virus (MVA) zur Induktion Cytomegalovirus (CMV) spezifischer T-Zell-Antworten**

selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Ferner erkläre ich, dass diese Arbeit noch nicht in einem anderen Studiengang als Prüfungsleistung verwendet wurde, und ich mit Ausnahme des Titels Diplom-Biologin keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, 2011

---

## Danksagung

Ich danke meinem **Doktorvater Dr. rer. nat. Jürgen Löffler** und **Prof. Dr. med. Hermann Einsele** ganz herzlich für die Überlassung dieses spannenden Themas. Außerdem danke ich **Prof. Dr. med. Hermann Einsele** für die Unterstützung bei der Antragstellung für ein Promotionsstipendium im Rahmen des Programms "Chancengleichheit für Frauen in Forschung und Lehre". Meinem **Doktorvater Dr. rer. nat. Jürgen Löffler** danke ich vor allem für seine ständige Bereitschaft zur Diskussion sowie für die Unterstützung von ihm und seiner Arbeitsgruppe bei der Durchführung der molekularbiologischen Versuche.

Meinem Chef und Betreuer **Dr. med. Götz Ulrich Grigoleit** danke ich besonders für das entgegengebrachte Vertrauen in meine Herangehensweise zur Bearbeitung der verschiedenen Fragestellungen sowie für seine Unterstützung und ständige Bereitschaft zur Diskussion.

**Prof. Dr. rer. nat. Thomas Rudel** vom **Lehrstuhl für Mikrobiologie** danke ich für die Rolle als Zweitgutachter sowie für die Unterstützung bei der Antragstellung für ein Promotionsstipendium im Rahmen des Programms "Chancengleichheit für Frauen in Forschung und Lehre".

**Dr. med. Markus Kapp** möchte ich für seine konstruktiven Vorschläge und Unterstützung danken.

Unseren Kooperationspartnern **Dr. med. vet. Yasemin Süzer** und **Prof. Dr. med. vet. Gerd Sutter** möchte ich für die Bereitstellung der rekombinanten Modifizierten Vaccinia Ankara Viren danken und für die Unterstützung beim Verfassen der zwei Publikationen, die im Rahmen dieser Arbeit entstanden sind.

**Dr. med. Sen Mui Tan** danke ich für ihre Hilfe bei klinischen Fragestellungen und für die Korrektur meiner zwei Publikationen.

Unseren beiden technischen Assistentinnen **Kerstin Kapp** und **Elke Baumeister** danke ich besonders für die Unterstützung im Laboralltag.

Außerdem danke ich allen **Mitarbeitern des C11** für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ein riesiges Dankeschön gebührt **meinen Eltern, meinem Bruder und meinem Freund Mark** für die seelische und moralische Unterstützung während der letzten Jahre.

Auch aus Steinen, die Dir in den Weg gelegt werden,  
kannst Du etwas Schönes bauen.

*Erich Kästner (1899 – 1974)*

*Für meine Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Zusammenfassung	1
Summary	2
1 Einleitung	4
1.1 Das humane Cytomegalievirus (CMV)	4
1.1.1 Taxonomie .....	4
1.1.2 Aufbau.....	4
1.1.3 Replikation .....	8
1.1.4 Epidemiologie und Übertragung .....	14
1.1.5 Klinik und Pathogenese.....	14
1.1.6 Immunreaktion und Immun- <i>Escape</i> -Mechanismen von CMV.....	17
1.1.7 Diagnose.....	20
1.1.8 Therapie und Prophylaxe.....	21
1.2 Das modifizierte Vaccinia Ankara Virus (MVA)	23
1.2.1 Abstammung von MVA.....	23
1.2.2 MVA als Impfvektor.....	26
1.3 Fragestellung	27
2 Material und Methoden	28
2.1 Material	28
2.1.1 Geräte .....	28
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	29
2.1.3 Chemikalien, Biochemikalien, Medien und Supplemente .....	30
2.1.4 Puffer, Lösungen und Zellkulturmedium.....	31
2.1.5 Antikörper.....	32
2.1.6 Primer und Sonden.....	35
2.1.7 Peptidemixe und MHC-I-Tetramere.....	36
2.1.8 Kits .....	36
2.2 Methoden	37
2.2.1 Gewinnung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)	37
2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	37
2.2.3 Generierung von Dendritischen Zellen .....	38
2.2.4 Selektion der Leukozyten .....	38
2.2.5 Modifizierte Vaccinia Ankara Viren.....	38

2.2.6	Untersuchung der Stabilität von MVA-IE1, MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1	41
2.2.7	Infektion der Leukozyten.....	41
2.2.8	Untersuchung des Tropismus von MVA.....	41
2.2.9	Phagozytose-Assay der Monozyten.....	42
2.2.10	Oberflächenfärbung der APCs.....	42
2.2.11	Intranukleäre Färbung von IE1 und pp65.....	42
2.2.12	Nachweis der Zytokin-mRNA-Expression durch quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR).....	43
2.2.13	Intrazelluläre Färbung von IL-12p35.....	45
2.2.14	Viabilität und Apoptose der APCs nach Infektion mit MVA.....	45
2.2.15	Phagozytose von Partikeln MVA-GFP infizierter B-Zellen durch iDCs ....	46
2.2.16	Ausreifung der DCs durch Antigen-Aufnahme von MVA infizierten B-Zellen	46
2.2.17	Immunogenität von MVA-IE1, MVA-pp65 oder MVA-pp65-IE1 innerhalb humaner PBMCs.....	47
2.2.18	Statistik.....	47
2.2.19	Software.....	48
3	Ergebnisse	49
3.1	Tropismus und Effekte von MVA-wt und MVA-GFP innerhalb von humanen Immunzellen	49
3.1.1	MVA infiziert bevorzugt APCs.....	49
3.1.2	Effekte von MVA-wt und MVA-GFP auf APCs.....	53
3.2	MVA-IE1, MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1	62
3.2.1	Stabilität von MVA-IE1, MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1.....	62
3.2.2	Intranukleäre Expression von IE1 und pp65 in APCs nach Infektion mit MVA-IE1, MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1.....	64
3.2.3	Effekte von MVA-IE1, MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1 auf DCs.....	66
3.2.4	Kreuzpräsentation der in MVA kodierten CMV-Antigene.....	70
4	Diskussion	79
4.1	Tropismus von MVA	79
4.2	Immunogenität von MVA	80
4.3	Sicherheit und Stabilität von MVA-IE1, MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1	84
4.4	Schlussfolgerung	86

---

5	Literaturverzeichnis	87
6	Abkürzungen	101
7	Publikationen	105

## Zusammenfassung

Eine Infektion mit dem humanen Cytomegalievirus ist immer noch eine der häufigsten und bedrohlichsten Komplikationen nach einer allogenen Stammzelltransplantation (SCT), welche eine hohe Morbidität und Mortalität verursacht. Die prophylaktische oder präemptive antivirale Chemotherapie konnte den frühen Ausbruch einer CMV-Erkrankung während der ersten 100 Tage nach SCT signifikant reduzieren, jedoch kommt es dadurch häufig zu einem späten Ausbruch der CMV-Erkrankung und schwerwiegenden Nebenwirkungen wie Myelotoxizität und Nephrotoxizität. Zur Bekämpfung und Langzeitkontrolle einer CMV-Infektion ist eine effiziente zellvermittelte CMV-spezifische Immunität unabdingbar. Im Rahmen dieser Dissertation, wurden deshalb drei CMV-Vakzinkandidaten basierend auf dem hoch attenuierten Modifizierten Vaccinia Ankara Virus (MVA), welche stabil pp65 und/oder IE1 (MVA-IE1, MVA-pp65, and MVA-IE1-pp65) exprimieren und zugleich frei von Selektionsmarkern sind, auf ihre Fähigkeit hin untersucht CMV-spezifische T-Zellantworten zu induzieren. Als erstes wurden humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) und Leukozytensubpopulationen (aus Monozyten generierte dendritische Zellen (DCs), Monozyten und B-Zellen) mit MVA infiziert um deren Infektionsrate, Veränderungen in der Expression der Oberflächenmarker und der Zytokinexpression sowie deren Apoptoserate zu untersuchen. Monozyten, DCs und B-Zellen waren besonders empfänglich für eine MVA-Infektion, gefolgt von NK-Zellen. Monozyten wurden stark aktiviert, was sich durch eine erhöhte Expression der kostimulatorischen Moleküle, MHC-Komplexe und CCR7 zeigte, wohingegen DCs eine inkomplette Aktivierung vorwiesen und B-Zellen gehemmt wurden. Des Weiteren wurde die Expression von CXCL10, TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-12 signifikant in den Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) erhöht, aber die von IL-1 $\beta$  und IL-10 blieb unverändert oder wurde sogar signifikant reduziert. MVA induzierte also eine Th1-polarisierenden Zytokinexpression in den APCs. Allerdings konnten CMV-spezifische T-Zellen nicht mit direkter Antigenpräsentation durch DCs expandiert werden, da die DCs nach Infektion mit MVA schnell durch Apoptose starben und eine unzureichende Expression der kostimulatorischen Moleküle und MHC-Komplexe aufwiesen. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass die erfolgreiche Expansion CMV-spezifischer T-Zellen mittels Kreuzpräsentation von Antigenen MVA-infizierter Leukozyten durch DCs erfolgte. Die Phagozytose von apoptotischen Material von MVA-infizierten Leukozyten mit anschließender Antigenprozessierung induzierte eine vollständige Ausreifung der DCs

*in vitro* einhergehend mit erhöhter IL-12-Expression, was erheblich zu einer erfolgreichen T-Zell-Stimulation und –Expansion beitrug. Neben pp65-spezifischen T-Zellen wurden auch IE1-spezifische T-Zellen expandiert, wenn auch in einem geringeren Ausmaß. Der größte Teil der expandierten T-Zellen wies einen Effektor-Gedächtnis-(EM)-Phänotyp auf. Ein kleinerer Anteil besaß jedoch einen zentralen Gedächtnis-(CM)-Phänotyp, welcher bekannt ist für eine Langzeitpersistenz und eine erfolgreiche Etablierung eines T-Zell-Gedächtnis-Pools. Darüber hinaus wurden keine Vaccinia-spezifischen T-Zellen der pockengeimpften Spender expandiert. Wodurch ist die Immunogenität der CMV-Antigene nicht beeinträchtigt ist. Die drei untersuchten MVA-CMV-Vakzinkandidaten erfüllen alle Stabilitäts-, Immunogenitäts- und Sicherheitsbestimmungen der Europäischen Arzneimittelbehörde (EMA) für virale Vektorimpfstoffe und sind deshalb bereit für die cGMP-Produktion und anschließende klinische Prüfung.

## Summary

Infection with human Cytomegalovirus (CMV) remains one of the most frequent and life threatening complications after allogenic stem cell transplantation (SCT) causing serious morbidity and mortality. Prophylactic or preemptive antiviral chemotherapy could significantly reduce the early onset of CMV disease during the first 100 days after SCT but at the expense of an increasing late onset CMV disease and severe side effects like myelotoxicity and nephrotoxicity. An efficient cell mediated CMV specific immunity is crucial to eradicate CMV for long-term control of CMV infection. In the scope of this dissertation, three CMV vaccine candidates based on the highly attenuated modified vaccinia Ankara Virus (MVA) with stable expression of pp65 and/or IE1 (MVA-IE1, MVA-pp65, and MVA-IE1-pp65) without any selection marker were examined for the induction of CMV-specific T cell responses. At first, Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and leukocyte subpopulations (monocyte derived dendritic cells (DCs), monocytes and B cells) were infected with MVA in order to evaluate their infection rate, changes in surface markers, cytokine expression and apoptosis. Monocytes, DCs and B cells were most susceptible to MVA infection followed by NK cells. Monocytes were activated strongly with upregulation of costimulatory molecules, MHC-complexes and CCR7 while DCs showed an incomplete activation and B cells were inhibited. Furthermore, expression of CXCL10,

TNF $\alpha$ , IL-6 and IL-12 were enhanced in antigen presenting cells (APCs) but IL-1 $\beta$  and IL-10 were stable or even downregulated. Thus, MVA seems to induce a Th1-polarizing cytokine expression in APCs. However, successful expansion of CMV specific T cells could not be achieved via direct antigen presentation by DCs, as the DCs died fast after infection with MVA by apoptosis and displayed an insufficient expression of costimulatory molecules and MHC-complexes. Rather, it could be shown that successful expansion of CMV specific T cells is achieved via cross presentation of antigens from MVA infected leukocytes by bystander DCs. Phagocytosis of apoptotic material from MVA infected leukocytes and subsequent antigen processing induced a full maturation of DCs *in vitro* with upregulation of IL-12 expression and hence, makes a considerable contribution to a successful T cell stimulation and expansion. In addition to pp65 specific T cells, also IE1 specific T cell could be expanded but to a lower extend. The major part of expanded T cells displayed an effector memory (EM) phenotype. However, the minor part of expanded T cells displayed a central memory (CM) phenotype, which is known for long-term persistence and successful establishment of a memory T cell pool. Moreover, vaccinia specific T cells of smallpox vaccinated donors could not be expanded. Thus, the immunogenicity to the CMV antigens is not impaired. The MVA-CMV vaccine candidates fulfill all terms of stability, immunogenicity, and safety of the European Medicines Agency (EMA) for viral vector vaccines. Therefore, the MVA-CMV vaccine candidates are ready for cGMP production and subsequent clinical trials.

# 1 Einleitung

Das Cytomegalievirus (CMV) ist eine der häufigsten und bedrohlichsten Infektionskomplikationen nach allogener Stammzelltransplantation (SCT). Um eine stabile Immunantwort gegen diese Infektion bei Stammzellempfängern zu etablieren, wurden auf dem modifizierten Vaccinia Ankara Virus (MVA) basierende CMV-Vakzine entwickelt. Diese MVA-Rekombinanten, welche die beiden am stärksten immunogenen Antigene IE1 und pp65 aus CMV enthalten, sollten *in vitro* auf deren Fähigkeit hin untersucht werden, CMV-spezifische T-Zellen zu induzieren.

## 1.1 Das humane Cytomegalievirus (CMV)

### 1.1.1 Taxonomie

Das humane Cytomegalievirus (CMV), auch humanes Herpesvirus 5 (HHV5) genannt, gehört zur Unterfamilie der  $\beta$ -Herpesviren aus der Familie der *Herpesviridae* (Modrow et al. 2010a). Weitere Vertreter der insgesamt 8 bekannten humanpathogenen *Herpesviridae* sind das Herpes-Simplex-Virus 1 (HSV1/HHV1), das Herpes-Simplex-Virus 2 (HSV2/HHV2) und das Varicella-Zoster-Virus (VZV/HHV3), welche zu den  $\alpha$ -Herpesviren gehören, sowie das Epstein-Bar-Virus (EBV/HHV4) als Vertreter der  $\gamma$ -Herpesviren (Modrow et al. 2010a). Darüber hinaus gibt es auch Herpesvirusinfektionen bei vielen Wirbeltierarten wie Katzen, Nagetieren, Hunde und Affen, die sich ebenfalls in die 3 genannten Unterfamilien einteilen lassen (Modrow et al. 2010a). Diese Unterfamilien unterscheiden sich in ihrer Pathogenität, in ihrem Zelltropismus und in ihren Vermehrungseigenschaften. Jedoch teilen alle *Herpesviridae* ein charakteristisches Merkmal: sie können nach einer Erstinfektion *latent* im Organismus verbleiben (Modrow et al. 2010a).

### 1.1.2 Aufbau

#### 1.1.2.1 Viruspartikel

Die Struktur des CMV-Virions, das ein Durchmesser von 150nm bis 200nm hat, kann man in 3 Bereiche unterteilen: das Capsid, das Tegument und die Lipidhülle (Britt und Boppana 2004; Landolfo et al. 2003). Im Inneren befindet sich, mit einem Durchmesser von 100nm, das ikosaedrische Capsid, das aus 150 Hexonen (Capsomere), 12 Pentonen (p115) und 320 Triplexen besteht (Britt und Boppana 2004; Landolfo et al. 2003; Modrow et al. 2010a). Wobei sich die Pentone an den Ecken des

Ikosaeders befinden und die Triplexen zwischen den Hexonen und Pentonen (Britt und Boppana 2004; Modrow et al. 2010a). Desweiteren setzt sich das Capsid aus 5 Proteinen zusammen: pUL86 (Haupt-Capsid-Protein), pUL48,5 (kleinstes Capsid-Protein), pUL85 (Neben-Capsid-Protein), pUL46 (Neben-Capsid-Bindeprotein) und Teile des pUL80 (Assemblin) (Britt und Boppana 2004; Landolfo et al. 2003; Modrow et al. 2010a). Das Haupt-Capsid-Protein pUL86 kommt mit 960 Kopien am häufigsten vor und bildet die Hexone und Pentone. Je zwei UL85-Proteine und ein UL46-Protein bilden die Triplexen. Das kleinste Capsid-Protein pUL48,5 ist an die Hexone angelagert (Britt und Boppana 2004).

Die Tegumentschicht befindet sich zwischen dem Capsid und der Lipidhülle (Kalejta 2008a). Das Tegument ist unstrukturiert und enthält 20-25 Strukturproteine, von denen die meisten phosphoryliert sind (Baldick und Shenk 1996; Kalejta 2008a). Die wichtigsten Tegumentproteine und deren Funktion sind in Tabelle 1 aufgelistet.

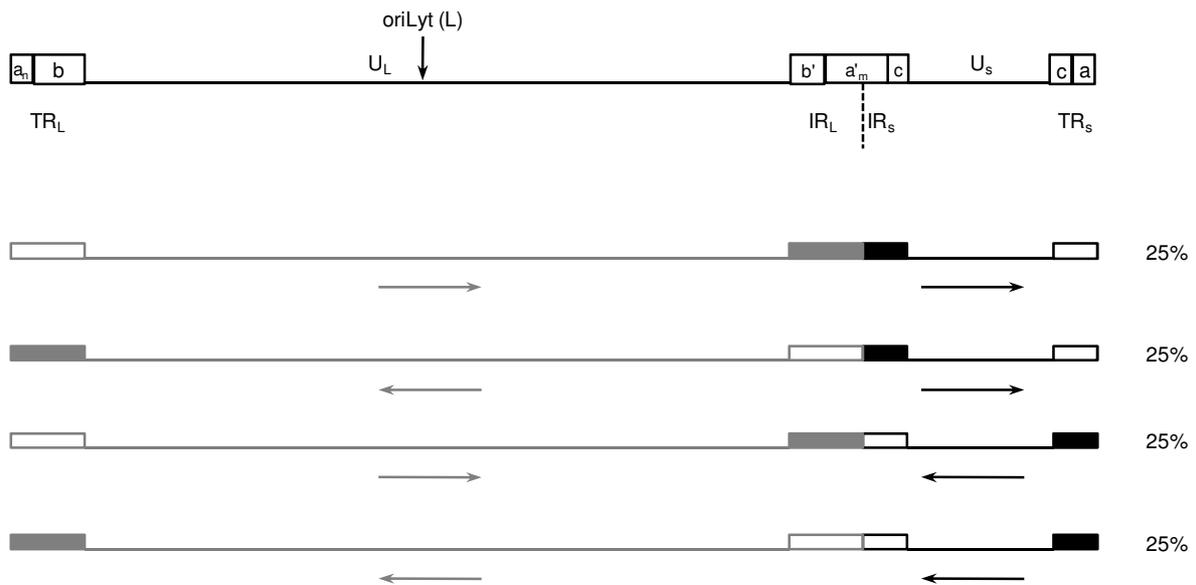
Tabelle 1: Tegumentproteine des CMV-Virions (nach Kalejta 2008a und Modrow et al. 2010b)

Protein	Modifikation	Funktion	Referenz
UL25	phosphoryliert	Wechselwirkung mit pp28	(Battista et al. 1999)
UL26		Stabilität der Viruspartikel	(Lorz et al. 2006)
UL32/pp150	phosphoryliert N-Acetyl- Glucosamin	Akzeptor von Phosphatgruppen durch die virionassoziierte Proteinkinase; wichtig um Capside zur finalen Umhüllung zu bringen	(AuCoin et al. 2006)
UL35		wichtig für den Tegument-Aufbau	(Schierling et al. 2005)
UL47		Freisetzung der Virus-DNA aus dem Capsid, bindet an UL48 und UL69	(Bechtel und Shenk 2002)
UL48/p112		Freisetzung der Virus-DNA aus dem Capsid, DNA-Spaltung	(Bechtel und Shenk 2002)
UL69		Export von ungespleißter RNA aus dem Nukleus in das Cytoplasma; ruft einen Arrest in der G <sub>1</sub> -Phase des Zellzyklus hervor	(Lischka et al. 2006; Lu und Shenk 1999)
UL82/pp71	phosphoryliert	transaktives Protein, induziert die Transkription der <i>immediate early</i> -Gene, bewirkt beim humanen Cytomegalovirus SUMOylierung von Daxx; vermittelt Rb-Degradierung	(Hume et al. 2008; Spaete und Mocarski 1985; Stinski und Roehr 1985)
UL83/pp65	phosphoryliert	Proteinkinase und Akzeptor von Phosphatgruppen; wirkt der angeboren und der adaptiven Immunantwort entgegen, fördert die Inkorporation von ppUL97, UL25 und UL69 in das Tegument	(Modrow et al. 2010a)
UL97/ppUL97	phosphoryliert	Proteinkinase (die auch Ganciclovir phosphoryliert); wichtig für den Aufbau des Virions (Austritt der DNA-gefüllten Capside aus dem Nukleus, Mislokalisierung von Tegumentproteinen und Auflösung nukleärer Aggresome, die Tegumentproteine enthalten)	(Azzeq et al. 2006; Krosky et al. 2003; Littler et al. 1992; Prichard et al. 2005; Prichard et al. 2008; Sullivan et al. 1992)
UL99/pp28	phosphoryliert myristyliert	ist mit viralen und zellulären Membranen assoziiert und vermittelt die komplette Umschließung eingehüllter Viruspartikel	(Sanchez et al. 2000)
US22/pIRS1 und pTRS1		Stopp der zellulären Proteinsynthese	(Kalejta 2008a)

In die Hüllmembran des CMV-Virions sind die Glycoproteine gB (gbUL55), gH (gpUL75), gL (gpUL115), gM (gpUL100), gN (gpUL73) und gO (gbUL74) eingelagert. Diese bilden mittels Disulfidbrücken Komplexe miteinander: gCI (gB), gCII (gM/gN) und gCIII (gH, gL, gO) (Britt und Boppana 2004; Landolfo et al. 2003).

### 1.1.2.2 Genom und Genomaufbau

Das CMV besitzt eine doppelsträngige DNA (dsDNA), die beim Laborstamm AD169 aus 229345 Basenpaaren (bp) besteht und für 225 offene Leserahmen (ORFs) kodiert (Chee et al. 1990; Novotny et al. 2001). Darin kommen einmalige lange (*unique long*, UL) und kurze (*unique short*, US) sowie wiederholte (*repeat*) Sequenzabschnitte vor (Landolfo et al. 2003; Modrow et al. 2010a). Da jede UL- und US-Sequenz in jede Richtung angeordnet sein kann, entstehen während der Virusreifung 4 Genom-Isomere. Die Inversion von UL- und US-Regionen wird hierbei von direkten Sequenzwiederholungen (*a*, *b*, *c*) an den Genomenden und den invertierten Wiederholungselementen and der UL-US-Verbindung (*a'*, *b'*, *c*) vermittelt (Landolfo et al. 2003) [Abbildung 1]. Die ORFs sind nach ihrem Vorkommen in diesen UL- und US-Regionen benannt und werden teilweise unter Verwendung unterschiedlicher Leseraster von miteinander überlappenden Leserahmen exprimiert (Landolfo et al. 2003; Modrow et al. 2010a). Jeder Leserahmen wird dabei von einem Promotor kontrolliert, der über Erkennungsstellen für die eukaryotische RNA-Polymerase II verfügen (Modrow et al. 2010a). Außerdem besitzen die Promotorbereiche Bindungsstellen für zelluläre und virale Transaktivatoren, die regulieren, zu welchem Zeitpunkt des Infektionszyklus das entsprechende Gen aktiviert und exprimiert wird (Modrow et al. 2010a). Desweiteren liegt die Ausgangsstelle für die Genomreplikation (*oriLyt*) in der Mitte der UL-Region [Abbildung 1] (Modrow et al. 2010a).



**Abbildung 1: Struktur der 4 CMV-Genom-Isomere (nach Modrow et al. 2010a)**

Balken stellen Sequenzwiederholungen dar und befinden sich an den Genomenden (TR = terminal repeat) und innerhalb des Genoms (IR = internal repeat). Die einmalig vorkommenden Genomabschnitte sind als Striche repräsentiert. Der Replikationsursprung ist als  $oriLyt$  gekennzeichnet. Die Buchstaben der terminalen und internen Wiederholungseinheiten kennzeichnen identische Basenfolgen, die jedoch jeweils invertiert zueinander vorliegen. Dadurch entstehen bis zu vier verschiedene isomere Formen des Genoms. Die Wahrscheinlichkeiten, mit denen die Isomere in den Virionen gefunden werden, sind jeweils angegeben.

### 1.1.3 Replikation

#### 1.1.3.1 Lytischer Infektionszyklus

Um eine humane Zelle zu infizieren bindet CMV zunächst über  $gC_I$  oder  $gC_{II}$  an Heparan-Sulfat-Proteoglykane (HSPGs) [Abbildung 2 (1)]. Anschließend interagiert  $gC_I$  mit dem epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) [Abbildung 2 (2)].  $gC_{III}$  vermittelt schließlich mit einem unbekanntem Bindungspartner die Fusion mit der Zellmembran. Desweiteren bindet  $gC_{II}$  an  $\beta 1$ -Integrine, wodurch es die Fusion, die Internalisierung und Signale für den viralen Lebenszyklus vermittelt [Abbildung 2 (3)].  $gC_{II}$  bindet außerdem auch an *Toll-like* Rezeptor (TLR)2 und aktiviert so angeborene die Immunität (Compton 2004).

Nach der Fusion mit der Zellmembran werden das Capsid und die Tegumentproteine in das Zytoplasma entlassen. Einige Tegumentproteine verbleiben im Zytoplasma und andere, wie  $pp65$  und  $pp71$ , die ein Kerntransportsignal besitzen, wandern scheinbar unabhängig in den Zellkern [Abbildung 2 (5)]. Weitere Tegumentproteine, wie  $UL47$ ,  $UL48$  und  $pp150$ , wiederum begleiten das Capsid entlang von Mikrotubuli (MT) zu den

Kernporen [Abbildung 2 (4)], durch die die virale DNA in den Zellkern gelangt [Abbildung 2 (6)] und mit zellulären Histonen (H) assoziiert [Abbildung 2 (7)] (Kalejta 2008b, 2008a; Landolfo et al. 2003). Anschließend zirkularisiert das virale Genom und liegt als Episom im Kernplasma vor (Modrow et al. 2010a).

Nach der Infektion einer Zelle mit CMV werden als erstes die *immediate early*-Proteine exprimiert. Die Expression der *immediate early*-Proteine wird vom Tegumentprotein pp71 induziert. pp71 ist ein Transaktivator und bindet zusammen mit zellulären Faktoren an den viralen Haupt-IE-Promotor (MIEP) (Kalejta 2008a; Modrow et al. 2010a). pp71 hebt hierbei den repressiven Effekt des zellulären *death-domain-associated protein* (Daxx) auf, welches eine Proteinkomponente der *premyelocytic leukemia nuclear bodies* (PML-NBs) ist [Abbildung 2 (8)]. Daxx interagiert hauptsächlich am MIEP mit dem viralen Genom, rekrutiert Histon-Deacetylasen (HDAC) sowie andere PML-NB-Komponenten und verursacht so transkriptionelle Repression [Abbildung 2 (9)] (Kalejta 2008b, 2008a; Modrow et al. 2010a). pp71 bindet an Daxx über zwei Daxx-Interaktionsdomänen und bewirkt dessen SUMOylierung [Abbildung 2 (10)], was den proteolytischen Abbau von Daxx und eine Derepression der *immediate early*-Genexpression zur Folge hat [Abbildung 2 (11)] (Kalejta 2008b, 2008a; Modrow et al. 2010a).

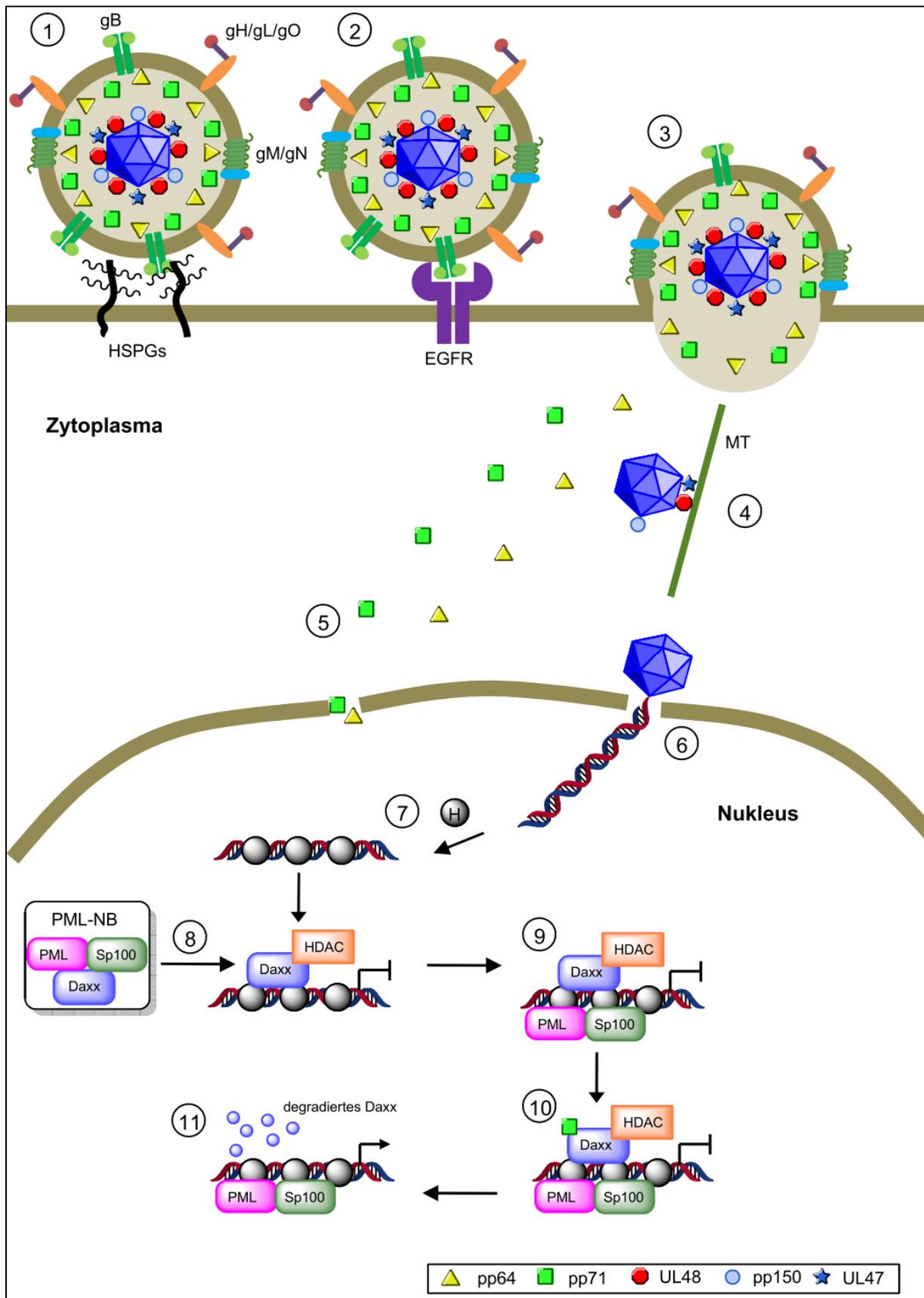
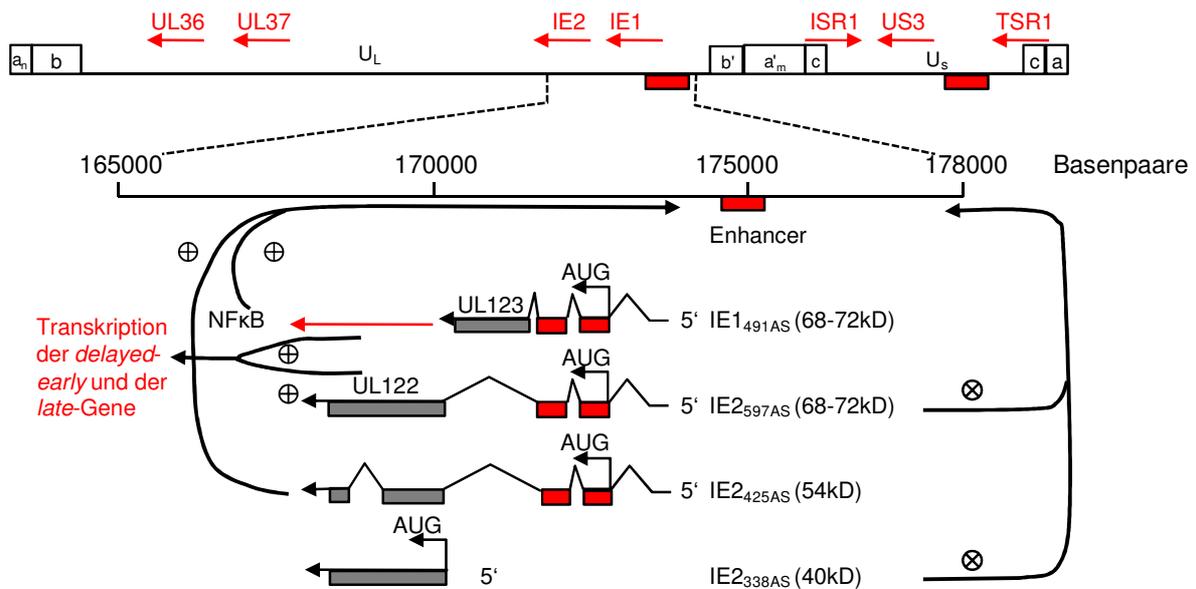


Abbildung 2: Binden von CMV an die Wirtszelle und Induktion der Expression der *immediate early*-Gene während des lytischen Infektionszyklus (nach Compton 2010 und Kalejta 2008b)

Insgesamt aktiviert pp71 4 Genomregionen: die *ie1/ie2*-Region, welche die ORFs UL123 und UL122 enthält; UL36-38; US3 und TRS1/IRS1 aus der US22-Familie [Abbildung 3] (Modrow et al. 2010a). Die *ie1/ie2*-Region wird von einem Enhancer kontrolliert, der Bindungsstellen für NF- $\kappa$ B, AP-1, Sp1 und CREB/ATF besitzt (Landolfo et al. 2003; Modrow et al. 2010a). Die AP-1- und CREB/ATF-Bindestellen reagieren jedoch auch auf pp71, wodurch dann die Transkription der *immediate early*-Gene induziert wird (B. Liu und Stinski 1992).

Mengenmäßig kommt bei einer Infektion das IE1-Protein (68-72kD) am häufigsten vor, das schon 1h nach der Infektion nachweisbar ist. IE1 setzt sich durch alternatives Spleißen aus den Exons 1, 2, 3 und 4 der MIEP-Region zusammen, wobei Exon 1 nicht translatiert wird und Exon 4 dem ORF UL123 entspricht [Abbildung 3] (Modrow et al. 2010a). IE1 wird phosphoryliert und SUMOyliert und wandert in den Zellkern, wo es die PML-NBs auflöst und an Metaphasechromatin bindet (Meier und Stinski 2006). Dort stimuliert IE1 dann die Expression von NF- $\kappa$ B und induziert zusammen mit NF- $\kappa$ B seine eigene Expression sowie die der *delayed early*- und der *late*-Gene (Modrow et al. 2010a). Neben IE1 sind in der MIEP-Region noch die IE2-Proteine kodiert. Diese kommen in 3 unterschiedlichen Versionen vor. In Version 1 und 2 (86kD und 54kD) sind die aminoterminalen Exons 2 und 3 identisch mit denen von IE1. Carboxyterminal befindet sich dagegen das Exon 5 der MIEP-Region, welches dem ORF UL122 entspricht. Jedoch befindet bei Version 2 durch alternatives Spleißen eine Deletion im Exon 5. Die Expression von Version 3 (40kD) wird erst später durch einen im ORF UL122 gelegenen Promotor induziert und ist mit dem Exon 5 der MIEP-Region identisch [Abbildung 3] (Modrow et al. 2010a). IE2/86kD und IE2/40kD binden an *cis-repression signal (crs-)* Sequenzen am Transkriptionsstart der IE1/IE2- und US3-Gene und unterdrücken deren Expression, wodurch die Expression der IE-Gene in den späten Stadien der Infektion unterbunden wird [Abbildung 3]. In den frühen Stadien des lytischen Infektionszyklus induziert IE2/86kD jedoch allein oder zusammen mit IE1 sowie zellulären Transkriptionsfaktoren die Expression von *delayed early*- und *late*-Genen und auch vielen zellulären Genen (Landolfo et al. 2003; Modrow et al. 2010a).



**Abbildung 3: Die immediate early-Gene des CMV (nach Modrow et al. 2010a)**

⊕ Aktivierung; ⊗ Hemmung

Die DNA-Replikation beginnt mehr als 16h nach der Infektion. Jedoch besitzt CMV nicht wie andere Herpesviren Enzyme wie die Thymidinkinase, die Dihydrofolatreduktase, die Thymidilatsynthase oder eine aktive Form der Ribonukleotidreduktase für die DNA-Biosynthese und ist deshalb vom Metabolismus der Wirtszelle abhängig. Deswegen wird die makromolekulare Synthese in der Wirtszelle nicht still gelegt sondern die zelluläre Transkription und Translation stimuliert und somit der Zellzyklus in der G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Phase arretiert (Landolfo et al. 2003; Modrow et al. 2010a). Zu den Hauptreplikationsproteinen, die in allen Herpesviren konserviert sind, gehört das ssDNA-bindende ppUL57, welches das *Reannealing* der DNA-Stränge nach dem Entwinden mit dem Helicase-Primase-Komplex verhindert. Dieser besteht wiederum aus den Proteinen von UL70, UL102 und UL105. Die DNA-Polymerase wird von UL54 kodiert und der DNA-Polymerase-Prozessivitätsfaktor von UL44. Desweiteren sind auch die Genprodukte der ORFs UL36-38, IRS1/TRS1, UL122-123, UL84 und UL112-113 an der DNA-Replikation beteiligt (Mercorelli et al. 2008). Die genauen Abläufe bei der DNA-Replikation sind noch nicht bekannt, jedoch weiß man, dass diese durch eine Interaktion von UL84 und IE2 initiiert wird und nach dem Prinzip des *rolling circle* abläuft (Landolfo et al. 2003; Modrow et al. 2010a).

Die Transkription der *late*-Gene startet mehr als 24h nach der Infektion noch während der DNA-Replikation (Landolfo et al. 2003; Modrow et al. 2010a). Über die Regulierung der Transkription der *late*-Gene weiß man nur wenig. Jedoch ist bekannt, dass die

Expression von pp65 durch Transaktivierung des UL83-Promoters mittels IE1 und IE2/86kD induziert wird (Landolfo et al. 2003). Die Glycoproteine werden an der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) synthetisiert und im *trans*-Golgi-Netzwerk, in den Golgi-Vesikeln mit Kohlenhydratgruppen modifiziert und zum Teil proteolytisch gespalten (Modrow et al. 2010a). Die Capsid-Proteine werden nach ihrer Synthese in den Zellkern transportiert und mit Hilfe von UL80a (Assemblin) zusammengebaut. Anschließend wird das virale Genom durch eine Öffnung, die von Portalproteinen gebildet wird, in das Capsid eingeschleust. Das Capsid wird dann durch Knospung von der Kernmembran umhüllt und gelangt über perinukleäre Zwischenräume und Zisternen zum ER. Die Transiente Virushülle verschmilzt mit dem ER und das Capsid wird ins Zytoplasma entlassen. An den konkaven Seiten der Zisternen des *trans*-Golgi-Netzwerkes akkumulieren die viralen Glycoproteine, an deren zytoplasmatischen Domänen sich die Tegumentproteine anlagern und mit den Capsiden interagieren. Als nächstes stülpt sich die Membran der *trans*-Golgi-Zisterne über das Capsid und umhüllt es zusammen mit den Tegumentproteinen (Modrow et al. 2010a). Dadurch gelangen die so umhüllten Viruspartikel in das Lumen des *trans*-Golgi-Netzwerkes und werden über die Golgi-Vesikel zur Zelloberfläche transportiert um dort 72h nach der Infektion in die Umgebung entlassen zu werden. Diese Virus-Partikel können sich jedoch auch durch Zell-Zell-Kontakte oder Zellfusionen ausbreiten (Landolfo et al. 2003; Modrow et al. 2010a).

### 1.1.3.2 Latenter Infektionszyklus

Während der latenten Infektion mit CMV wird die Expression der *immediate early*-Gene durch das zelluläre Daxx inhibiert [Abbildung 2 (9)]. Daxx kann bei der latenten Infektion im Vergleich zur lytischen Infektion nicht degradiert werden, weil pp71 im Zytoplasma festgehalten wird und somit nicht in den Zellkern wandern kann [Vergleich Abbildung 2]. Desweiteren kann pp71 auch Retinoblastom- (Rb)-Proteine nicht degradieren, welche E2F-reponsive Promotoren blockieren (Kalejta 2008a). Dies führt dazu, dass keine viralen Proteine exprimiert werden können. Das virale Genom, das als extrachromosomales Episom in mehreren Kopien im Zellkern vorliegt und mit den Wirtschromosomen assoziiert, wird jedoch durch die zelluläre DNA-Polymerase repliziert und an die Tochterzellen weitergegeben (Modrow et al. 2010a).

### 1.1.4 Epidemiologie und Übertragung

CMV ist weltweit verbreitet, wobei in Deutschland zwischen 40% und 90% der Bevölkerung infiziert sind. Am häufigsten wird CMV durch infizierte Zellen im Speichel oder durch Geschlechtsverkehr übertragen, aber auch durch Muttermilch, Blut, Urin oder während der Schwangerschaft auf den Fötus. Desweiteren kann CMV auch durch Organtransplantate, Blutprodukte oder SCT übertragen werden (Crough und Khanna 2009; Modrow et al. 2010a). Die Primärinfektion verläuft in immunkompetenten Individuen meist asymptomatisch (auf eventuelle Symptome wird in Abschnitt 1.1.5 genauer eingegangen). Jedoch persistiert das CMV-Genom in einem Latenzstadium lebenslang im Organismus unter der Kontrolle einer spezifisch zellvermittelten Immunität und kann in Phasen der Immunsuppression gelegentlich reaktiviert werden. CMV wird insbesondere von Kindern bis zu 3 Jahren aber auch darüber hinaus verstärkt ausgeschieden, da deren Immunsystem noch nicht vollständig entwickelt ist. Doch auch während der Schwangerschaft kann es bei 10% der Frauen zur Reaktivierung von CMV kommen, da durch die Hormonumstellung die zelluläre Immunabwehr geschwächt ist. Vor allem aber scheiden immundefiziente Patienten wie AIDS-Patienten, Transplantatempfänger und Tumorpatienten sehr große Virusmengen durch eine Reaktivierung von CMV aus (Modrow et al. 2010a).

### 1.1.5 Klinik und Pathogenese

CMV gelangt üblicherweise über das Epithel des Pharynx, des Ösophagus, der Atemwege und des Urogenitalsystems in den Körper. Anschließend wird es durch Leukozyten und vaskuläres Endothel im Körper verbreitet und infiziert zunächst duktale Epithelien. Typische Cytomegaliezellen kann man in den Speicheldrüsen, den Gallengängen, dem Bronchialepithel, dem Nierentubulusepithel, den Inselzellen, dem Epithel des Innenohres, dem Kapillarendothel, den Astrozyten und Neuronen nachweisen (Landolfo et al. 2003). Desweiteren kann virale DNA innerhalb der Leukozyten in Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten, CD34<sup>+</sup>-Knochenmarkzellen und unreife Dendritischen Zellen (iDCs) detektiert werden (Crough und Khanna 2009). Die Inkubationszeit einer CMV-Infektion liegt zwischen 4 und 8 Wochen. Wie bereits in Abschnitt 1.1.4 erwähnt verläuft die Primärinfektion bei immunkompetenten Personen meist asymptomatisch. In einigen Fällen kann es zum Mononukleose-Syndrom, das sich klinisch nicht von einer primären EBV-Infektion unterscheiden lässt, oder zu unspezifischen Symptomen mit Fieber, Lymphknotenschwellung,

Muskelschmerzen und Splenomegalie kommen [Tabelle 2] (Crough und Khanna 2009; Modrow et al. 2010a).

Bei ca. 1% bis 4% der Frauen kommt es während der Schwangerschaft zu einer Primärinfektion mit CMV, wobei bis zu 40% der Föten transplazentar infiziert werden (Kenneson und Cannon 2007; Stagno et al. 1986). Während des zweiten bis sechsten Schwangerschaftsmonat führt dies bei ca. 50% der Fälle zu schweren Schäden des Fötus. Doch auch durch Reaktivierung von CMV kann es zu einer Übertragung auf den Fötus kommen, wobei die Schädigungsrate aber nur 0,2% bis 2% beträgt (Modrow et al. 2010a). Abhängig vom Entwicklungsstadium kann es hierbei durch die Einschlusskörperchenkrankheit zu Schädigungen des Gehirns (Mikrozephalie), der Augen (Chorioretinitis) und des Gehörs sowie zu Hepatosplenomegalie und Thrombozytopenie kommen. Die Mortalitätsrate bei Neugeborenen mit diesen Symptomen beträgt ungefähr 30% (Kenneson und Cannon 2007; Malm und Engman 2007). Daneben kann auch eine peri- oder postnatale Übertragung von CMV stattfinden, was zu ähnlichen aber meist abgeschwächten Symptomen führen kann [Tabelle 2] (Modrow et al. 2010a).

In immunsupprimierten Individuen wie AIDS-Patienten und Organtransplantatempfängern (SOT-Empfänger), die immunsuppressive Medikamente bekommen, ist CMV eine schwerwiegende opportunistische Infektion. Bevor es zum Einsatz der hoch aktiven antiretroviralen Therapie (HAART) kam, litten 40% der AIDS-Patienten an einer CMV-Erkrankung (Steininger et al. 2006). Doch auch unter einer wirksamen antiretroviralen Therapie bleibt CMV eine wichtige Ursache für schwere Komplikationen bei HIV-Patienten, und es gibt Hinweise, dass es das Fortschreiten von AIDS beschleunigt und die Lebenserwartung von AIDS-Patienten reduziert (Paul D. Griffiths 2006; Sabin et al. 2000; Webster et al. 1989). In ca. 85% der AIDS-Patienten mit CMV tritt eine Retinitis mit hämorrhagischer retinaler Nekrose auf. Außerdem kann es auch zur Enterokolitis, Gastritis, Ösophagitis, Hepatitis, Encephalitis und Pneumonitis kommen, wobei die Pneumonitis die häufigste Todesursache von AIDS-Patienten ist [Tabelle 2] (Crough und Khanna 2009; Steininger et al. 2006; Yust et al. 2004).

Mehr als 50% der SOT-Empfänger haben eine CMV-Infektion, wobei 10% bis 50% Symptome entwickeln. Am höchsten ist das Risiko für Komplikationen, wenn ein seronegativer Empfänger ein Organ von einem seropositiven Spender erhält (Crough und Khanna 2009). Insbesondere die Verabreichung von Anti-Lymphozyten-

Antikörpern wie Anti-Thymozyten-Globulin und OKT3 können zu schweren Verläufen führen, weil große Mengen an TNF $\alpha$  und anderer proinflammatorischer Zytokine freigesetzt werden, welche in einer Reaktivierung von CMV involviert sind (Crough und Khanna 2009; Fietze et al. 1994). Es ist bekannt, dass TNF $\alpha$  mit dem TNF-Rezeptor auf latent infizierten Zellen interagiert, was zu einer Aktivierung der Proteinkinase C und von NF- $\kappa$ B führt und schließlich zu einer Transkription der *immediate early*-Gene (Prosch et al. 1995; Stein et al. 1993). Eine akute CMV-Infektion kann in SOT-Empfängern Fieber, Leukopenie, Arthralgie, Hepatitis, Pneumonitis, Enterokolitis, Enzephalitis, Chorioretinitis, Nephritis, Zystitis, Myokarditis oder Pankreatitis hervorrufen [Tabelle 2] (Crough und Khanna 2009). Vor allem aber kommt es häufig zu einer Transplantationsvaskulitis, die zu einer Abstoßung des Transplantats führen kann (Modrow et al. 2010a).

Bei Empfängern einer allogenen SCT kann eine CMV-Erkrankung eine interstitielle Pneumonie herbeiführen, was eine der häufigsten Todesursachen während der ersten 100 Tage nach einer SCT ist. Durch die Einführung einer präemptiven antiviralen Therapie ist das Risiko allerdings stark gesunken. Jedoch kommt es bei ca. 18% der Patienten mit einem Median von 169 Tagen nach SCT zu einer späten CMV-Erkrankung mit einer Mortalitätsrate von 46% (Boeckh et al. 2003a). Neben einer Pneumonitis und Gastroenteritis kommt es auch zur Retinitis und Enzephalitis [Tabelle 2]. Indikatoren für eine späte CMV-Erkrankung sind eine gesteigerte Viruslast, Lymphopenie und eine CMV-spezifische T-Zell-Immundefizienz (Boeckh et al. 2003b). Letzteres führt schließlich zusammen mit einer Störung der humoralen Immunantwort zu einer Superinfektion mit Bakterien, Pilzen und Protozoen (Landolfo et al. 2003). Im Gegensatz zu einer SOT wird eine CMV-Erkrankung hauptsächlich durch eine Reaktivierung bei seropositiven SCT-Empfängern (80%) und seltener durch eine Primärinfektion (30%) verursacht (Ljungman 2007). Die Reaktivierung von CMV wird besonders durch die verzögerte Rekonstitution der T- und B-Zell-Funktionen nach einer allogenen SCT begünstigt. Die Immunrekonstitution wird vor allem auch durch die T-Zell-Depletion des Transplantats vermindert, welche eine Graft-versus-Host-Reaktion vermeiden soll (Hebart und Einsele 2004). Die Auswirkung des CMV-Serostatus des SCT-Spenders wird kontrovers diskutiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass CMV-seropositive SCT-Empfänger eine höhere Überlebensrate zeigten, wenn sie eine SCT von seropositiven unverwandten Spendern erhielten (Ljungman et al. 2003).

**Tabelle 2: Klinische Merkmale einer CMV-Infektionen (Crough und Khanna 2009; Modrow et al. 2010a)**

Patiententyp	Klinische Merkmale
Gesunde Individuen	Meist asymptomatisch; selten Mononukleose-Syndrom mit Fieber, Lymphknotenschwellung, Muskelschmerzen und Splenomegalie
Fötus/Kind	Einschlusskörperchenkrankheit, Gelbsucht, Hepatosplenomegalie, Petechien durch Thrombozytopenie, Hörschäden, Sehstörungen, Mikrozephalie
AIDS/HIV	Interstitielle Cytomegalieviruspneumonie, Hepatitis, Chorioretinitis, gastrointestinale Ulzerationen, Kolitis, selten Enzephalitis
SOT-Empfänger	Transplantationsvaskulitis, Fieber, Leukopenie, Enterokolitis, Ösophagitis, Gastritis
SCT-Empfänger	Interstitielle Cytomegalieviruspneumonie, Enterokolitis, Ösophagitis, Gastritis, weniger häufig Hepatitis und Retinitis

### 1.1.6 Immunreaktion und Immun-*Escape*-Mechanismen von CMV

Das angeborene Immunsystem spielt bei der Abwehr einer CMV-Infektion und auch beim Initiieren der adaptiven Immunantwort eine wichtige Rolle. CMV kann das angeborene Immunsystem über TLRs stimulieren, was eine Sekretion von inflammatorischen Zytokinen induziert, die wiederum Zellen des angeborenen Immunsystems rekrutieren und für eine erhöhte Expression der kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 sorgen (Crough und Khanna 2009). Insbesondere konnte gezeigt werden, dass gB und gH mit TLR2 interagieren und somit eine Produktion inflammatorischer Zytokine induzieren (Boehme et al. 2006; Compton et al. 2003). Auch NK-Zellen scheinen besonders wichtig zu sein, um eine CMV-Infektion zu bekämpfen, jedoch ist deren Rolle dabei noch nicht genau bekannt (Crough und Khanna 2009).

Das Hauptantigen der humoralen Immunantwort ist das Glycoprotein gB, wogegen 50% der neutralisierenden Antikörper gerichtet sind (Britt et al. 1990). Ein weiteres Antigen der humoralen Immunantwort ist das Glycoprotein gH (Rasmussen et al. 1991). Während des lytischen Infektionszyklus werden diese und andere Glycoproteine in die Zytoplasmamembran eingelagert, wo sie eine antikörpervermittelte zytotoxische Killerzellreaktion hervorrufen, die zur Lyse von infizierten Zellen führt (Modrow et al. 2010a).

Die CMV-Replikation wird hauptsächlich durch die T-Zell-vermittelte Immunantwort kontrolliert. Durchschnittlich 10% der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen des peripheren Blutes von gesunden CMV-seropositiven Individuen sind CMV-spezifisch, bei älteren Personen sind es sogar 40% (Crough et al. 2005; Gillespie et al. 2000; Khan et al. 2004; Sylwester et al. 2005). Die immundominantesten CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antigene sind IE1, IE2, pp150 und pp65 (Crough und Khanna 2009). Mit pp65 werden CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bereits kurz nach der Infektion durch Kreuzpräsentation stimuliert, da es ja bereits als Tegumentprotein vorliegt, in der späten Replikationsphase wird es jedoch nach der Neusynthese hauptsächlich auf dem klassischen Weg über MHC-I präsentiert. In der *immediate early*-Phase werden die neu synthetisierten IE1-Epitope und auf dem klassischen Weg über MHC-I präsentiert (Reddehase 2000). Die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen haben durchschnittlich eine Spezifität von 9,1% bei gesunden CMV-seropositiven Individuen. Mehr als 30% dieser CMV-spezifischen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sind spezifisch für gB. Insgesamt sind die T-Zell-Antworten gegen mehr als 70% der ORFs des CMV gerichtet (Crough und Khanna 2009). Doch trotz dieser differenzierten Immunantwort kann CMV nicht eliminiert werden, was hauptsächlich auf dessen Strategien zur Unterwanderung des Immunsystems zurückzuführen ist.

Ein Hauptmechanismus zur Umgehung des Immunsystems ist die Hemmung der MHC-I-restringierten Antigenpräsentation (Crough und Khanna 2009). So kann zum Beispiel pp65 durch seine Kinaseaktivität IE1 phosphorylieren, was die Prozessierung und Präsentation der IE1-Peptide inhibiert (Gilbert et al. 1996). Desweiteren blockieren US2, US3, US6, US10, US11 und pp71 die Generierung und/ oder den Export von MHC-I-Peptid-Komplexen. Die MHC-II-Expression wird ebenfalls durch US2 behindert sowie durch *IE*- und *E*-Gen-Produkte, welche die IFN $\gamma$ -induzierte Expression von MHC-II stören. Zur Vermeidung der Tötung infizierter Zellen mit reduzierter MHC-I-Expression durch NK-Zellen, werden CMV-kodierte MHC-I-Homologe exprimiert (Crough und Khanna 2009; Rolle und Olweus 2009). Weitere Mechanismen um das Immunsystem zu umgehen, sind die Expression eines viralen IL-10-Homologs, verschiedener Chemokin-Homologe und Chemokin-Rezeptor-Homologe zum Abfangen zellulärer Chemokine sowie die Expression viraler Genprodukte, welche den Zellzyklus regulieren oder die Apoptose inhibieren (Rolle und Olweus 2009).

Es gibt Hinweise, dass CMV DCs, die ja essentiell für das *Priming* und Aktivieren von naiven T-Zellen sind, gezielt behindert. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass aus Monozyten generierte reife DCs (mDCs) durch eine Infektion mit CMV die

kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 leicht hochregulieren, was jedoch mit einer Reduktion der MHC-I- und MHC-II-Expression einhergeht. Darüber hinaus wiesen diese DCs eine erhöhte Expression des Apoptose induzierenden Liganden CD95L (FasL) und des Tumor-Nekrose-Faktor verwandten Apoptose induzierenden Liganden (TRAIL) vor, womit diese gezielt aktivierte T-Zellen töten konnten (Raftery et al. 2001). Ein anderer CMV-Stamm sorgte dagegen für eine Reduktion der kostimulatorischen Moleküle bei aus Monozyten generierten unreife DCs (iDCs) und hemmte, die Ausschüttung von IL-12 und TNF $\alpha$  nach Stimulation mit LPS oder CD40L (Moutaftsi et al. 2002). Unsere Arbeitsgruppe wies wiederum nach, dass aus Monozyten generierte DCs, welche mit dem CMV-Stamm TB40/E infiziert wurden, vermehrt TNF $\alpha$  sekretierten und die IL-10-Produktion reduzierten wobei die Expression der MHC-I- und MHC-II-Moleküle sowie von CD40 und CD80 verringert wurde (U. Grigoleit et al. 2002). Zusätzlich wird auch die Expression verschiedener Zytokine und Leukine induziert, welche die Migration der DCs hemmen (Rolle und Olweus 2009). Doch trotz dieser massiven Beeinträchtigungen kann eine CMV-Infektion in immunkompetenten Individuen kontrolliert werden. Dies liegt u. a. daran, dass CD11c<sup>+</sup> DCs des peripheren Blutes eine CMV-Infektion sehr gut abwehren können, indem diese große Mengen von Typ-I-Interferonen ausschütten und den Reifungsmarker CD83 sowie MHC-I- und MHC-II-Moleküle hochregulieren (Rolle und Olweus 2009). Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass eher CD11c<sup>+</sup> DCs und plasmazytoide (p)DCs als aus Monozyten generierte DCs wichtig sind um eine CMV-Infektion zu kontrollieren, da bei SOT-Empfängern, die Immunsuppressiva erhalten, deutlich weniger CD11c<sup>+</sup> DCs und pDCs im Blut zu finden sind als bei gesunden Individuen (Rolle und Olweus 2009). Außerdem konnte auch nachgewiesen werden, dass CMV-Antigene von unfizierten DCs kreuzpräsentiert werden um die viralen Ausweichmechanismen von CMV zu umgehen (Arrode et al. 2000; Mandron et al. 2008).

### 1.1.7 Diagnose

Ein CMV-Infektion oder Reaktivierung kann auf unterschiedliche Weise in Urin, Speichel, Vaginalsekret, Amnionflüssigkeit, Liquor, Stuhl, BAL-Flüssigkeit, Kammerwasser, Blut und Biopsien direkt oder indirekt nachgewiesen werden (Landolfo et al. 2003).

Eine Virämie wird durch den „*shell vials*“-Assay bestimmt, bei dem man innerhalb von 24h ein Ergebnis hat (Gleaves et al. 1984; P. D. Griffiths et al. 1984). Dazu wird ein Fibroblasten-*Monolayer* mit  $2 \times 10^5$  peripheren Blut-Leukozyten (PBLs) inokuliert und nach 18h fixiert. Anschließend wird intranukleär IE1 angefärbt. Jeder positive Kern entspricht dann einem einzelnen PBL, der das CMV in sich getragen und einen Fibroblasten infiziert hat. 10-100 Infizierte Fibroblasten sprechen für ein hohes Risiko eine symptomatische CMV-Infektion zu entwickeln und sollte bei Transplantatempfängern durch eine antivirale Therapie vorsorglich (präemptiv) behandelt werden. Durch eine effektive antivirale Therapie sollte die Virämie innerhalb von 1 bis 2 Tagen deutlich zurückgehen, wenn diese jedoch weiterhin besteht oder sogar ansteigt spricht dies für eine Medikamentenresistenz (Landolfo et al. 2003).

Eine Antigenämie wird durch einen Immunfluoreszenzassay nachgewiesen. Dabei wird bei einem Zytospin von  $2 \times 10^5$  PBLs intranukleär pp65 angefärbt. Patienten mit einer symptomatischen CMV-Infektion weisen eine besonders hohe Menge an pp65 auf (Landolfo et al. 2003).

Indirekt kann eine CMV-Infektion durch einen EIA für CMV-spezifische IgG oder IgM bestimmt werden (Landolfo et al. 2003).

Mittlerweile hat sich aber der Nachweis von CMV-DNA in Blutproben, Biopsieproben oder BAL-Flüssigkeit durchgesetzt, da dies viel sensitiver als ein Proteinnachweis ist (Einsele et al. 1991). So erhält man sehr genaue Aussagen über die Viruslast und die Prognose für Transplantatempfänger oder AIDS-Patienten (Landolfo et al. 2003).

Durch eine reverse Transkriptions-PCR kann man die aktive Replikation von CMV überwachen. Hierbei wird die Transkription der *immediate early*- und der *late*-Gene in PBLs oder Vollblut untersucht. Sie kann für schwangere Frauen und kongenital infizierte Neugeborene sowie Transplantatempfängern angewendet werden (Landolfo et al. 2003).

Darüber hinaus gibt es auch Ansätze die CMV-Infektion ergänzend zum DNA-Nachweis bei SOT- und SCT-Empfängern durch Detektion CMV-spezifischer T-Zellen zu überwachen. Denn die Viruslast korreliert nicht immer mit der Ausbildung von

klinischen Symptomen, was zu einer unnötigen präemptiven Behandlung mit toxischen antiviralen Medikamenten führen kann (Crough und Khanna 2009). Dazu werden isolierte T-Zellen entweder spezifisch mit Tetrameren angefärbt, oder es wird die IFN $\gamma$ -Expression nach Restimulation mit CMV-Lysat, Einzelpeptiden oder Peptidmischen untersucht. Ein Abfall der spezifischen T-Zellen macht eine Reaktivierung von CMV wahrscheinlich (Crough und Khanna 2009).

### **1.1.8 Therapie und Prophylaxe**

Zur Behandlung und Prävention einer CMV-Infektion gibt es verschiedene Ansätze, die entweder mittels antiviraler Medikamente direkt mit der Replikation von CMV interferieren oder die humorale und zelluläre Immunabwehr stärken.

Um eine Übertragung auf das Kind im Mutterleib bei einer Neuinfektion mit CMV oder Reaktivierung zu senken, können CMV-spezifische Antikörper intravenös verabreicht werden. Die Gabe von Hyperimmunglobulin bei seronegativen SOT-Empfängern mit einem CMV-positiven Spenderorgan kann das Auftreten von CMV-Symptomen sowie die Gefahr einer Superinfektion mit Bakterien oder Pilzen und den Verlust des Organes verhindern. Wohingegen es für den Einsatz von Hyperimmunglobulin bei SCT-Empfängern widersprüchliche Ergebnisse gibt. Auch eine Impfung mit gB ist möglich, jedoch nehmen mit der Zeit die Antikörpertiter wieder ab (Crough und Khanna 2009).

Aktuell sind für die antivirale Therapie in immunsupprimierten Patienten folgende Medikamente zugelassen: Ganciclovir (GCV), Cidofovir (CDV) und das Pyrophosphat analog Foscarnet (PFA). GCV ist ein Nukelosid analog des Desoxyguanosins, das kompetitiv die virale DNA-Polymerase (UL54) hemmt. GCV wird intravenös verabreicht und durch eine Monophosphorylierung mittels UL97 und eine anschließende Diphosphorylierung durch zelluläre Kinasen aktiviert. PFA ist ein nichtkompetitiver Inhibitor der Pyrophosphatbindestelle der viralen DNA-Polymerase, der ebenfalls intravenös appliziert wird. CDV ist ein Nukleotid analog des Cytosins, das kompetitiv die virale DNA-Polymerase hemmt. Im Vergleich zu GCV und PFA hat CDV eine viel längere intrazelluläre Halbwertszeit. Bei allen drei Medikamenten kann es jedoch durch Mutationen im UL54-Gen zu Resistenzen kommen (Landolfo et al. 2003; Modrow et al. 2010b).

Die prophylaktische oder präemptive antivirale Therapie mit GCV, PFA oder CDV konnte in SCT-Empfängern den frühen Ausbruch einer CMV-Erkrankung während der

ersten 100 Tage nach SCT signifikant reduzieren, jedoch kommt es dadurch häufig zu einem späten Ausbruch der CMV-Erkrankung (Boeckh et al. 2003b; Hebart et al. 2002; Krause et al. 1997). Des Weiteren kann die antivirale Therapie schwerwiegende Nebenwirkungen wie Neutropenie (GCV), Myelotoxizität (GCV, CDV) und Nephrotoxizität (CDV, PFA) sowie eine beeinträchtigte Immunrekonstitution zur Folge haben (Crough und Khanna 2009).

Zur Kontrolle einer CMV-Infektion ist eine effektive T-Zell-vermittelte CMV-spezifische Immunität unabdingbar. Es gab bisher verschiedene Ansätze für den adoptiven Transfer von CMV-spezifischen T-Zellen um eine CMV-Reaktivierung und – Erkrankung nach SCT zu behandeln (Mui et al. 2010). Die Verwendung von CMV-spezifischen T-Zellen hat verschiedene potentielle Vorteile wie eine frühere Immunrekonstitution, die Vermeidung von Medikamenten induzierten Nebenwirkungen und eine Kostenersparnis im Vergleich zur Langzeitbehandlung mit antiviralen Medikamenten (Bao et al. 2008). Der größte Nachteil dieser zellulären Immuntherapie ist jedoch die Aufrechterhaltung der spezifischen T-Zellen *in vivo*, da die *ex vivo* Generierung von spezifischen T-Zellen meistens in einen Effektorphänotyp resultiert, der mit dem Verlust der Telomerlänge und des proliferativen Potentials einhergeht, gefolgt von anschließender Apoptose (Gattinoni et al. 2006). Deshalb wäre eine direkte Impfung von SCT-Empfängern oder – Spendern vorteilhafter, um persistierende CMV-spezifische T-Zellen zu generieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Impfung mit DCs, welche mit pp65-Peptiden beladen wurden, erfolgreich für die Behandlung von seropositiven SCT-Empfängern eingesetzt werden konnten (G. U. Grigoleit et al. 2007). Im letzten Jahrzehnt wurden außerdem eine Reihe weiterer CMV-Impfstrategien entwickelt, die für immunsupprimierte Patienten angewendet werden können, wie DNA-Vakzine, replikationsdefiziente rekombinante Adenoviren und rekombinantes Modifiziertes Vaccinia Ankara virus (MVA), welche die immundominanten CMV-Antigene gB, pp65 und/oder IE1 exprimieren (Sung und Schleiss 2010). Innerhalb dieser verschiedenen Ansätze ist MVA der am besten analysierte und sicherste Impfvektor. Diamond und Kollegen haben erfolgreich mehrere MVA-CMV-Vakzinkandidaten konstruiert, die stabil pp65 und/oder IE1, eingefügt in Deletion II, Deletion III oder in die intergenische Region 3, exprimieren und CMV-spezifische T-Zellen in HLA-A0201-transgenen Mäusen oder von PBMCs *in vitro* expandieren konnten, jedoch sind diese nicht frei von Selektionsmarkern (Manuel et al. 2010; Z. Wang et al. 2010).

## 1.2 Das modifizierte Vaccinia Ankara Virus (MVA)

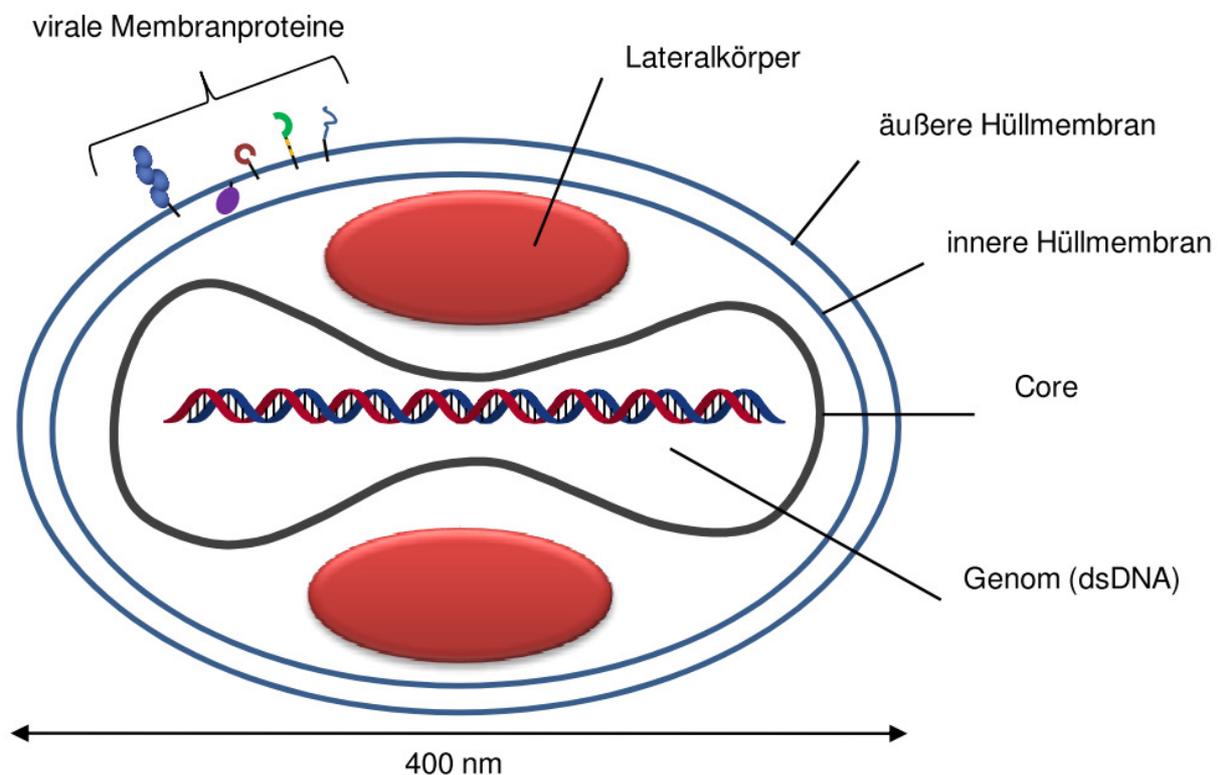
### 1.2.1 Abstammung von MVA

Das modifizierte Vaccinia Ankara virus (MVA), ein hoch attenuierter Vacciniavirusstamm, entstand durch 572 serielle Passagen des Chorioallantois Vaccinia Ankara Virus (CVA) in Hühnerembryofibroblasten (HEFs) (Mayr et al. 1975). CVA wurde in Deutschland bis 1980 als Impfstoff gegen die natürlich nur in Menschen vorkommenden Pockenviren Variola, welche eine Letalität von 40% hatten, und Alastrim, welche eine Letalität von 2% hatten (Modrow et al. 2010a), verwendet (Mayr et al. 1975). CVA wurde in der Türkei in der Impfanstalt Ankara über viele Jahre in Esel-Kalb-Esel-Passagen vermehrt und dort als Grundlage für den Menschenpocken-Impfstoff genutzt. Als Ausgangsmaterial verwendete man die Pustelernten der jeweiligen Eselpassagen. 1953 ist CVA durch fraktionierte Ultrazentrifugation gereinigt und zweimal über das Rind durch kutane Flächenimpfung passiert worden. Seit 1954/55 wurde dann CVA in der Bundesrepublik als Pockenschutzimpfstoff eingesetzt (Mayr et al. 1975).

Die Vacciniaviren gehören zur Familie der *Poxviridae*, welche in zwei Unterfamilien eingeteilt wird: die *Chordopoxvirinae* und die *Entomopoxvirinae*. Innerhalb der 8 Genera der *Chordopoxvirinae* gehören die Vacciniaviren, 8 Tierpocken-Spezies (Kuhpocken-, Büffelpocken-, Kaninchenpocken-, Pferdepocken-, Elefantenpocken-, Mäusepocken-, Affenpocken- und Kamelpockenvirus) sowie die heute ausgerotteten Variola- und Alstrimviren zum Genus der Orthopoxviren (Mayr et al. 1975; Modrow et al. 2010a). Einige der Tierpocken-Spezies können in ihren Wirten systemische Erkrankungen mit hoher Morbidität und sogar Mortalität hervorrufen und besitzen zusätzlich auch ein zoonotisches Potential (Modrow et al. 2010a).

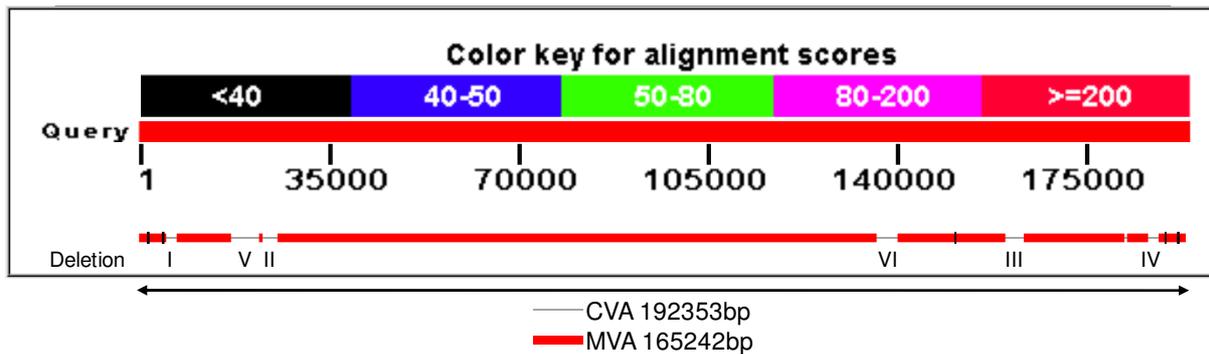
Die Pockenviren gehören zu den größten bekannten Viren und haben eine ziegelsteinähnliche Form mit leicht abgerundeten Ecken. Sie besitzen wie das Cytomegalievirus ein dsDNA Genom, dieses befindet sich in einem hantelförmigen Core, zwei Lateralkörper und abhängig vom Reifestatus ein oder zwei Lipidhüllen [Abbildung 4] (Cyrklaff et al. 2005; Modrow et al. 2010a). Die Orthopoxviren sind morphologisch nicht unterscheidbar und können gegenseitig Kreuzimmunitäten erzeugen (Mayr et al. 1975). Die Vacciniaviren haben eine Größe von 360 x 270 x 250nm (Cyrklaff et al. 2005). Bei replikationskompetenten Vacciniaviren kommen in der Zelle Virionen vor, die als intrazellulär matures Virus (IMV) oder matures Virus

(MV) bezeichnet werden. Sie besitzen nur eine Lipiddoppelschicht und werden durch die Lyse der Wirtszelle freigesetzt und sind für die meisten Infektionen zuständig. Einige Virionen haben jedoch noch zwei weitere Lipidhüllen und werden als intrazellulär eingehülltes Virus (IEV) bezeichnet. Die IEV-Partikel bewegen sich entlang von Mikrotubuli zur Zellmembran, wo die äußere der 3 Hüllen mit dieser fusioniert und das zellassoziiert umhüllte Virus (CEV) durch wachsende Aktinfilamente weiter nach außen transportiert wird. Die CEV-Partikel dienen der Infektion von Zelle zu Zelle. Die extrazellulär umhüllten Viren (EEVs) sind identisch mit den CEVs jedoch ohne Kontakt zur Zelloberfläche und vermitteln die Ausbreitung innerhalb des Wirtes und von Wirt zu Wirt (Modrow et al. 2010a).



**Abbildung 4: Aufbau des Vaccinia Virus (nach Modrow et al. 2010a und Smith et al. 2002)**

MVA hat gegenüber seinem Ursprungstamm CVA die Fähigkeit verloren die meisten Säugetierzellen produktiv zu infizieren mit der Ausnahme von der Baby-Hamster-Nierenzelllinie BKH21 und der Affenzelllinie MA104 (Carroll und Moss 1997; Drexler et al. 1998; H. Meyer et al. 1991). Dies ist auf den Verlust verschiedener Gene durch 6 Hauptdeletionen sowie weitere Deletionen von insgesamt 31 kbp zurückzuführen [Abbildung 5] (Altenburger et al. 1989; Antoine et al. 1998; H. Meyer et al. 1991).



**Abbildung 5: DNA-Sequenzvergleich von CVA und MVA.**

Die Nukleotidsequenz von MVA (GenBank: DQ983237.1) wurde mit dessen Ursprungsvirus CVA (GenBank: AM501482.1) durch Blastn MegaBlast (BLASTN 2.2.25+) verglichen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides> (Zhang et al. 2000)). Es sind die 6 Hauptdeletionen von MVA angegeben (große Lücken in der roten Linie).

Während der 1970er Jahre wurde MVA erfolgreich in intensiven Feldstudien als Pockenimpfstoff an über 120.000 Impfungen in Bayern getestet, einschließlich Hochrisikopatienten (z. B. mit atopischer Dermatitis, Ekzemen oder Immunsuppression), welche keine der gefürchteten Nebenwirkungen (generalisierter Hautausschlag, progressive Vacciniavirus-Infektion oder postvakzinale Encephalitis) zeigten (Mayr et al. 1975; Mayr et al. 1978; Mayr und Danner 1978; Stickl et al. 1974). Trotz der Replikationsdefizienz von MVA in humanen oder anderen Säugetierzellen auf Grund eines Stopps auf der Stufe des Virionzusammenbaus erlaubt dieses Virus die volle Expression von frühen genauso wie späten viralen oder rekombinanten Genen (Sutter und Moss 1992).

### **1.2.2 MVA als Impfvektor**

Durch die extrem eingeschränkte Replikationsfähigkeit ist MVA einer der vielversprechendsten Impfvektoren geworden. Die Sicherheit und Immunogenität als Impfvektor wurde bereits in vielen Impfstudien bestätigt: u.a. für HIV (Greenough et al. 2008; Peters et al. 2007), Nierenzellkarzinom (Kaufman et al. 2009), Prostatakarzinom (Dreicer et al. 2005), Kolonkarzinom (Harrop et al. 2008), kleinzelliges Bronchialkarzinom (Ramlau et al. 2008), Melanom (R. G. Meyer et al. 2005), Tuberkulose (Hawkrigde et al. 2008) und Pocken (Frey et al. 2007; Parrino et al. 2007) sowie Affenpocken in nicht-humanen Primaten (Earl et al. 2004). Sogar immunsupprimierte Patienten mit AIDS (Cosma et al. 2007) oder immunsupprimierte nicht-humane Primaten (Stittelaar et al. 2001) waren frei von Nebenwirkungen nach einer Impfung mit MVA. Darüber hinaus, konnte rekombinantes MVA durch eine DNA-Primärimpfung hervorgerufenen HIV-spezifische Immunantworten unabhängig von einer bereits existierenden Pockenimpfung effektiv erhöhen (Gudmundsdotter et al. 2009).

### **1.3 Fragestellung**

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst die Infektionsrate von PBMCs und DCs mittels MVA-wt und MVA-GFP ermittelt werden, um anschließend Veränderungen in der Expression der Oberflächenmarker und der Zytokinexpression sowie die Apoptoserate zu untersuchen. Diese Ergebnisse sollten dann für die Induktion von CMV-spezifischen T-Zell-Antworten durch die CMV-Vakzinkandidaten MVA-IE1, MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1 herangezogen werden.

Insbesondere sollte die Fähigkeit infizierter DCs zur Induktion pp65- und/oder IE1-spezifischen CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>-T-Zellantworten durch Koinkubation mit verschiedenen autologen Zellpopulationen (PBMCs, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, CD4<sup>+</sup>-T-Zellen) über verschiedene Zeiträume untersucht werden. Zur Analyse der Antigenpezifität der induzierten T-Zell-(Sub)-Populationen sollten etablierte Verfahren wie beispielsweise die Immunphänotypisierung mittels Peptid-beladenen MHC-Multimer-Komplexen und die intrazelluläre Zytokinmessung in der Durchflusszytometrie herangezogen werden. Die spezifischen T-Zellen sollten mittels weiterer Oberflächenphänotypisierung subklassifiziert werden. Dies ist von besonderer Bedeutung, da gezeigt werden konnte, dass ein Großteil der bisher eingesetzten Zellkultursysteme vor allem terminal differenzierte Effektor-T-Zellen induzieren, die zwar zur Antigenerkennung, sowie -elimination in der Lage sind, jedoch keine persistierende Immunantwort vermitteln.

Es sollte außerdem auch untersucht werden inwieweit die MVA-CMV-Vakzinkandidaten Vaccinia-spezifische T-Zellantworten induzieren, um einschätzen zu können wie sich die Vakzinkandidaten auf Impflinge auswirken, die bereits früher eine Impfung gegen Pocken erhalten haben. Abschließend sollte beurteilt werden, inwieweit sich die MVA-CMV-Vakzinkandidaten für einen Einsatz bei Immunsupprimierten und SCT-Empfängern bzw. bei SCT-Spendern für einen Transfer CMV-spezifischer T-Zellen eignen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

CO <sub>2</sub> -Inkubator BBD6220 (auf 37 °C und 5% CO <sub>2</sub> eingestellt)	Heraeus, Hanau
Cytospin 2	Shandon Instruments, Sweickley, Pennsylvania, USA
Durchflusszytometer FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg
Durchlichtmikroskop Leica DM 1000	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Durchlichtmikroskop Leica DM IL	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Großraum-Gefrierbehälter K-Series Cryostorage System und Vorratsbehälter für Flüssigstickstoff XL-240 PB	Tec-Lab/Taylor-Wharton, Idstein
Kühl-Gefrierschrank-Kombination (4 °C, -20 °C)	Liebherr, Biberach an der Riss
Laser Scanning Spectral Confocal Microscope Leica TCS SP2	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Photometer Nanodrop ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pipetten Reference (100 µl, 1000 µl) und Research (10 µl)	Eppendorf, Wessling-Berzdorf
Pipettierhilfe Accu-Jet®	Brand, Wertheim
QuadroMACS™ Separator	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Quantitatives Real-Time-PCR-System LightCycler® 1.5	Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Sciences, Mannheim
Sterilbank Hera safe KS 12	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Thermal Cycler 9800 Fast	Applied Biosystems
Tiefkühlschrank Forma 906 -86C ULT Freezer	Thermo Scientific, Mukarov, Tschechische Republik
Tischzentrifuge Mikro 200R	Hettich-Zentrifugen, Adelsried
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Rotanta 46 RC	Hettich-Zentrifugen, Adelsried

12-Kanal-Pipette Research (300 µl)

Eppendorf, Wessling-Berzdorf

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

24-Well Zellkulturplatten Cellstar®

Greiner Bio-one, Frickenhausen

96-Well und 6-Well Zellkulturplatten Falcon®

Becton Dickinson Labware, Franklin Lanes, NJ, USA

Adhäsionsobjektträger Thermo Scientific SuperFrost Plus

Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co KG, Braunschweig

Deckgläser

Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co KG, Braunschweig

Filterpipettenspitzen Biosphere® (10 µl, 100 µl, 1000 µl)

Sarstedt, Nümbrecht

LightCycler® Capparials (20 µl)

Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Sciences, Mannheim

Magnetsäulen MACS Separation Columns, LS Columns

Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach

Polystyrol-Rundbodenröhrchen Falcon® (5 ml)

Becton Dickinson Labware, Franklin Lanes, NJ, USA

PP-Cryoröhrchen Cryo.S™

Greiner Bio-one, Frickenhausen

PP-Röhrchen Cellstar® (15 ml, 50 ml)

Greiner Bio-one, Frickenhausen

Reaktionsgefäße (1,5 ml)

Eppendorf, Wessling-Berzdorf

Serologische Pipetten Costar® Stripette® (5 ml, 10 ml, 25 ml)

Corning Incorporated, Corning, NY, USA

Unsterile, puderfreie, medizinische Untersuchungshandschuhe aus Latex Flexam®

Cardinal Health, McGaw Park, IL, USA

Zählkammer Neubauer Improved

HBG HENNEBERG-SANDER GMBH, Giessen-Lützellinden

Micro Amp™ Fast Reaction Tubes (8 Tubes/Strip)

Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt

Micro Amp™ 8-Cap Strip

Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt

### 2.1.3 Chemikalien, Biochemikalien, Medien und Supplemente

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
Aqua ad injectabilia	B. Braun, Melsungen
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG, Berlin
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
Dulbecco's PBS, ohne Ca und Mg	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) 0,5 M AccuGene®	Lonza, Rockland, ME, USA
Fluoroshield with DAPI (Eindeckmedium)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
Formalinlösung, 10% neutral gepuffert (4% Formalin)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
Hank's BSS (1x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Methanol	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Permeabilizing Solution 2	BD Biosciences, Heidelberg
Trypanblau	Gibco™ (Invitrogen), Karlsruhe
Gentamycin	Gibco™ (Invitrogen), Karlsruhe
RPMI 1640 + GlutaMAX™-I + 25 mM HEPES	Gibco™ (Invitrogen), Karlsruhe
FCS	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
Human TNFα, premium grade	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Human IL-4, premium grade	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
GM-CSF Leukine	Bayer Health Care Pharmaceuticals, Seattle, WA, USA
Brefeldin A	Molecular Probes, Invitrogen GmbH, Darmstadt

## 2.1.4 Puffer, Lösungen und Zellkulturmedium

FACS-Fixier-Puffer:	Dulbecco's PBS, ohne Ca und Mg 50% Formalinlösung → entspricht 2% Formaldehyd
FACS-Wasch-Puffer:	Dulbecco's PBS, ohne Ca und Mg 1% FCS
MACS-Puffer:	Hank's BSS (1x) 1% FCS 2 mM EDTA
Permeabilisierung-Puffer:	Aqua ad injectabilia 10% Permeabilizing Solution 2
RPMI-Medium:	RPMI 1640 + GlutaMAX™-I + 25 mM HEPES 10% FCS 500µl Gentamycin

## 2.1.5 Antikörper

Tabelle 3: Antikörper

Antigen	Konjugat	Isotyp	Herkunft	Klon	Hersteller	Verdünnung
IgG Gamunex <sup>®</sup> 10%				polyklonal	Talecris Biotherapeutics, Frankfurt am Main Niederrad	1:2
IgG Octagam <sup>®</sup> 5%				polyklonal	Octapharma, Langenfeld	1:1
	FITC	IgG1k	Maus	MOPC-21	Becton Dickinson, Heidelberg	1:40
	PE	IgG1k	Maus	X40	Becton Dickinson, Heidelberg	1:40
	PerCP	IgG1k	Maus	X40	Becton Dickinson, Heidelberg	1:40
	APC	IgG1k	Maus	X40	Becton Dickinson, Heidelberg	1:40
	PerCP	IgG2bk	Maus	27-35	Becton Dickinson, Heidelberg	1:40
	PerCP	IgG2ak	Maus	X39	Becton Dickinson, Heidelberg	1:40
	APC	IgG2A	Maus	20102	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt	1:10
	PE/Cy7	IgG1k	Maus	P3	Natutec (eBioscience), Frankfurt am Main	1:40
humanes CCR7	APC	IgG2A	Maus	150503	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt	1:10
humanes CD14	PE/Cy7	IgG1k	Maus	HCD14	Biozol (Biolegend), Eching	1:40
humanes CD14	APC	IgG1k	Maus	HCD14	Biozol (Biolegend), Eching	1:40
humanes CD19	PE	IgG1k	Maus	SJ25C1	Becton Dickinson, Heidelberg	1:40
humanes CD19	APC	IgG1k	Maus	SJ25C1	Becton Dickinson, Heidelberg	1:40
humanes CD1a	APC	IgG1k	Maus	HI149	Becton Dickinson, Heidelberg	1:40
humanes CD1d	APC	IgG1k	Maus	CD1dd42	Becton Dickinson, Heidelberg	1:40

humanes CD25	PE/Cy7	IgG1k	Maus	BC96	Natutec (eBioscience), Frankfurt am Main	1:40
humanes CD3	FITC	IgG1k	Maus	SK7	Becton Dickinson, Heidelberg	1:80
humanes CD3	PerCP	IgG1k	Maus	SK7	Becton Dickinson, Heidelberg	1:40
humanes CD4	PE	IgG1k	Maus	SK3	Becton Dickinson, Heidelberg	1:40
humanes CD4	PerCP	IgG1k	Maus	SK3	Becton Dickinson, Heidelberg	1:10
humanes CD4	APC	IgG1k	Maus	SK3	Becton Dickinson, Heidelberg	1:133
humanes CD40	APC	IgG1k	Maus	5C3	Becton Dickinson, Heidelberg	1:40
humanes CD45RA	FITC	IgG1k	Maus	L48	Becton Dickinson, Heidelberg	1:20
humanes CD56	PE	IgG1k	Maus	MY31	Becton Dickinson, Heidelberg	1:40
humanes CD69	APC	IgG1k	Maus	FN50	Becton Dickinson, Heidelberg	1:40
humanes CD8	PerCP	IgG1k	Maus	SK1	Becton Dickinson, Heidelberg	1:10
humanes CD8	APC	IgG1k	Maus	SK1	Becton Dickinson, Heidelberg	1:40
humanes CD80	PE	IgG1k	Maus	L307.4	Becton Dickinson, Heidelberg	1:40
humanes CD83	APC	IgG1k	Maus	HB15e	Becton Dickinson, Heidelberg	1:40
humanes CD86	PE	IgG1k	Maus	2331(FUN-1)	Becton Dickinson, Heidelberg	1:40
humanes Cytomegalovirus IE1		IgG1k	Maus	E13	Argene, Varilhes, Frankreich	1:500
humanes Cytomegalovirus pp65		IgG1	Maus	1C3	Argene, Varilhes, Frankreich	1:500
humanes HLA- ABC	PE	IgG1k	Maus	G46-2.6	Becton Dickinson, Heidelberg	1:40

humanes HLA-DR	PerCP	IgG2ak	Maus	L243 (G46-6)	Becton Dickinson, Heidelberg	1:40
humanes IFN $\gamma$	PE	IgG1	Maus	45.15	Beckman Coulter, Krefeld	1:40
humanes IL-12 p35 + p70	FITC	IgG1	Maus	B-T21	Hölzel Diagnostika GmbH (Gen-Probe), Köln	1:40
humanes TNF $\alpha$	PE/Cy7	IgG1k	Maus	MAb11	Natutec (eBioscience), Frankfurt am Main	1:40
Kaninchen IgG (H+L)	APC	(F(ab') <sub>2</sub> )	Ziege		Dianova (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.), Hamburg	1:100
Maus IgG+IgM	FITC		Ziege		Argene, Varilhes, Frankreich	1:100
Maus IgG+IgM	FITC	(F(ab') <sub>2</sub> )	Ziege		Argene, Varilhes, Frankreich	1:100
Vaccinia Virus (Lister Strain)			Kaninchen	polyklonal	Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen	1:1000

APC: Allophycocyanin

FITC: Fluoreszeinisothiocyanat

PE: Phycoerythrin

PerCP: Peridinin-Chlorophyll

## 2.1.6 Primer und Sonden

Die Primer und Sonden zur Analyse der Zytokin-mRNA-Expression wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) hergestellt und von der Arbeitsgruppe von PD Dr. rer. nat. Jürgen Löffler zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 4: Primer und Sonden zur Analyse der Zytokin-mRNA-Expression**

Gen	Primer		Sonden	
	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	3'-FL	5'-LC640 3'-PH
<i>hALAS</i>	aatgagtcgccaccacag	cagctcccgtctaagtcga	cctgcccagcaccatgtgtttc	gtgtccataactgccccacacacc
<i>CXCL8</i>	tcttggcagccttctgatt	tccagacagagctcttccatc	gacatcfaagttcttagcactcctggca	aactgcaccttcacacagagctgc
<i>CXCL10</i>	acgtgttgagatcattgctacaa	gattttgctcccctctggt	aglaaattcttgatggccttcgattct	galtcagacatctctcaccctctttt
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	cagggacaggataggagcaa	gcagactcaaattccagctgtta	gcttatcatcttcaacacgcaggaca	gtacagattctttcctgaggccca
<i>IL-6</i>	ctttggagttgaggatatactag	cgcagaatgagatgagtgtc	tagatgcaataaccaccctgacca	ccacaaaaggcagcctgctgac
<i>IL-10</i>	tgctggaggacttaagggttac	gtagatgccttctctggagc	cggcgctgtcatcgattcttccct	tgaaaaaagagcaaggccggtggagc
<i>IL-12p35</i>	gagagacctcttcataactaatggg	tcaaggaggagttttgtgg	aggcagatcttctagatcaaaacatgctg	cagttattgatgagctgatgcaggccc
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	acaagcctgtagcccatgtt	aagaggacctgggagtagatga	gcattggcccggcggttc	ccactggagctgcccctcagct

3'-FL: Sonde ist am 3'-Ende mit Fluorescein markiert

5'-LC640: Sonde ist am 5'-Ende mit LightCycler<sup>®</sup> Red 640 (LC640) markiert

3'-PH: 3'-Hydroxylgruppe ist mit einer Phosphatgruppe gegen die nicht erwünschte Extension durch die Polymerase blockiert

### 2.1.7 Peptidemixe und MHC-I-Tetramere

MVA 018L Pepmix™ (35 15-mere mit 11 Aminosäuren Überlappung des Vaccinia Virus Host-Range-Proteins 2)	JPT, Berlin
PepTivator®-CMV pp65 (15-mere mit 11 Aminosäuren Überlappung des Phospho-Proteins 65 des humanen Cytomeglievirus-Stammes AD169)	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
PepTivator®-CMV IE-1 (15-mere mit 11 Aminosäuren Überlappung des Immediate-Early-Protein 1 des humanen Cytomeglievirus-Stammes AD169)	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
HLA-A*0201 CMV pp65 (NLVPMVATV) Tetramer PE	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
HLA-A*0201 CMV pp65 (NLVPMVATV) Tetramer APCS	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
HLA-B*0702 CMV pp65 (TPRVTGGGAM) Tetramer PE	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

### 2.1.8 Kits

PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Mini Kit	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
Cell Lab ApoScreen™ Annexin V-FITC Apoptosis Kit	Beckman Coulter, Krefeld
RNeasy® mini Kit (50)	Qiagen, Hilden
QIAshredder™ (50)	Qiagen, Hilden
QuantiTect® Reverse Transkription Kit	Qiagen, Hilden
QuantiFast™ Probe PCR + ROX Vial Kit	Qiagen, Hilden

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Gewinnung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)**

Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) wurden mittels Ficoll-Paque-Dichtegradientenzentrifugation aus Zellen gewonnen, die in der Leukozyten-Reduktionssystem-Kammer (LRSC) während der Thrombozytenspende von regulären Blutspendern, die ihre informierte Zustimmung gegeben haben, anfallen (Dietz et al. 2006; Neron et al. 2007; Strasser et al. 2007). Dazu wurden die LRSC-Zellen in ein 50ml Röhrchen überführt und mit PBS auf 50ml aufgefüllt. Anschließend wurden je 25ml auf 15ml Biocoll Separating Solution überschichtet und 20 min mit 2000 rpm bei 22°C ohne Bremse zentrifugiert. Danach wurden die Zellen für 10 min mit 1500 rpm bei 22°C gewaschen. Die so gewonnenen PBMCs wurden mit einer Neubauer Zählkammer gezählt, dabei wurde eine Ausbeute von  $0,5 \times 10^9$  bis  $1,2 \times 10^9$  PBMCs erzielt. Im Anschluss wurden die Zellen entweder eingefroren oder sofort für weitere Versuche verwendet.

### **2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zum Einfrieren wurden maximal  $1 \times 10^8$  Zellen in ein Kryoröhrchen in 2ml RPMI-Medium mit 50% FCS und 10% DMSO aufgenommen, sofort auf Eis gestellt und unmittelbar bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen in ein 37°C warmes Wasserbad gehalten bis der Randbereich des Einfriermedium/Zell-Gemisches aufgetaut war und dieses noch gefrorene Einfriermedium/Zell-Gemisch in ein 50ml Röhrchen mit 20ml RPMI-Medium überführt werden konnte. Die Zellen wurden 2x mit RPMI-Medium 10 min bei 1500 rpm gewaschen und anschließend mit einer Neubauer Zählkammer gezählt.

### 2.2.3 Generierung von Dendritischen Zellen

Zur Isolation von Monozyten wurden frische PBMCs mit CD14 MicroBeads inkubiert und mit dem QuadroMACS™ System nach Angaben des Herstellers Miltenyi isoliert. Anschließend wurden die so gewonnenen Monozyten in 6-Well-Platten mit  $3 \times 10^6$ /3ml/Well in RPMI-Medium sowie 100ng/ml Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulationsfaktor (GM-SCF) und 100IU/ml humanes rekombinantes Interleukin 4 (rhIL-4) inkubiert. Zur Ausreifung der Dendritischen Zellen (DCs) wurden am Tag 4 bis 5 der DC-Differenzierung 10ng/ml Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) hinzugegeben. Jeden zweiten Tag wurde ein Drittel des RPMI-Mediums durch frisches RPMI-Medium mit frischen Zytokinen ausgetauscht. Die unreifen (iDCs) oder reifen DC (mDCs) wurden an Tag 9 bis 10 geerntet. Der Expression der Oberflächenmarker für iDCs (CD1a<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD40<sup>-</sup>, CD80<sup>low</sup>, CD83<sup>-</sup>, CD86<sup>low</sup>) und der mDCs (CD1a<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD40<sup>+</sup>, CD80<sup>+</sup>, CD83<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup>) wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe 2.2.10).

### 2.2.4 Selektion der Leukozyten

Für die Selektion von T-Helferzellen, zytotoxischen T-Zellen, B-Zellen und Monozyten wurden frische PBMCs mit CD4, CD8, CD20 oder CD14 MicroBeads inkubiert und mit dem QuadroMACS™ System nach Angaben des Herstellers Miltenyi isoliert. Nach der Isolation wurden die Zellen entweder sofort verwendet oder eingefroren.

### 2.2.5 Modifizierte Vaccinia Ankara Viren

Alle nachfolgenden Viren wurden von Dr. vet. med. Yasemin Süzer aus der Abteilung Virologie am Paul-Ehrlich-Institut in Langen generiert und/oder vermehrt. Es wurden folgende Viren verwendet: Das von MVA-F6 (H. Meyer et al. 1991) abgeleitete MVAIInew (MVA-wt) (Staib et al. 2003), MVA-P7.5-Green Fluorescent Protein (MVA-GFP) (Staib et al. 2000) sowie die rekombinanten MVA-Viren MVA-IE1, MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1, die von Yasemin Süzer neu geniert wurden.

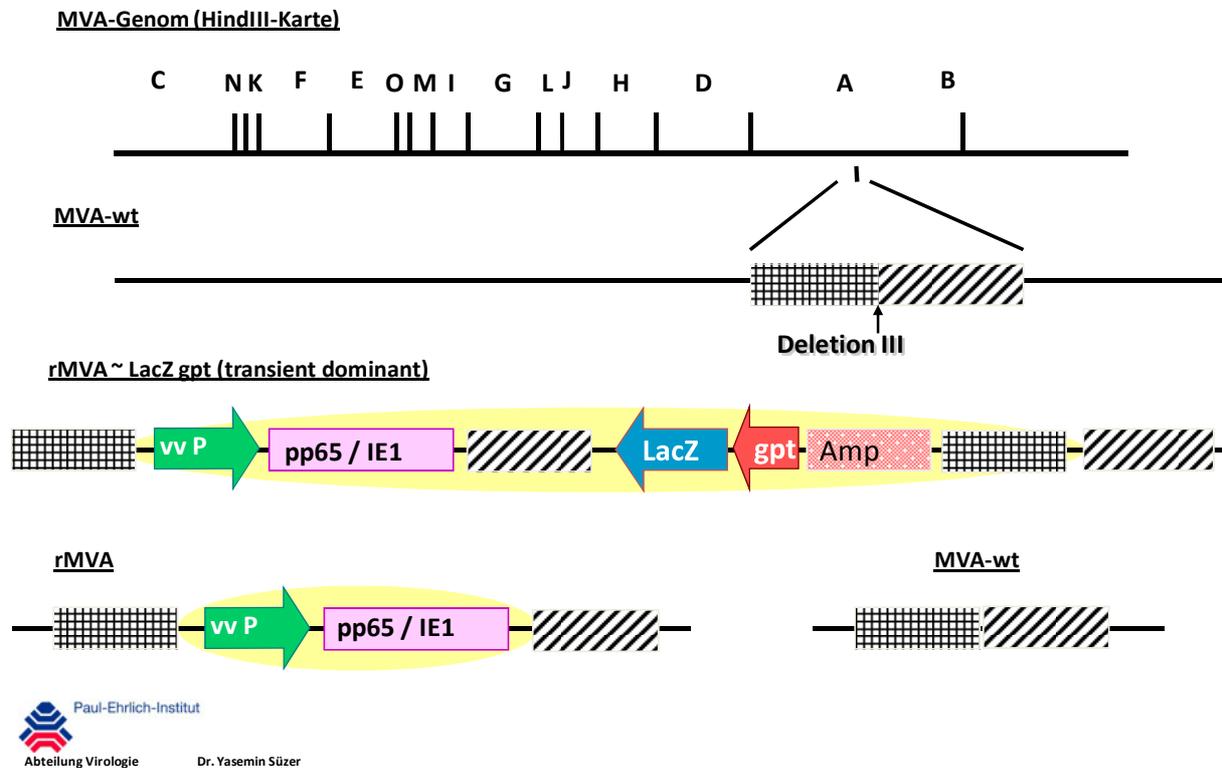
Zur Generierung der MVA-CMV Viren wurden die offenen Leserahmen (ORFs) von pp65 und IE1 des Humanen Herpesvirus 5 (HHV5) des Stammes AD169 (GeneBank: BK000394) von der Firma GENEART (Regensburg, Germany) mit Sequenzoptimierungen für die Expression in Vaccinia Viren synthetisiert. Die Synthese des IE1 ORF beinhaltete außerdem den Vaccinia Virus Western Reserve E3L Promotor (GeneBank : NC 006998). Der pp65 ORF wurde von HincII und KpnI (für

MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1) und der IE1 ORF von PstI und KpnI (für MVA-IE1) bzw. SmaI und KpnI (für MVA-pp65-IE1) Restriktionsschnittstellen flankiert und jeweils in das Vektorplasmid pLW-9 (Wyatt et al. 1996) kloniert. Die entstanden Plasmide wurden pIII-PmH5-pp65, pIII-PE3L-IE1 und pIII-PmH5-pp65-PE3L-IE1 genannt. Der Selektionsmarker gbt-LacZ wurde vom Vektorplasmid pIInewLacZgptdel (Staib et al. 2003) mit den Oligonukleotiden 5'-GCCAATTGTTATTTTTGACACCAGACCA-3' und 5'-GCCAATTGTTAGCGACCGGAGATTGGCG-3' (Restriktionsschnittstelle MfeI) amplifiziert und in die EcoRI-Seiten der zuvor genannten Plasmide kloniert, wodurch die Plasmide pIII-PmH5-pp65-gpt-LacZ, pIII-PE3L-IE1-gpt-LacZ und pIII-PmH5-pp65-PE3L-IE1-gpt-LacZ entstanden.

Die Generierung der rekombinanten Viren erfolgte nach der von Schleifinger und Kollegen 1998 beschriebenen Methode der transient-dominanten LacZ-gpt-Selektion [Abbildung 6] (Falkner und Moss 1990; Scheiflinger et al. 1998). Der Vorteil dieser Methode ist, dass in den hierbei resultierenden Viren keinerlei Selektionsmarker oder auch Reste von homologen Sequenzen zur Entfernung des Selektionsmarkers verbleiben und ausnahmslos Hühnerembryofibroblasten (HEF) aus spf-(spezifisch-pathogen-freien) Hühnereiern verwendet werden. Kurz dargestellt wurden hierzu HEF mit MVA-Wildtypvirus infiziert und mit dem das Fremdgen enthaltenden Vektorplasmid transifiziert. Durch die Zugabe von Mycophenolsäure, Xanthin und Hypoxanthin (Sigma Aldrich, Deutschland) in den nächsten zwei Passagen erfolgte die Selektion auf rekombinante Viren. In den darauffolgenden Passagen, ohne selektiven Druck, wurde nach Sichtbarwerden von viralen Plaques ein Agarose-Overlay mit LMP-Agarose (*Low melting point*) unter Zugabe des Substrats der  $\beta$ -Galaktosidase, X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid), durchgeführt. Blau gefärbte Plaques exprimierten transient das X-Gal-Gen und wurden weiterpassagiert. Weiße Plaques konnten bereits das rekombinante Gen tragen und wurden in einem geringem Volumen Medium aufgenommen. Teile dieser klonalen Isolate wurden zur Isolierung viraler DNA, nach der von Roper beschriebenen Methode, benutzt (Roper 2004). Daraufhin erfolgte eine PCR-Analyse der viralen Genome mit DeletionIII-spezifischen Primern. Positive klonale Isolate zeigten in der DeletionIII-spezifischen Analyse der PCR auf dem Agarose-Gel eine größere Bande als Wildtyp-Viren.

Nach Isolation positiver klonaler Isolate, d.h. von Viren, welche das Fremdgen in der Insertionsstelle bzw. hier der Deletion III enthielten erfolgte eine schrittweise Amplifikation in 5 bis 7 Stufen bis zur Vermehrung eines Primärstocks, der dann zur

Charakterisierung verwendet wurde, sowie als Grundlage zur Amplifikation von aufgereinigten Viruspräparationen. Dieser Primärstock der rekombinanten Viren diente der eingehenden Charakterisierung des rekombinanten Virus, welches die Analyse des Virus-Genoms, der Protein-Expression, sowie die Wachstumsuntersuchung umfasste.



**Abbildung 6: Transient-dominante LacZ-gpt-Selektion (nach Yasemin Süzer, Paul-Ehrlich-Institut)**

Die Überprüfung durch Dr. Yasemin Süzer ergab, dass die rekombinanten Viren genetisch rein sind und das Wachstum der beiden rekombinanten Viren mit dem Wildtyp-MVA vergleichbar ist.

Zur Generierung von Vakzin-Präparationen wurden MVA-IE1, MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1 stufenweise in HEF amplifiziert und mittels eines Sucrose-Gradienten und Ultrazentrifugation aufgereinigt und in PBS aufgenommen.

## **2.2.6 Untersuchung der Stabilität von MVA-IE1, MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1**

Die Untersuchungen zur Stabilität von MVA-IE1, MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1 wurden von Dr. vet. med. Yasemin Süzer aus der Abteilung Virologie am Paul-Ehrlich-Institut in Langen durchgeführt. Die MVA-IE1 und MVA-pp65 wurde in HEFs bzw. MVA-pp65-IE1 wurde in HeLa-Zellen für die Proteinexpression im Western Blot mit monoklonalen Antikörpern gegen CMV pp65 (Klon 2 und 6, Abcam, Cambridge, UK) und CMV IE1 72 (Klon E13, Abcam, Cambridge, UK) untersucht. Die genetische Stabilität von MVA-IE1 und MVA-pp65 wurde in HEFs bzw. von MVA-pp65-IE1 in HeLa-Zellen mit einer niedrigen Infektionsmultiplizität (MOI) in bis zu 17 Passagen durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR) getestet (Staib et al. 2004).

## **2.2.7 Infektion der Leukozyten**

Die MVA-Stämme wurden auf  $1 \times 10^6$  Pfu/ $\mu$ l eingestellt, zu 50  $\mu$ l in ein Kryoröhrchen aliquotiert und stets bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Zum Auftauen wurden die noch gefrorenen Viren solange gevortext, bis diese vollständig aufgetaut waren. Dieser Schritt war notwendig um die Viruspartikel voneinander zu trennen. Die Infektion der verschiedenen Leukozyten mit MVA-wt, MVA-GFP, MVA-IE1, MVA-pp65 oder MVA-pp65-IE1 erfolgte mit einer MOI von 5 (MOI=5) für 1h in serumfreien RPMI-Medium mit  $1 \times 10^6$  Zellen pro 250  $\mu$ l im Brutschrank. Die Leukozyten wurden anschließend mit RPMI-Medium gewaschen und für die jeweils angegebene Zeit in 1ml RPMI-Medium pro  $1 \times 10^6$  Zellen im Brutschrank inkubiert.

## **2.2.8 Untersuchung des Tropismus von MVA**

PBMCs,  $\text{CD4}^+$  T-Zellen,  $\text{CD8}^+$  T-Zellen, B-Zellen, Monozyten und aus Monozyten generierte iDCs und mDCs wurden wie unter 2.2.7 beschrieben mit MVA-wt oder MVA-GFP infiziert. 6h und 24h nach der Infektion wurden die Zellen geerntet und mit 5% polyklonalem IgG 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, um die Fc-Rezeptoren zu blockieren. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und mit einem polyklonalen Anti-Vaccinia-Virus Antikörper für 15 min bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Dann wurden die Zellen 2x mit FACS-Puffer gewaschen und mit einem Ziege F(ab')<sub>2</sub> Anti-Kaninchen-IgG APC (siehe 2.1.7) 15 min bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Die PBMCs wurden zusätzlich mit anti-CD3, -CD4, -CD8, -CD14, -CD19 und/oder -CD56 Antikörpern (siehe 2.1.7) angefärbt. Zum Schluss wurden die Zellen 2x mit FACS-

Puffer gewaschen und mit 1% Formaldehyd (FA) fixiert. Die Zellen wurden zur Untersuchung der MVA-Ag- und der GFP-Expression im Durchflusszytometer analysiert.

### **2.2.9 Phagozytose-Assay der Monozyten**

PBMCs wurden mit MVA-GFP infiziert (siehe 2.2.7) und 3x mit RPMI-Medium gewaschen oder mit PKH26Red nach Angaben des Herstellers markiert. Anschließend wurden die mit MVA-GFP infizierten PBMC 1:1 mit den PKH26RED markierten PBMC 24h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen für 15 min bei 4°C mit anti-CD4, -CD8, -CD14 und -CD19 Antikörpern (siehe 2.1.5) inkubiert. Danach wurden die Zellen 2x mit FACS-Puffer gewaschen und mit 1% FA fixiert.

Dieser Versuch wurde mit isolierten Monozyten und den autologen CD14<sup>-</sup> PBMC wiederholt. Dazu wurden die Monozyten mit PKH26Red nach Angaben des Herstellers markiert und die CD14<sup>-</sup> PBMC mit MVA-GFP infiziert und 3x mit RPMI-Medium gewaschen. Die Monozyten und die autologen CD14<sup>-</sup> PBMC wurden anschließend 1:1 24h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem anti-CD14 Antikörper 15 min bei 4°C angefärbt, 2x mit FACS-Puffer gewaschen und in 1% FA fixiert.

Zum Nachweis der Phagozytose von Partikeln MVA-GFP infizierter Zellen durch die Monozyten wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert

### **2.2.10 Oberflächenfärbung der APCs**

Je  $1 \times 10^6$  bis  $2 \times 10^6$  Monozyten, iDCs, mDCs und B-Zellen wurden mit MVA-wt, MVA-GFP, MVA-IE1, MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1, wie unter 2.2.7 beschrieben, infiziert. Nach 24 wurden die Zellen geerntet und für 15 min bei 4°C mit anti-CD1a, -CD1d, -CD14, -CD19, -CD25, -CD69, -CD40, -CD80, -CD83, -CD86, -HLA-ABC, -HLA-DR und -CCR7 Antikörpern (siehe 2.1.5) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen 2x mit FACS-Puffer gewaschen und mit 1% FA fixiert. Die Expression der Oberflächenmarker wurde im Durchflusszytometer analysiert.

### **2.2.11 Intranukleäre Färbung von IE1 und pp65**

Je  $1 \times 10^6$  bis  $2 \times 10^6$  Monozyten, iDCs, mDCs oder B-Zellen wurden mit MVA-IE1, MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1 infiziert (siehe 2.2.7). Nach 24h wurden die Zellen geerntet und mit 1% FA für 15 min bei RT. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 90% eiskaltem Methanol für 20 min auf Eis permeabilisiert. Dann

wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und mit 5% polyklonalen humanen IgG für 15 min bei RT geblockt. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit monoklonalen Antikörpern gegen HCMV pp65 oder HCMV IE1 (siehe 2.1.5) 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und mit Ziege F(ab')<sub>2</sub> Anti-Maus IgG+IgM FITC oder Ziege Anti-Maus IgG+IgM FITC (siehe 2.1.5) 30 min bei RT inkubiert. Zum Schluss wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen, mit 1% FA fixiert und im Durchflusszytometer analysiert.

Außerdem wurden die Zellen wie unter 2.2.8 beschrieben für MVA-Ag angefärbt.

### **2.2.12 Nachweis der Zytokin-mRNA-Expression durch quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)**

Je  $3 \times 10^6$  Monozyten, B-Zellen, iDCs und mDCs wurden mit MVA-wt, MVA-IE1, MVA-pp65 oder MVA-pp65-IE1 infiziert (siehe 2.2.7). 6h nach der Infektion wurde die mRNA der Zellen mit QIAshredder™-Säulen und dem RNeasy® Mini Kit nach Angaben des Herstellers Qiagen isoliert und bei -80°C aufbewahrt. Nach der Konzentrationsbestimmung der mRNA mit dem Photometer Nanodrop wurden jeweils 500ng der mRNA mit dem QuantiTect® Reverse Transkription Kit nach den Angaben des Herstellers Qiagen in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde dann sofort für die Analyse mittels qRT-PCR weiterverwendet oder bei -20°C aufbewahrt.

Für die qRT-PCR im LightCycler wurden spezifische Primer und Hybridisierungssonden (siehe 2.1.6) verwendet. Die Hybridisierungssonden bestehen aus einem Paar Oligonukleotiden, von denen das eine am 3'-Ende mit Fluorescein markiert und das andere 5'-terminal mit dem Farbstoff LightCycler® Red 640 (LC640) markiert ist und deren 3'-Hydroxylgruppe mit einer Phosphatgruppe gegen die nicht erwünschte Extension durch die Polymerase blockiert ist ([http://www.tib-molbiol.com/de/lightcycler/products/hybpr\\_amounts.html](http://www.tib-molbiol.com/de/lightcycler/products/hybpr_amounts.html) 2009). Diese zwei Sonden können spezifisch an die jeweiligen PCR-Produkte, in einem Abstand von 1 bis 5 Basenpaaren, binden. Dabei überträgt der kurzwelligere Farbstoff Fluorescein, der mittels blauen Lichtes angeregt wird, seine Energie strahlungslos an den langwelligeren Farbstoff LC640. Dieser gibt ein rotes Licht ab, das detektiert wird. Dieser Vorgang wird als Fluoreszenz Resonanz Energietransfer (FRET) bezeichnet (<http://www.tib-molbiol.com/de/lightcycler/design/> 2009). Die freigesetzte rote Fluoreszenz ist direkt proportional zur Menge an amplifizierter Ziel-DNA und wird einmal pro Zyklus nach dem *Primer-Annealing* gemessen. Ungebundene Sonden,

die frei in der Lösung diffundieren, ergeben aufgrund fehlender räumlicher Nähe zueinander ein deutlich schwächeres Signal (Konrad und Busch 2010).

Zunächst wurde eine qRT-PCR für das *Housekeeping*-Gen hALAS durchgeführt. Dazu wurde der in Tabelle 5 dargestellte Reaktionsmix mit den entsprechenden Primern und Sonden (siehe 2.1.6) in LightCycler-Kapillaren angesetzt, die Kapillaren wurden dann 10 sec bei 1000 rpm zentrifugiert und anschließend in das LightCycler-Karussell eingesetzt. Die qRT-PCR lief unter den in Tabelle 6 beschriebenen Bedingungen ab.

**Tabelle 5: qRT-PCR Reaktionsmix für die Reaktion im LightCycler**

Reagenz	Volumen
H2O (PCR-grade)	4µl
Forward (5'-3') Primer (5µM)	1µl
Reverse (5'-3') Primer (5µM)	1µl
3'-FL Sonde (3µM)	1µl
5'-LC640 3'-PH Sonde (3µM)	1µl
QuantiFast Probe PCR Master Mix (2x)	10µl
cDNA	2µl

**Tabelle 6: Bedingungen für die qRT-PCR**

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	95 °C	10 min
Amplifikation	55-60	95 °C	9 sec
		49 °C-54 °C	15 sec
		72 °C	20 sec
Kühlen	1	40 °C	5 sec

Die Annealing-Temperatur hängt von der Schmelztemperatur der jeweiligen Primer und Sonden ab.

Die qRT-PCR zur Analyse der mRNA-Expression der Zytokine CXCL8, CXCL10, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12p35 und TNFα wurden wie für hALAS beschrieben, unter der Verwendung der jeweils notwendigen Primer und Sonden (siehe 2.1.6), durchgeführt.

Durch die qRT-PCR erhielt man sogenannte *Crossing Points* (CP). Der CP ist die Zyklenzahl bei der sich das Fluoreszenzsignal des PCR-Produktes signifikant vom Hintergrundsignal abhebt. Der CP der MVA infizierten Zellen wurde vom CP der uninfizierten Zellen abgezogen, dabei wurden die so erhaltenen Werte der Zielgene in das Verhältnis zu hALAS gesetzt (Normalisierung) (Mezger et al. 2008):

$$2^{(CP \text{ Zielgen unifiziert} - CP \text{ Zielgen MVA-infiziert})} / 2^{(CP \text{ hALAS unifiziert} - CP \text{ hALAS MVA-infiziert})}$$

### 2.2.13 Intrazelluläre Färbung von IL-12p35

Zum Nachweis von IL-12p70 in DCs nach Infektion mit MVA wurde dessen Untereinheit IL-12p35 intrazellulär detektiert. Dazu wurden  $1 \times 10^6$  iDCs und mDCs mit MVA-wt, MVA-IE1, MVA-pp65 oder MVA-pp65-IE1 infiziert (siehe 2.2.7). 7h nach der Infektion wurden  $10 \mu\text{g/ml}$  Brefeldin A zu den DCs gegeben, und diese weitere 16h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet, 15 min bei RT mit Permeabilisierungs-Puffer fixiert und permeabilisiert, 2x mit PBS gewaschen und mit einem anti-IL-12p35 Antikörper 15 min bei  $4^\circ\text{C}$  angefärbt. Anschließend wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und mit 1% FA fixiert. Die Expression von IL-12p35 wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht.

### 2.2.14 Viabilität und Apoptose der APCs nach Infektion mit MVA

Zur Untersuchung der Viabilität von MVA-infizierten DCs wurden  $1 \times 10^6$  DCs mit MVA-GFP infiziert (2.2.7). 24h nach der Infektion wurden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) angefärbt und direkt mittels Durchflusszytometrie auf tote Zellen im Verhältnis zur GFP-Expression analysiert.

Die Apoptoserate nach Infektion mit MVA wurde in DCs, Monozyten und B-Zellen untersucht. Dazu wurden  $1 \times 10^6$  APCs mit MVA-wt infiziert (2.2.7). 24h nach der Infektion wurden die Zellen mit PI und Annexin V FITC nach Angaben des Herstellers Beckman Coulter und sofort mittels Durchflusszytometrie auf apoptotische und nekrotische Zellen überprüft.

PI interkaliert in die DNA von nekrotischen und spätapoptotische Zellen. Frühapoptotische Zellen sind dagegen nur Annexin positiv, da deren Zellmembran noch intakt ist. Dabei binden Annexin V an Phosphatidylserin, das von der inneren Schicht der Phospholipiddoppelschicht der Zellmembran nach außen transloziert ist.

### **2.2.15 Phagozytose von Partikeln MVA-GFP infizierter B-Zellen durch iDCs**

Zum Nachweis der Phagozytose von Partikeln MVA-GFP infizierter B-Zellen durch iDCs wurden B-Zellen mit MVA-GFP infiziert (2.2.7). 24h nach der Infektion wurden die Zellen mit 30Gy bestrahlt und  $1 \times 10^6$  B-Zellen wurden zu  $3 \times 10^6$  iDCs an Tag 4 der DC-Differenzierung gegeben (siehe 2.2.3). Dabei wurde ein Drittel des RPMI-Medium der iDCs ausgetauscht und erneut GM-CSF und rhIL-4 hinzugegeben (siehe 2.2.3). Dann wurden die iDCs für 6h und 24h im Brutschrank inkubiert. Um auszuschließen, dass GFP-Partikel an den Zellen adhäreren und zu falsch positiven Phagozytoseergebnissen führen, wurden die iDCs auch bei 4°C inkubiert. Bei 4°C findet keine Phagozytose statt, jedoch würden GFP-Partikel an die Zelloberfläche binden. Nach der Ernte der Zellen wurden diese mit einem anti-CD19-Antikörper angefärbt (siehe 2.2.10 und 2.1.5), um die B-Zellen in der anschließenden Durchflusszytometrie auszuschließen.

Zusätzlich wurde die GFP-Aufnahme durch iDCs mittels Konfokalmikroskopie nachgewiesen. Dazu wurden  $1 \times 10^5$  iDCs 24h nach Koinkubation mit den MVA-GFP infizierten B-Zellen durch Zytospin (2 min bei 500 rpm) auf eine Adhäsionsobjektträger gebracht, mit DAPI haltigen Eindeckmedium überschichtet und über Nacht bei 4°C getrocknet. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe von Frau Sabine Roth aus dem PCR-Labor des Pathologischen Institutes der Uniklinik Würzburg am Konfokalmikroskop analysiert.

### **2.2.16 Ausreifung der DCs durch Antigen-Aufnahme von MVA infizierten B-Zellen**

B-Zellen wurden mit MVA-wt, MVA-IE1, MVA-pp65 oder MVA-pp65-IE1 infiziert (2.2.7). 24h nach der Infektion wurden die Zellen mit 30Gy bestrahlt und  $5 \times 10^5$  B-Zellen wurden zu  $3 \times 10^6$  iDCs an Tag 4 der DC-Differenzierung gegeben (siehe 2.2.3). Dabei wurde ein Drittel des RPMI-Medium der iDCs ausgetauscht und erneut GM-CSF und rhIL-4 hinzugegeben (siehe 2.2.3). Nach ca. 72h wurden die DCs geerntet und die Expression von CD1a, CD14, CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-ABC, HLA-DR und CCR7 (siehe 2.2.10) mittels Durchflusszytometrie untersucht.

### **2.2.17 Immunogenität von MVA-IE1, MVA-pp65 oder MVA-pp65-IE1 innerhalb humaner PBMCs**

Eingefrorene CD14<sup>-</sup>/CD20<sup>-</sup> PBMCs eines pockengeimpften CMV-positiven Spenders wurden aufgetaut (2.2.2), und je  $1 \times 10^6$  wurden in 1 Well einer 96-Well-Platte in 100  $\mu$ l RPMI-Medium gegeben. Anschließend wurden  $2 \times 10^5$  DCs in weiteren 100  $\mu$ l RPMI-Medium hinzugegeben, die mit MVA-wt, MVA-IE1, MVA-pp65, oder MVA-pp65-IE1 infizierten B-Zellen ausgereift wurden (siehe 2.2.16). Oder iDCs und mDCs wurden an Tag 9 der Differenzierung geerntet, mit MVA-pp65-IE bei MOI=1 oder MOI=5 infiziert und nach 24h ebenfalls 1:5 zu autologen CD14<sup>-</sup>/CD29<sup>-</sup> PBMCs gegeben. Nach 3 Tagen wurde die Hälfte des Mediums ausgetauscht und 50U/ml IL-2 zugefügt. Dann wurde das Medium jeden zweiten Tag unter Zugabe von IL-2 ausgetauscht. Am Tag 14 wurden die T-Zellen geerntet. Ein Teil der T-Zellen wurde sofort mit anti-CD3, -CD8, -CD45RA, -CCR7 Antikörpern, Isotypkontrollen (2.1.5) und, abhängig vom HLA-Typ des Spenders, mit HLA-A\*0201 CMV pp65 (NLVPMVATV) Tetramer und/oder HLA-B\*0702 CMV pp65 (TPRVTGGGAM) Tetramer (2.1.7) 30 min bei RT angefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.

Der andere Teil der T-Zellen wurden über Nacht ohne IL-2 mit  $1 \times 10^6$  Zellen pro Well weiterkultiviert. Danach wurden die T-Zellen mit 1  $\mu$ g/ml MVA 018L, pp65 oder IE1 Peptiden (2.1.7) restimuliert. 1h nach Zugabe der Peptidmische wurden 10  $\mu$ g/ml Brefeldin A hinzugefügt, so dass das Endvolumen 200  $\mu$ l pro Well betrug. Nach 16h wurden die T-Zellen geerntet und 15 min bei RT mit Permeabilisierungs-Puffer fixiert und permeabilisiert, 2x mit PBS gewaschen und für IFN $\gamma$ , CD3, CD4 und CD8 15 min bei 4°C angefärbt. Anschließend wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen, mit 1% FA fixiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

### **2.2.18 Statistik**

Als Signifikanztest für die Expression der Oberflächenmarker von IE1, pp65 und MVA-Ag wurde der zweiseitige T-Test angewendet und für die Zytokinexpression der Mann-Whitney-U-Test. Unterschiede wurden als signifikant angesehen wenn  $P < 0.05$  (\*) und hoch signifikant wenn  $P < 0.01$  (\*\*) war.

### **2.2.19 Software**

BLASTN 2.2.25+ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides>)  
(Zhang et al. 2000))

ChemBioDraw Ultra 12.0.2.1076 1986-2010 CambridgeSoft.

EndNote X4.0.1

Microsoft Office Excel 2007

Microsoft Office PowerPoint 2007

Microsoft Office Word 2007

OriginLab OriginPro 8G

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Tropismus und Effekte von MVA-wt und MVA-GFP innerhalb von humanen Immunzellen

Für den Einsatz von MVA für die adoptive zelluläre Immuntherapie und Vakzinierung gegen Virusinfektionen nach allogener SCT, ist es wichtig dessen Tropismus in humanen Leukozytenpopulationen und dessen immunstimulatorische Effekte zu untersuchen.

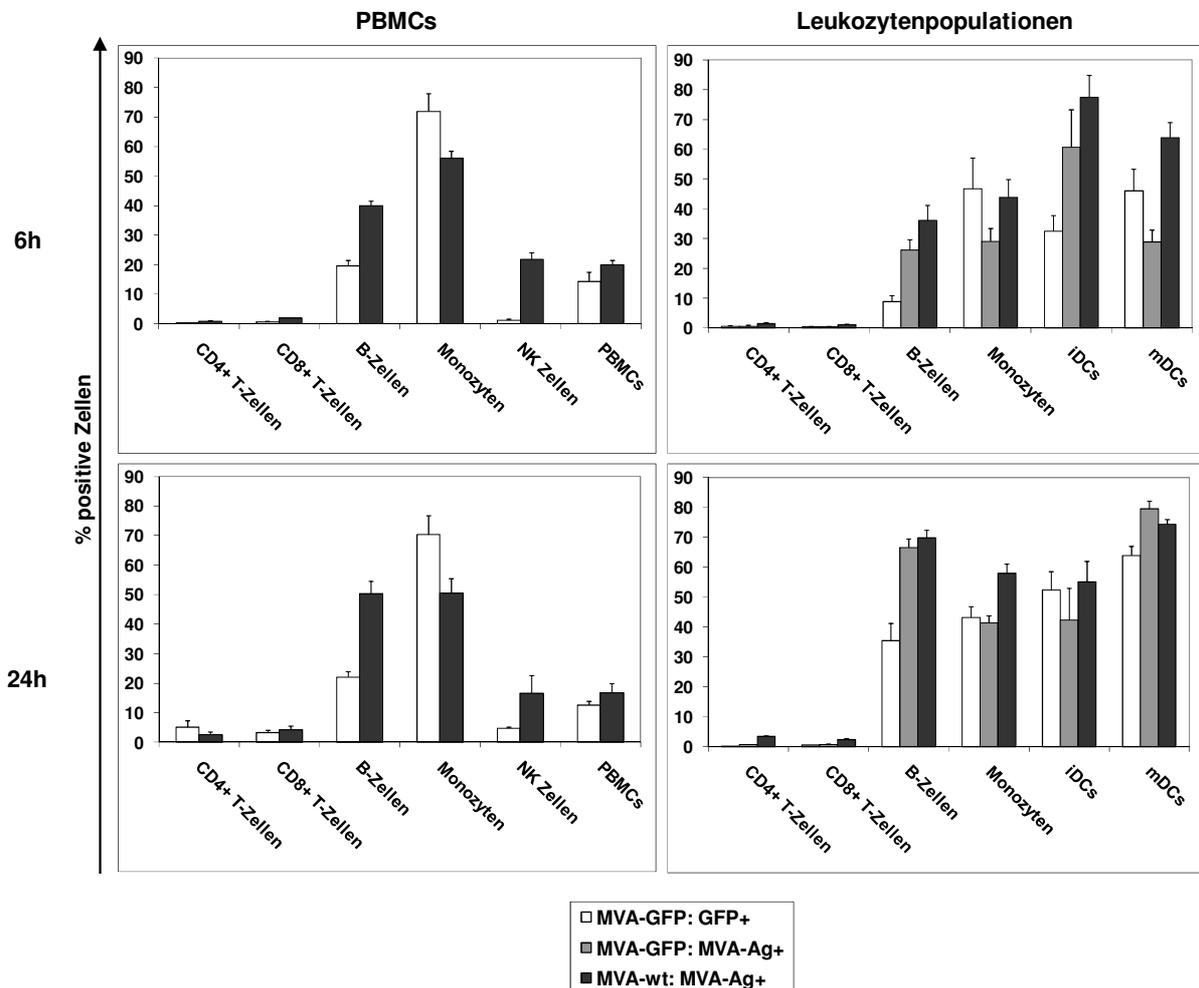
#### 3.1.1 MVA infiziert bevorzugt APCs

Zunächst sollte bestimmt werden welche der humanen Leukozyten, die bei der Generierung einer Immunantwort involviert sind, bevorzugt infiziert werden. Dies ist für die weiteren Untersuchungen der immunstimulatorischen Effekte von MVA und zur Generierung spezifischer T-Zell-Antworten von Bedeutung.

Um einen umfassenden Überblick des Tropismus von MVA innerhalb der verwendeten PBMCs und DCs zu erhalten, wurden sowohl die kompletten PBMCs als auch die einzelnen isolierten Fraktionen (B-Zellen, CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, Monozyten und aus Monozyten generierte DCs) mit MVA-wt und MVA-GFP infiziert. Nach 6h und 24h wurden Zellen auf die Expression von GFP und Vaccinia-Antigenen hin untersucht. Dabei wurden im Fall der kompletten PBMCs die Zellen spezifisch zur Detektion der B-Zellen (CD19<sup>+</sup>), CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>), CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>), Monozyten (CD14<sup>+</sup>) und NK-Zellen (CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup>) angefärbt.

Es zeigte sich, dass innerhalb der PBMCs Monozyten (50% bis 70%) und B-Zellen (20% GFP<sup>+</sup>, 50% MVA-wt<sup>+</sup>) am besten infiziert werden, gefolgt von NK-Zellen (5% GFP<sup>+</sup>, 20% MVA-wt<sup>+</sup>). T-Zellen (0,3% bis 5%) waren dagegen nahezu nicht infizierbar [Abbildung 7, links]. Innerhalb der einzelnen isolierten Leukozytenpopulationen konnten diese Infektionsraten bestätigt werden [Abbildung 7, rechts]. Jedoch waren innerhalb der kompletten PBMCs 24h nach der Infektion mit MVA-GFP hoch signifikant ( $P = 0,0056$ ) mehr Monozyten GFP-positiv (70,30%) als innerhalb der spezifisch isolierten Monozyten (43,23%). Desweiteren konnte auch eine hohe Infektionsrate der DCs nachgewiesen werden, wobei jedoch die Expression von GFP und der MVA-Ags nach 6h erhebliche Unterschiede aufwies (iDCs: 32% GFP<sup>+</sup>, >60% MVA-Ag<sup>+</sup>; mDCs: 46% GFP<sup>+</sup>, 29% MVA-GFP/MVA-Ag<sup>+</sup>, 64% MVA-wt/MVA-Ag<sup>+</sup>) aber 24h nach der

Infektion relativ angeglichen war (iDCs: 42-55% GFP<sup>+</sup> und MVA-Ag<sup>+</sup>; mDCs: 64-80% GFP<sup>+</sup> und MVA-Ag<sup>+</sup>) [Abbildung 7, rechts].



**Abbildung 7: Tropismus von MVA innerhalb der PBMCs und einzelnen Immunzellpopulationen**

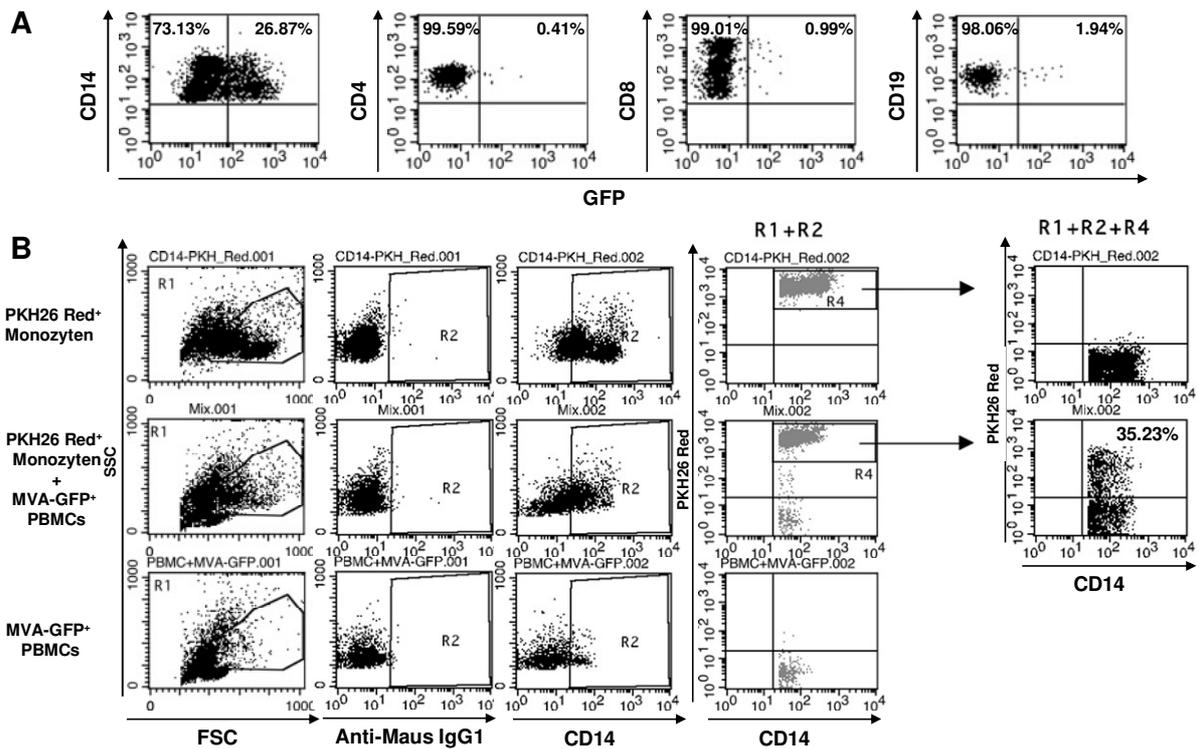
PBMCs oder spezifisch isolierte Leukozytenpopulationen und aus Monozyten generierte DCs wurden mit MVA-wt oder MVA-GFP mit einer MOI=5 infiziert. Nach 6h und 24h wurde die Expression von GFP und MVA-Antigenen (MVA-Ag) mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dazu wurden die Zellen mit 5% polyklonalem IgG 15 min bei RT inkubiert und mit einem polyklonalen Anti-Vaccinia-Virus Antikörper für 15 min bei 4°C inkubiert. Dann wurden die Zellen gewaschen und mit einem Ziege F(ab')<sub>2</sub> Anti-Kaninchen-IgG APC 15 min bei 4°C inkubiert. Im Fall der kompletten PBMCs wurden die Zellen spezifisch zur Detektion der B-Zellen (CD19<sup>+</sup>), CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>), CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>), Monozyten (CD14<sup>+</sup>) und NK-Zellen (CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup>) angefärbt. Die dargestellten Ergebnisse sind der Durchschnitt von mindestens 3 gesunden Spendern. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Durchschnitts.

### 3.1.1.1 Phagozytose von Partikeln MVA-GFP infizierter PBMCs durch Monozyten

Wie bereits erwähnt wurde, zeigten 24h nach Infektion mit MVA-GFP die Monozyten innerhalb der kompletten PBMCs eine hoch signifikant stärkere Expression von GFP als die nach Isolation infizierten Monozyten [Abbildung 7]. Es wurde vermutet, dass dies auf die Phagozytose anderer MVA-GFP infizierter PBMCs durch die Monozyten zurückzuführen ist.

Um diese Theorie zu bestätigen, wurden die PBMCs eines Spenders in zwei Hälften unterteilt, wobei die eine Hälfte mit MVA-GFP infiziert und die andere Hälfte mit PKH26 Red markiert wurde. Anschließend wurde das PBMC-Gemisch 24h kokultiviert und für Monozyten, CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und B-Zellen spezifisch angefärbt. Die Analyse am Durchflusszytometer ergab, dass 26,87% PKH26 Red-positiven Monozyten zugleich GFP-positiv waren, wohingegen innerhalb der untersuchten Lymphozyten weniger als 2% GFP positiv waren [Abbildung 8A]. Dies bedeutet, dass die Monozyten GFP-positive Partikel von MVA-GFP infizierten PBMCs aufgenommen haben. Somit ist die hohe Prozentzahl GFP-positiver Monozyten nach der Infektion von PBMCs mit MVA-GFP [Abbildung 7, links] nicht nur durch Infektion der Monozyten mit MVA-GFP zu erklären, sondern zusätzlich auch durch die Aufnahme von GFP-Partikeln von anderen MVA-GFP-infizierten PBMCs.

Jedoch bestand bei diesem Versuchsaufbau auch die Möglichkeit, dass MVA-GFP infizierte Monozyten Partikel der PKH26 Red-markierten PBMCs phagozytiert haben. Dadurch ließ sich nicht eindeutig zuordnen, welche Monozyten zuvor mit PKH26 Red markiert wurden und anschließend GFP-Partikel aufgenommen haben, oder ob diese zuvor mit MVA-GFP infiziert wurden und anschließend PKH26 Red-Partikel aufgenommen haben. Deshalb wurden in einem abgewandelten Versuchsaufbau die Monozyten zuvor aus den PBMCs isoliert und PKH26 Red markiert und die CD14<sup>-</sup>-PBMCs wurden mit MVA-GFP infiziert. Nach 24h Koinkubation wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass 35,23% der Monozyten GFP-positive Partikel der MVA-GFP-infizierten CD14<sup>-</sup>-PBMCs aufgenommen hatten [Abbildung 8B].



**Abbildung 8: Phagozytose von Partikeln MVA-GFP infizierter PBMCs durch Monozyten**

(A) PBMCs wurden entweder mit MVA-GFP infiziert und oder mit PKH26 Red nach Angaben des Hersteller markiert und 3x gewaschen. Anschließend wurden die mit MVA-GFP infizierten PBMC 1:1 mit den PKH26RED markierten PBMC 24h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen für CD4, CD8, CD14 und CD19 angefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. (B) Monozyten wurden mit PKH26 Red markiert und autologe CD14<sup>-</sup> PBMC mit MVA-GFP infiziert und anschließend 1:1 im Brutschrank inkubiert. Nach 24h wurden die Zellen mit einem anti-CD14 Antikörper angefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für 2 gesunde Spender.

### 3.1.2 Effekte von MVA-wt und MVA-GFP auf APCs

Nachdem nun nachgewiesen wurde, dass MVA bevorzugt APCs infiziert [Abbildung 7], sollten die Effekte von MVA auf die Expression von Oberflächenmolekülen und Zytokinen, die bei der Generierung effektiver T-Zell-Antworten von Bedeutung sind, untersucht werden.

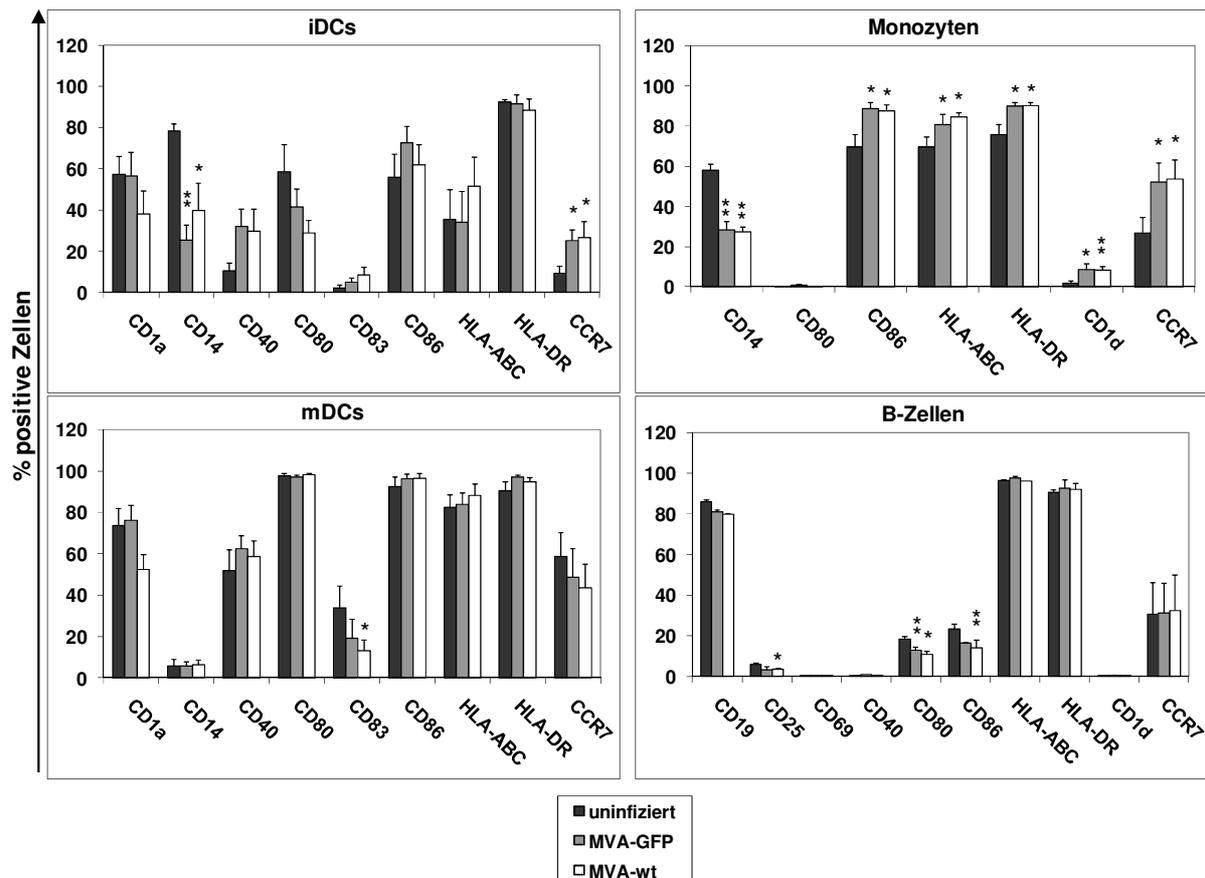
#### 3.1.2.1 Effekte von MVA-wt und MVA-GFP auf die Oberflächenmoleküle von APCs

Um eine potente und stabile T-Zell-Antwort auslösen zu können, ist es unerlässlich, dass die APCs nach Infektion mit MVA ausreichend kostimulatorische Moleküle und MHC-Komplexe für die Präsentation viraler Antigene exprimieren. Zur Analyse des Potentials der APCs zur Kostimulation und Antigenpräsentation wurden Monozyten und B-Zellen sowie aus Monozyten generierte iDCs und mDCs mit MVA-wt und MVA-GFP infiziert und nach 24h mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Infektion mit MVA rief sehr unterschiedliche Effekte innerhalb der verschiedenen APC-Populationen hervor. Zum einen wirkte MVA stark aktivierend auf Monozyten mit einer hoch signifikanten ( $P < 0,01$ ) Reduktion von CD14 und signifikanter ( $P < 0,05$ ) Erhöhung des kostimulatorischen Moleküls CD86, der MHC-Komplexe HLA-ABC, HLA-DR und CD1d sowie des Lymphknoten-*Homing*-Rezeptors CCR7 [Abbildung 9, oben rechts].

Zum anderen wirkte es inhibierend auf B-Zellen mit einem signifikanten ( $P < 0,05$ ) Rückgang der Expression des Aktivierungsmarkers CD25 und der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 [Abbildung 9, unten rechts].

Auf iDCs hatte MVA jedoch ambivalente Effekte. CD1a und CD80 wurden bei fast allen Spendern reduziert, was für eine Hemmung der DC-Funktion spricht. Dagegen wurde die Expression von CD14 signifikant ( $P < 0,05$ ) verringert und CCR7 signifikant ( $P < 0,05$ ) hochreguliert. Desweiteren war die Expression von CD40, CD83 und CD86 auf iDCs nach Infektion mit MVA bei fast allen Spendern erhöht [Abbildung 9, oben links]. Dies spricht wiederum für eine Aktivierung der iDCs.

Bezüglich der mDCs konnten dagegen keine Effekte nach Infektion mit MVA auf die Expression der Oberflächenmoleküle nachgewiesen werden, mit Ausnahme von CD83, dessen Expression signifikant ( $P < 0,05$ ) reduziert wurde [Abbildung 9, unten links].

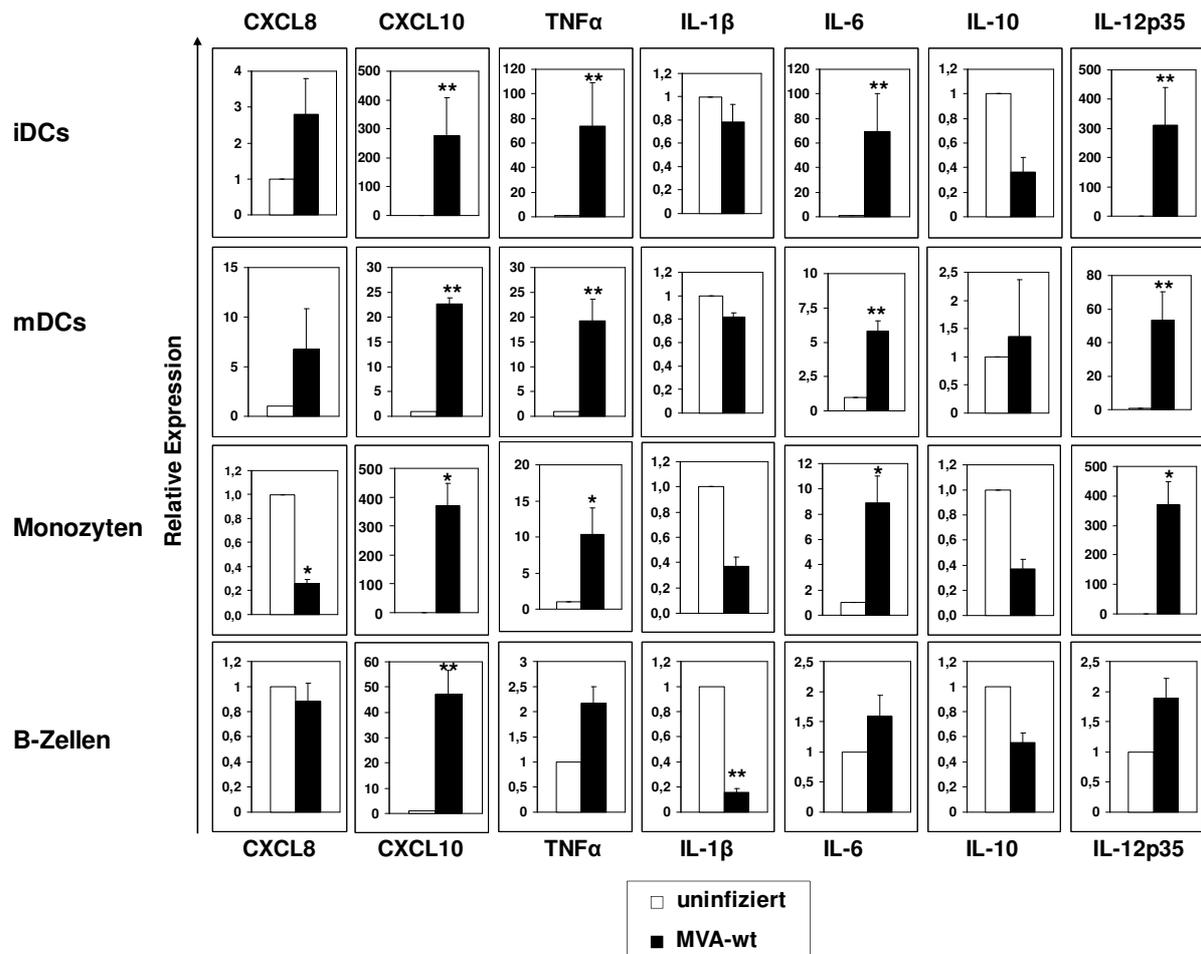


**Abbildung 9: Effekte von MVA-GFP und MVA-wt auf die Oberflächenmarker der APCs**

DCs, Monozyten und B-Zellen wurden mit MVA-GFP oder MVA-wt mit einer MOI=5 infiziert, nach 24h für die angegebenen Oberflächenmarker angefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die dargestellten Ergebnisse sind der Durchschnitt von mindestens 4 gesunden Spendern. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Durchschnitts. \* = signifikant ( $P < 0,05$ ), \*\* = hoch signifikant ( $P < 0,01$ )

### 3.1.2.2 Zytokinexpression in APCs nach Infektion mit MVA-wt

Zur Induktion einer effektiven zellulären Immunabwehr ist die Expression von proinflammatorischen und Th1-polarisierenden Zytokinen unerlässlich. Für die Analyse der Zytokinexpression wurden Monozyten und B-Zellen sowie aus Monozyten generierte iDCs und mDCs mit MVA-wt infiziert. Nach 6h wurde die mRNA isoliert und mittels qRT-PCR analysiert. Die Infektion mit MVA-wt führte zu einer signifikanten ( $P < 0,05$ ) Expressionssteigerung der proinflammatorischen Zytokine *CXCL10*, *TNF $\alpha$*  und *IL-6* in allen APCs. Desweiteren wurde die Expression der Untereinheit *IL-12p35* des Th1-polarisierenden *IL-12p70* in iDCs, mDCs und Monozyten signifikant ( $P < 0,05$ ) erhöht. Dagegen war die Expression von *CXCL8* in Monozyten sowie von *IL-1 $\beta$*  in B-Zellen signifikant ( $P < 0,05$ ) reduziert [Abbildung 10].



**Abbildung 10: MVA-wt induziert eine Th1-polarisierende Zytokinexpression in APCs**

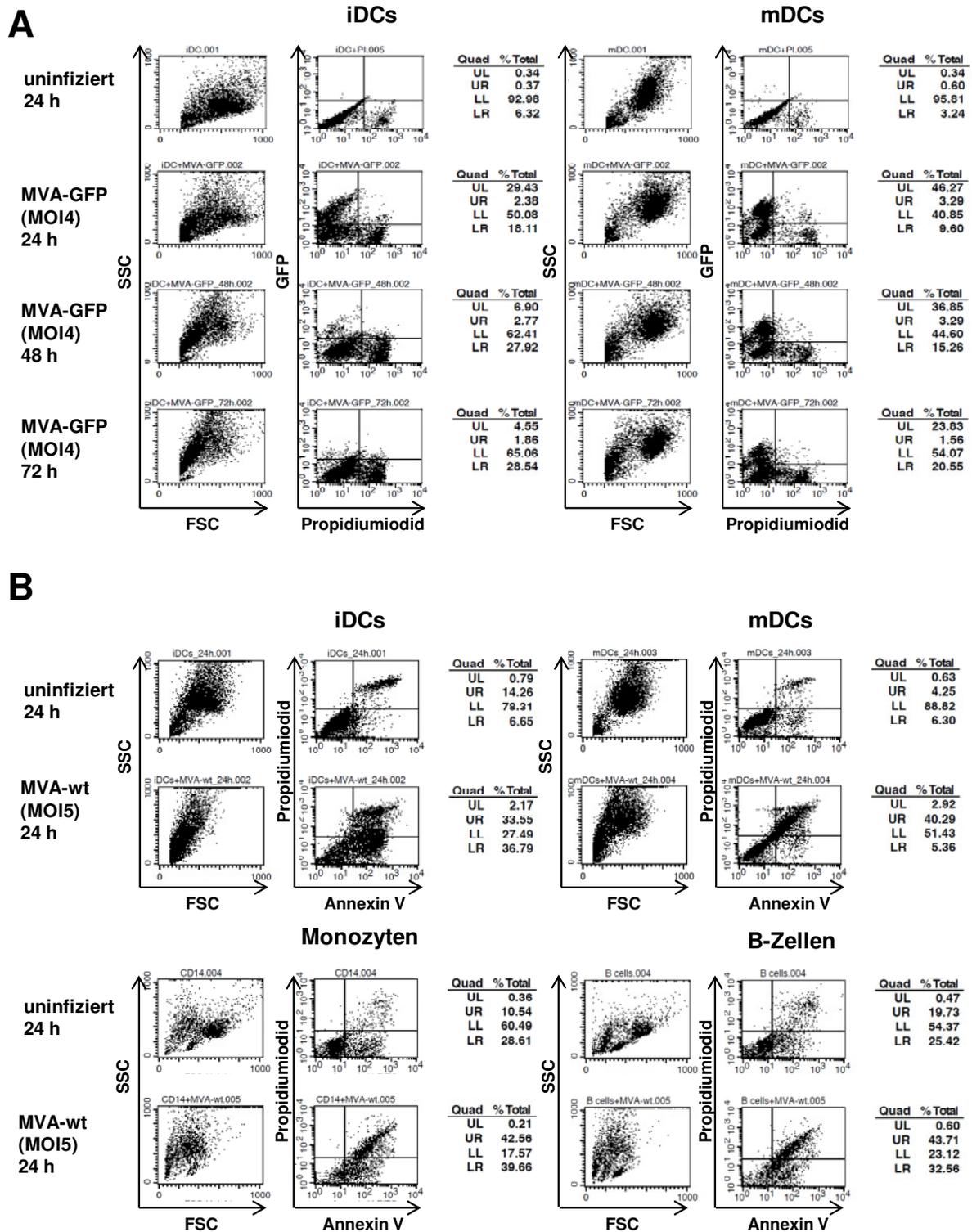
DCs, Monozyten und B-Zellen wurden mit MVA-wt mit einer MOI=5 infiziert, nach 6h wurde die mRNA isoliert und die Genexpression mittels qRT-PCR analysiert. Die erhaltenen *Crossing Points* (CP) wurden gegen die des *Housekeeping*-Gens hALAS mit folgender Gleichung  $2^{(CP \text{ Zielgen uninfiziert} - CP \text{ Zielgen MVA-infiziert})} / 2^{(CP \text{ hALAS uninfiziert} - CP \text{ hALAS MVA-infiziert})}$  normalisiert. Die dargestellten Ergebnisse sind der Durchschnitt von mindestens 3 gesunden Spendern. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Durchschnitts. \* = signifikant ( $P < 0,05$ ), \*\* = hoch signifikant ( $P < 0,01$ )

### 3.1.2.3 Viabilität und Apoptose der APCs nach Infektion mit MVA-wt und MVA-GFP

Die Induktion des Zelltods von APCs durch MVA kann bedeutende Effekte auf Immunantworten haben. Während ein schneller Zelltod die Antigenexpression limitiert und deshalb mit der spezifischen Immunantwort auf MVA-codierte Antigene interferiert und der programmierte Zelltod (Apoptose) zu Immunsuppression führt, kann der Zelltod auch für die Antigenaufnahme und Kreuzpräsentation durch uninfizierte APCs nützlich sein.

Deswegen wurde zunächst die GFP-Expression und Viabilität von DCs zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion mit MVA-GFP unter der Verwendung von PI überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass in einem Zeitraum von 72h die Viabilität der MVA-GFP-infizierten DCs, einhergehend mit einer starken Reduktion der GFP-Expression, stark sinkt [Abbildung 11A]. Dieser Effekt war bei den iDCs stärker ausgeprägt als bei mDCs.

Zur Untersuchung der Apoptoserate wurden Monozyten und B-Zellen sowie aus Monozyten generierte iDCs und mDCs mit MVA-wt infiziert und nach 24 Stunden mit PI, das nekrotische und spätapoptische Zellen anfärbt, und Annexin V FITC, das apoptotische Zellen anfärbt, inkubiert. Es zeigte sich, dass ein Großteil der APCs innerhalb von 24 Stunden starben, wobei dieser Zelltod durch Apoptose ausgelöst wurde, da alle toten Zellen entweder Annexin V positiv oder doppelt positiv für Annexin V und PI waren. Die höchste Apoptoserate hatten die Monozyten (82,22 %) gefolgt von B-Zellen (76,27%) und iDCs (70,34%). Die niedrigste Apoptoserate hatten die mDCs (45.65%) [Abbildung 11B].



**Abbildung 11: Viabilität und Apoptose der APCs nach Infektion mit MVA**

(A) DCs wurden mit MVA-GFP mit einer MOI=4 infiziert und nach den angegebenen Zeitpunkten mit Propidiumiodid (PI) angefärbt und mittels Durchflusszytometrie der Anteil der PI- und GFP-positiven Zellen ermittelt. (B) Die APCs wurden mit MVA-wt mit einer MOI=5 infiziert. Nach 24h wurden die APCs mit PI und Annexin V FITC angefärbt und die Apoptose mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Ergebnisse sind jeweils repräsentativ für 2 gesunde Spender.

### 3.1.2.4 Ausreifung von DCs durch Phagozytose von Partikeln MVA-GFP infizierter B-Zellen

DCs sind die potentesten APCs um ruhende, naive oder Gedächtnis-T-Lymphozyten zu aktivieren. iDCs phagozytieren, prozessieren und präsentieren Antigene MHC-II-restringierten  $CD4^+$  T-Zellen. Die so aktivierten  $CD4^+$  T-Zellen können wiederum die iDCs mit dem CD40-Liganden aktivieren, was die Ausreifung der iDCs hervorruft. Die daraus resultierenden mDCs können praktisch nicht mehr phagozytieren und haben somit auch keine Möglichkeit mehr neue exogene Antigene für die MHC-II-Präsentation zu prozessieren. Jedoch erlangen sie die Fähigkeit MHC-I-restringierte  $CD8^+$  T-Zellen effizient zu stimulieren.

Es konnte zwar nachgewiesen werden, dass MVA-wt Th1-polarisierende Eigenschaften hat [Abbildung 10], jedoch zeigten infizierten DCs eine hohe Apoptoserate [Abbildung 11B] und eine unzureichende Expression der kostimulatorischen Moleküle und MHC-Komplexe [Abbildung 9, links]. Deshalb erscheint es unwahrscheinlich, dass mit MVA infizierte DCs eine ausreichende T-Zellantwort, insbesondere von naiven T-Zellen induzieren können.

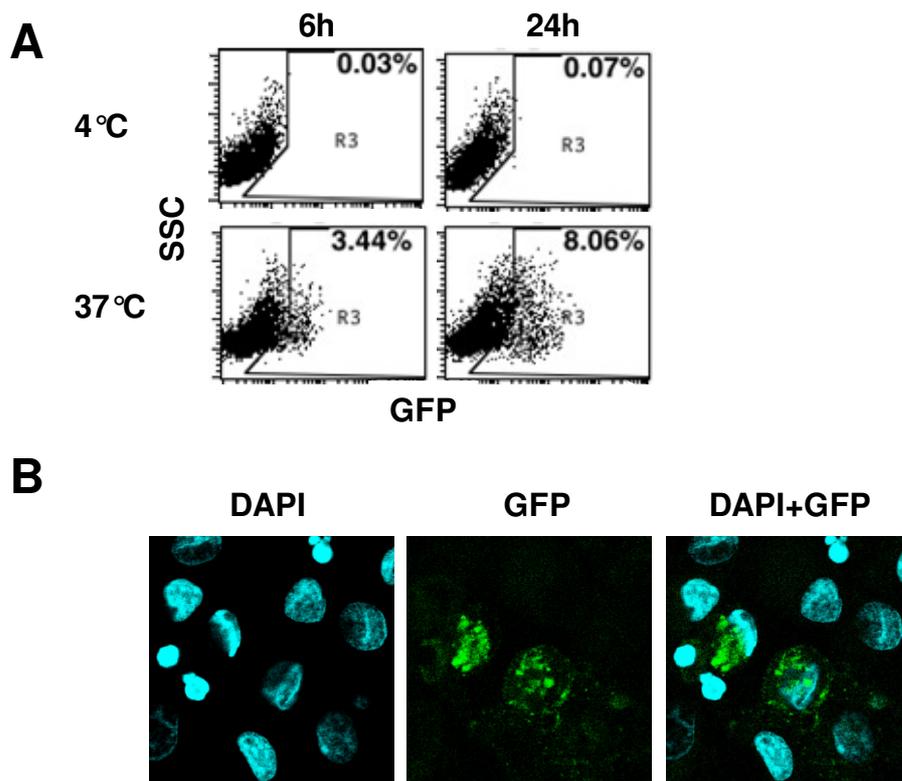
Als Ausweg für diese Probleme wurde die Kreuzpräsentation von MVA-kodierten Antigenen in Betracht gezogen. Bei dieser Form der Epitop-Präsentation können auch Antigene von apoptotischen und nekrotischen Zellen durch iDCs phagozytiert, prozessiert und MHC-I-restringierten  $CD8^+$  T-Zellen präsentiert werden.

Zunächst sollte die Antigenaufnahme von MVA-infizierten Zellen durch iDCs überprüft werden. Als Antigenquelle wurden B-Zellen verwendet, da diese während der Durchflusszytometrie-Analyse leicht von DCs im SSC/FSC zu unterscheiden sind und während der iDC-Generierung aus der gleichen Blutprobe verfügbar sind.

Zur Überprüfung der Antigenaufnahme von MVA-infizierten B-Zellen durch iDCs wurden die B-Zellen mit MVA-GFP infiziert, nach 24h mit 30Gy bestrahlt und im Verhältnis von 1:3 den autologen iDCs an Tag 4 der Differenzierung hinzugegeben. Die iDCs wurden anschließend bei 37°C und 4°C inkubiert. Die Inkubation bei 4°C diente als Negativkontrolle für die Phagozytose, da bei 4°C keine Phagozytose stattfindet. Jedoch können GFP-Partikel und tote B-Zellen an den iDCs durch Adhärenz haften bleiben und so ein falsch-positives Signal verursachen. Zusätzlich wurden während der FACS-Analyse die B-Zellen durch Färbung mit einem Anti-CD19-Antikörper ausgeschlossen. Nach 6h waren 3,44% der bei 37°C inkubierten iDCs

GFP-positiv und 0,03% der bei 4°C inkubierten. Nach 24h waren 8,06% der bei 37°C inkubierten iDCs GFP-positiv und 0,07% der bei 4°C inkubierten [Abbildung 12A].

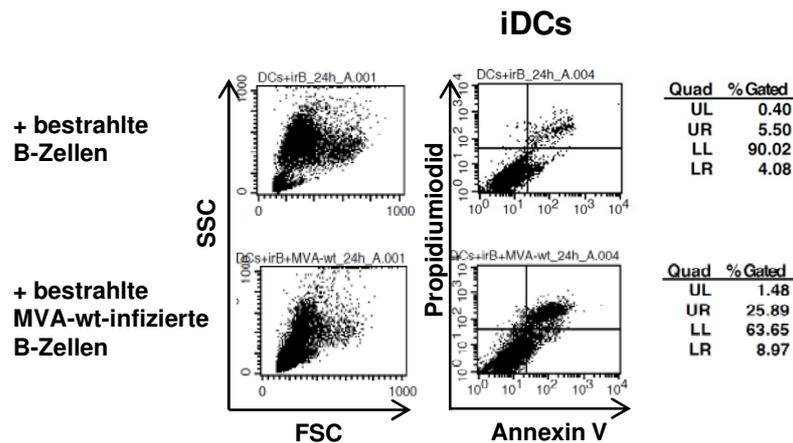
Außerdem wurde die Aufnahme von GFP-Partikeln durch iDCs mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie verifiziert. 24h nach der Koinkubation von MVA-GFP infizierten B-Zellen und iDCs konnten GFP-Partikel innerhalb der DCs detektiert werden [Abbildung 12B].



**Abbildung 12: GFP-Aufnahme durch iDCs von MVA-GFP infizierten B-Zellen**

(A) B-Zellen wurden mit MVA-GFP mit einer MOI=5 infiziert. 24h nach der Infektion wurden die B-Zellen bestrahlt und  $1 \times 10^6$  B-Zellen wurden zu  $3 \times 10^6$  iDCs an Tag 4 der DC-Differenzierung gegeben. Dann wurden die iDCs für 6h und 24h bei 4°C und im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem anti-CD19-Antikörper zum Ausschluss der B-Zellen angefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. (B) iDCs wurden 24h nach Koinkubation mit den MVA-GFP infizierten B-Zellen im Brutschrank durch Zytospin auf einen Adhäsionsobjekträger gebracht, die Zellkerne mit DAPI angefärbt und am Konfokalmikroskop mit 600 facher Vergrößerung aufgenommen. Die Abbildungen sind repräsentativ für 2 gesunde Spender.

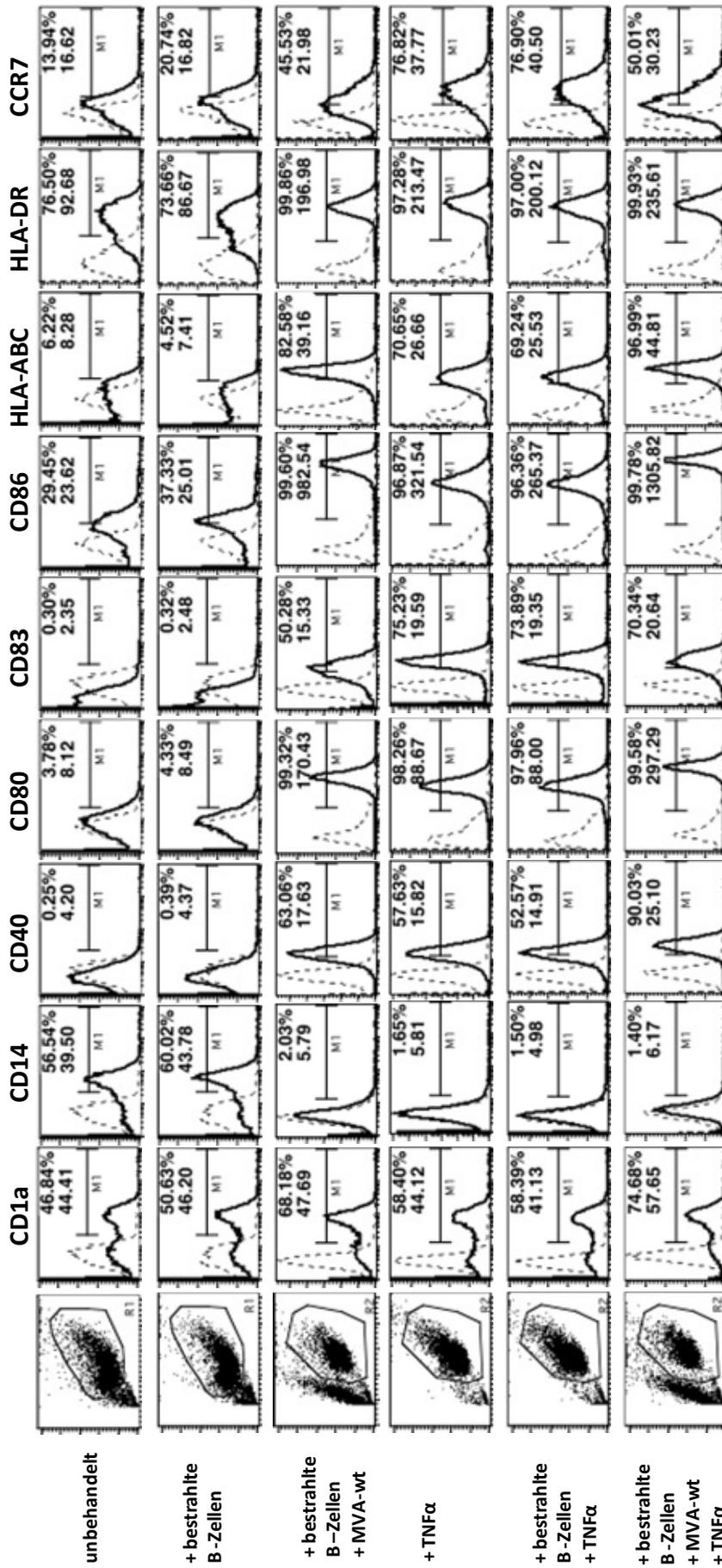
Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass iDCs, die Antigene von MVA-wt infizierten B-Zellen aufgenommen hatten, eine sehr viel höhere Überlebensrate vorwiesen (63,65%) [Abbildung 13] als direkt infizierte iDCs (27,49%) [Abbildung 11B].



**Abbildung 13: Verringerte Apoptose von DCs nach Antigen-Aufnahme von MVA-infizierten B-Zellen**

B-Zellen wurden mit MVA-wt mit einer MOI=5 infiziert. 24h nach der Infektion wurden die B-Zellen bestrahlt und  $1 \times 10^6$  B-Zellen wurden zu  $3 \times 10^6$  iDCs an Tag 4 der DC-Differenzierung gegeben. Nach 24h wurden die Zellen mit PI, Annexin V FITC und einem anti-CD19-Antikörper zum Ausschluss der B-Zellen angefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 2 gesunde Spender.

Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die Koinkubation von iDCs mit MVA-wt-infizierten B-Zellen an Tag 4 bis 7 der Differenzierung, jedoch nicht mit B-Zellen allein, eine vollständige Ausreifung der DCs induzierte. Diese war durch eine starke Reduktion der CD14-Expression und eine erhöhte Expression der kostimulatorischen Moleküle, der MHC-Komplexe und des Lymphknoten-*Homing*-Markers CCR7 gekennzeichnet [Abbildung 14]. Außerdem konnte die durchschnittliche Fluoreszenzintensität durch die Zugabe von TNF $\alpha$  noch weiter erhöht werden [Abbildung 14].



**Abbildung 14: Ausreifung von DCs nach Inkubation mit MVA-wt-infizierten B-Zellen**

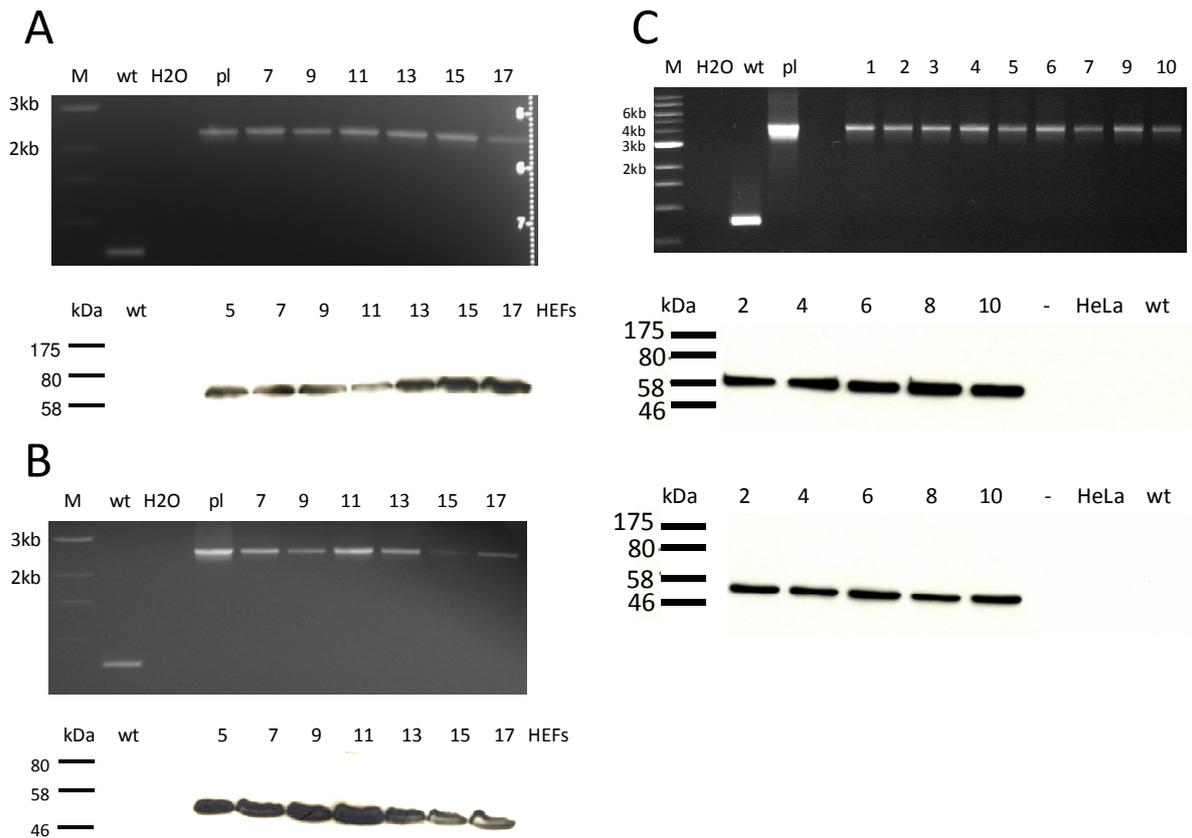
B-Zellen wurden mit MVA-wt infiziert und nach 24h mit 30Gy bestrahlt. Anschließend wurden die B-Zellen in einem Verhältnis von 1:6 zu autologen aus Monozyten generierten iDCs an Tag 4 der Differenzierung hinzugegeben. Nach 72h wurden die DCs für die angegebenen Oberflächenmarker angefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dicke Linien stellen das Fluoreszenzsignal für spezifische Antikörper and gestrichelte Linien die Isotypenkontrolle dar. Der Prozentsatz positiver Zellen und die durchschnittliche Fluoreszenzintensität sind oben rechts angegeben. In den Punktauftragungen befindet sich links die SSC-Achse und unten die FSC-Achse. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 5 verschiedenen Spender.

## **3.2 MVA-IE1, MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1**

### **3.2.1 Stabilität von MVA-IE1, MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1**

Die stabile Expression von IE1 und pp65 ist eine unabdingbare Voraussetzung für die Verwendung von MVA als Impfvektor, denn dieser muss vielfach in ausreichender Menge für den cGMP-Herstellungsprozess amplifiziert werden und dabei seine Wirksamkeit und Effektivität beibehalten, damit dieser die Vorschriften der Zulassungsbehörden erfüllt (Z. Wang et al. 2010). Darüber hinaus sollte ein viraler Impfvektor frei von Markergenen für Antibiotikaresistenzen sein, da diese auf die endogene mikrobielle Flora übertragen oder unerwünschte Transkriptionsprodukte erzeugt werden könnten (Luke et al. 2009), was andere klinische Therapien nachteilig beeinflussen könnte (EMA 2001).

Deshalb wurden IE1 und pp65 mittels homologer Rekombination zwischen flank-I und flank-II der Del III in MVA mit Markern eingefügt, die eine transient-dominante Selektion nach klonaler Isolation ermöglichen (Scheiflinger et al. 1998). Dies erlaubt eine komplette Entfernung aller Selektionsmarker und den inserierten homologen Rekombinationstellen durch homologe Rekombination des originalen flank-I und dem inserierten flank-I [Abbildung 6]. Dadurch wird eine spontane homologe Rekombination und somit der Verlust der IE1- und pp65-ORFs praktisch unmöglich. Um die stabile Expression von IE1 und pp65 in HEF zu überprüfen wurden von Dr. Yasemin Süzer vom Paul-Ehrlich-Institut PCRs und Western Blots bis zur Passage 10 bzw. 17 durchgeführt. Sie konnte zeigen, dass die rekombinanten MVA-IE1 und MVA-pp65 die ORFs bis zu Passage 17 stabil inseriert haben und stabil exprimieren [Abbildung 15A und B]. Bei MVA-pp65-IE1 wies sie eine Stabilität der ORFs von IE1 und pp65 bis Passage 10 nach [Abbildung 15C].



**Abbildung 15: Stabilität von MVA-IE1, MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1 (von Dr. Yasemin Süzer, Paul-Ehrlich-Institut)**

Die MVA-IE1 und MVA-pp65 wurde in HEFs (A: IE1, B: pp65) bzw. MVA-pp65-IE1 (C, oben: IE1 und pp65 Insert, Mitte: IE1-Protein, unten: pp65-Protein) wurde in HeLa-Zellen für die Proteinexpression im Western Blot mit monoklonalen Antikörpern gegen CMV-pp65 und CMV-IE1 untersucht. Die genetische Stabilität von MVA-IE1 und MVA-pp65 wurde in HEFs bzw. von MVA-pp65-IE1 in HeLa-Zellen mit einer niedrigen Infektionsmultiplizität (MOI) in bis zu 17 Passagen durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR) getestet.

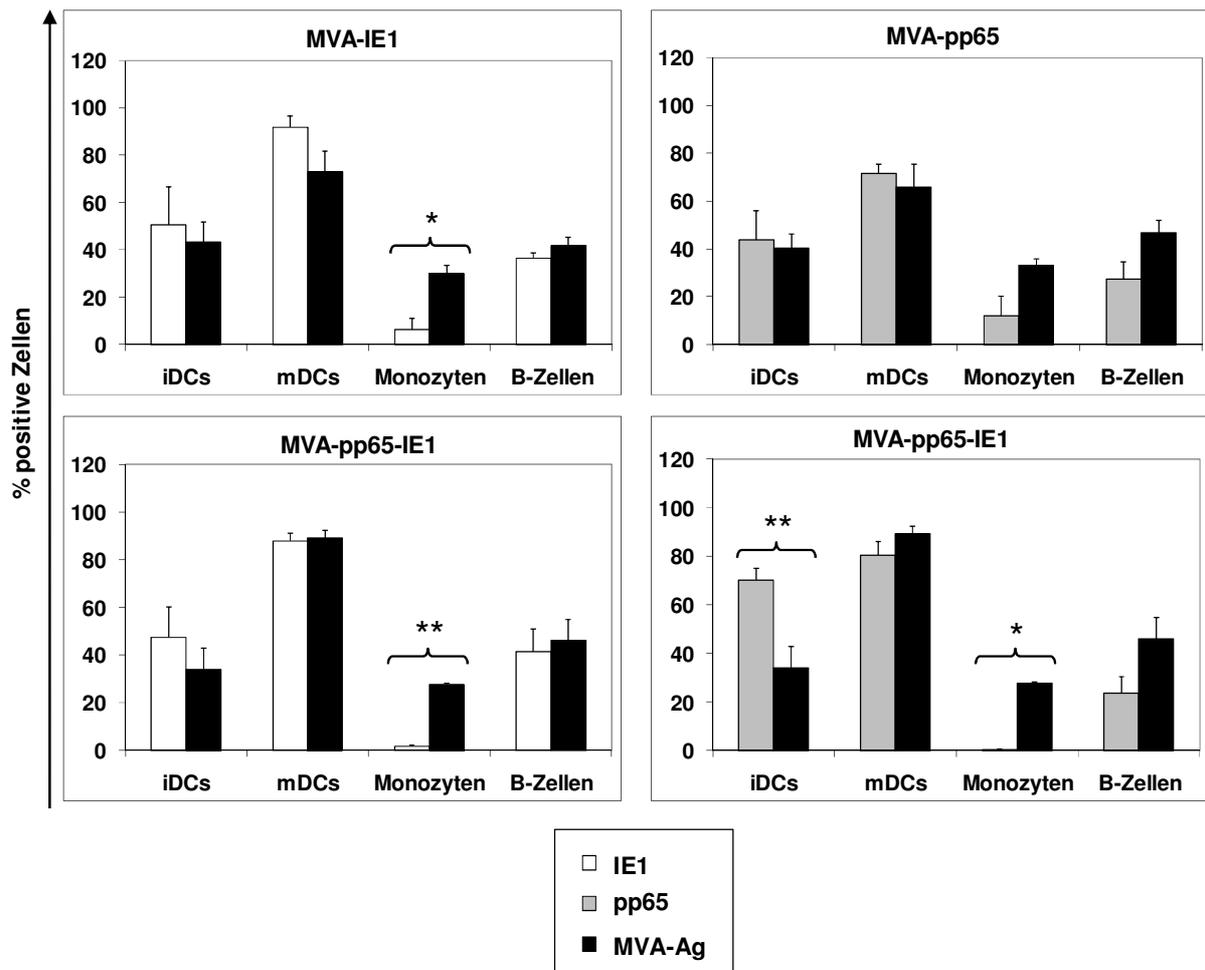
### 3.2.2 Intranukleäre Expression von IE1 und pp65 in APCs nach Infektion mit MVA-IE1, MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1

Nachdem gezeigt wurde, dass MVA bevorzugt APCs infiziert [Abbildung 7], sollte die Expression von IE1 und pp65 nach Infektion mit MVA-IE1, MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1 nachgewiesen werden. Da jedoch beide Proteine ein nukleäres Lokalisationssignal besitzen (Lafemina et al. 1989; Schmolke et al. 1995), war es notwendig eine intranukleäre Färbung durchzuführen. Allerdings standen nur Antikörper für einen Immunfluoreszenz-Test auf Objektträgern zur Verfügung. Um aber eine genaue Quantifizierung der IE1 und pp65 exprimierenden APCs zu ermöglichen, wurde eine intranukleäre Färbung für die Durchflusszytometrie etabliert, die unter 2.2.11 genauer beschrieben ist.

Die höchste IE1-Expression von MVA-IE1 und MVA-pp65-IE1 infizierten APCs konnte in mDCs (>85%) detektiert werden, wohingegen Monozyten die niedrigste Expression (<7%) aufwiesen. B-Zellen (>36%) und iDCs (>47%) zeigten eine mittlere IE1-Expression. Die IE1-Expression korrelierte jeweils sehr gut mit der MVA-Ag-Expression mit Ausnahme für die Monozyten, bei denen die MVA-Ag-Expression (>27%) signifikant höher ( $P < 0,05$ ) war als die IE1-Expression (<7%) [Abbildung 16, links].

Die höchste pp65-Expression von MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1 infizierten APCs konnte ebenfalls in mDCs (>71%), die niedrigste Expression in Monozyten (<12%) und eine moderate Expression in iDCs (>43%) und B-Zellen (>27%) nachgewiesen werden. Die MVA-Ag-Expression war in diesen APCs nicht signifikant unterschiedlich zur pp65-Expression mit Ausnahme der MVA-pp65-IE1 infizierten iDCs (<34%) und Monozyten (>27%). Die pp65-Expression war hier signifikant höher ( $P < 0,05$ ) in den iDCs (70,13%) und signifikant niedriger ( $P < 0,05$ ) in den Monozyten (0,46%) [Abbildung 16, rechts].

Eine zytoplasmatische Expression von IE1 oder pp65 nach Infektion der APCs war nicht nachweisbar oder sehr niedrig [Daten nicht gezeigt].



**Abbildung 16: Intranukleäre Färbung von IE1 und pp65 in APCs nach Infektion mit den verschiedenen MVA-CMV-Stämmen**

APCs wurden mit MVA-IE1, MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1 mit einer MOI=5 infiziert. Nach 24h wurden die Zellen 1% FA für 15 min bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit 90% eiskaltem Methanol für 20 min auf Eis permeabilisiert. Dann wurden die Zellen gewaschen und mit 5% polyklonalen humanen IgG für 15 min bei RT geblockt. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit monoklonalen Antikörpern gegen HCMV pp65 oder HCMV IE1 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit Ziege F(ab')<sub>2</sub> Anti-Maus IgG+IgM FITC oder Ziege Anti-Maus IgG+IgM FITC (siehe 2.1.5) 30 min bei RT inkubiert. Zum Schluss wurden die Zellen gewaschen, mit 1% FA fixiert und im Durchflusszytometer analysiert. Zusätzlich wurde die Expression von MVA-Ag untersucht. Die dargestellten Ergebnisse sind der Durchschnitt von mindestens 3 gesunden Spendern. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Durchschnitts. \* = signifikant ( $P < 0,05$ ), \*\* = hoch signifikant ( $P < 0,01$ )

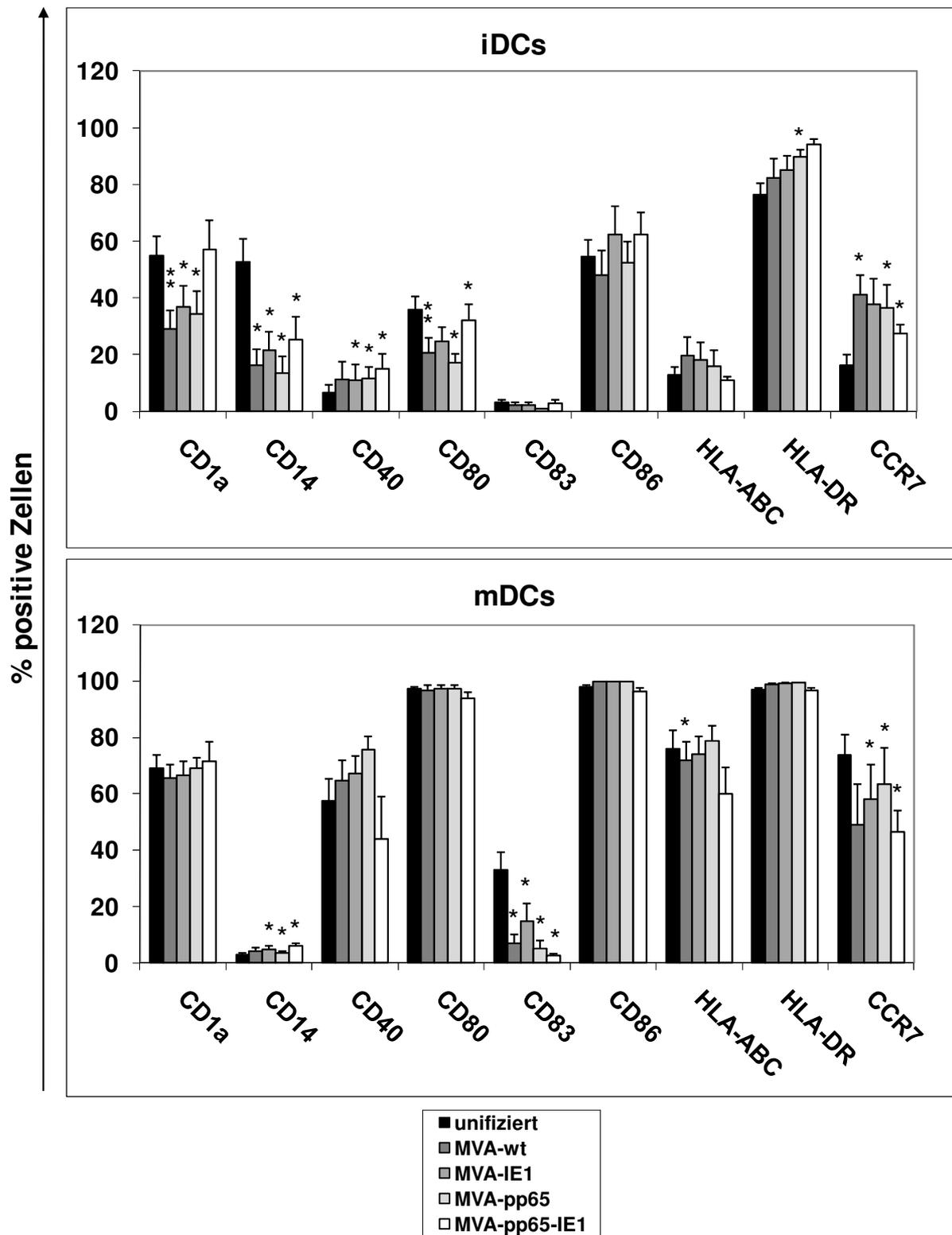
### **3.2.3 Effekte von MVA-IE1, MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1 auf DCs**

Für MVA-wt und MVA-GFP wurden bereits verschiedene Effekte auf APCs bezüglich der Expression von verschiedenen Oberflächenmarkern und Zytokine nachgewiesen [Abbildung 9, links; Abbildung 10]. Da jedoch DCs die bedeutendsten APCs sind wurden die Untersuchungen zu den Effekten von MVA-IE1, MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1 auf DCs beschränkt.

#### **3.2.3.1 Effekte von MVA-IE1, MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1 auf die Oberflächenmoleküle von DCs**

Nach Infektion mit MVA-IE1, MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1 konnten ähnliche Auswirkungen auf iDCs wie nach Infektion mit MVA-wt und MVA-GFP beobachtet werden. CD1a, CD14 und CD80 auf iDCs wurden signifikant reduziert ( $P < 0,05$ ), jedoch wurde CD1a durch MVA-pp65-IE1 nicht reduziert. Desweiteren war die Expression von CD40 und CCR7 signifikant erhöht ( $P < 0,05$ ) [Abbildung 17, oben].

Bezüglich der mDCs hatten die MVA-CMV-Stämme etwas mehr hemmende Eigenschaften als MVA-wt. So war nicht nur CD83 signifikant reduziert ( $P < 0,05$ ) sondern auch CCR7, und CD14 war signifikant erhöht ( $P < 0,05$ ) [Abbildung 17, unten].



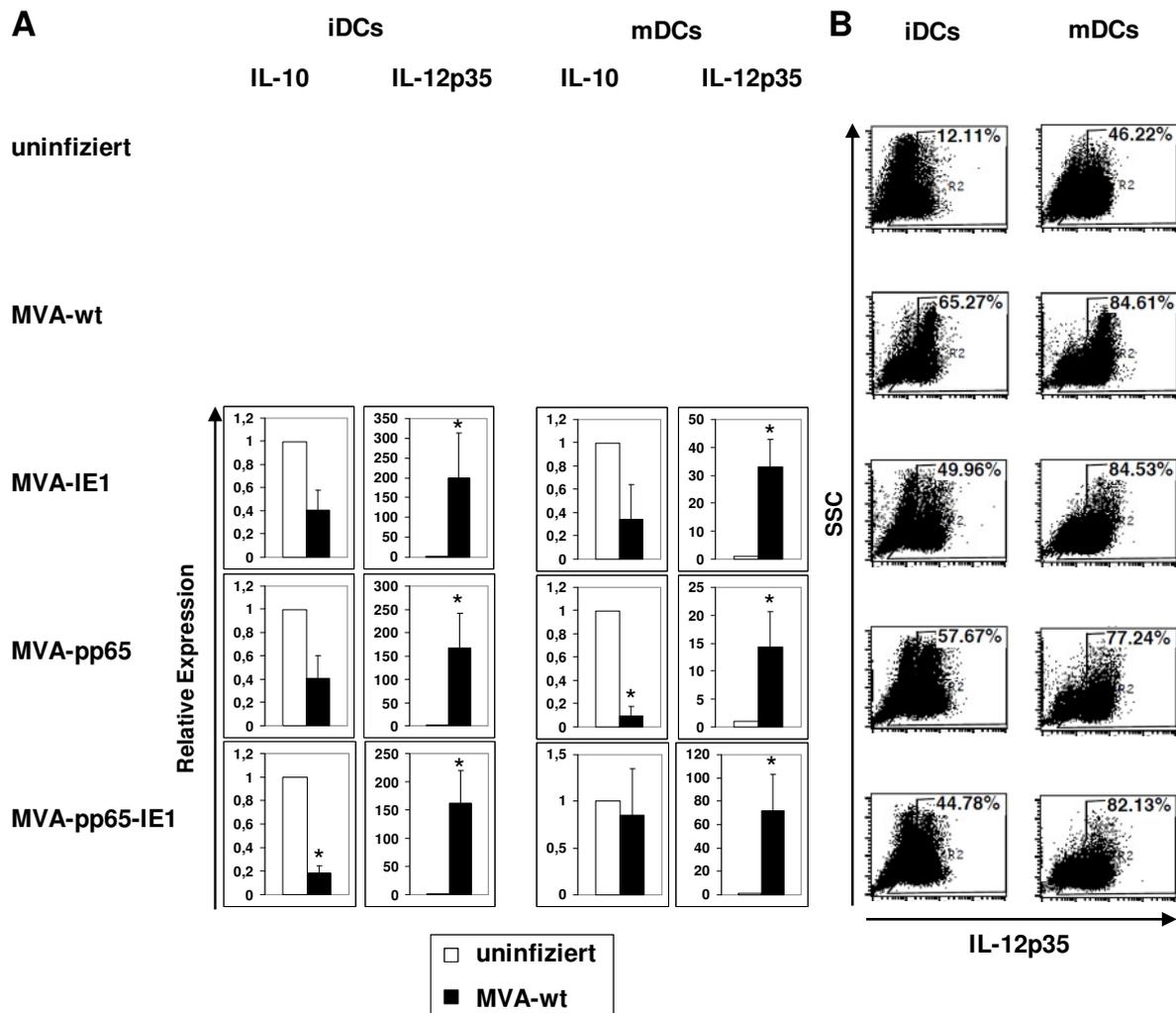
**Abbildung 17: Effekte der MVA-CMV-Stämme auf DCs**

DCs mit MVA-wt, MVA-IE1, MVA-pp65 oder MVA-pp65-IE1 mit einer MOI=5 infiziert, nach 24h für die angegebenen Oberflächenmarker angefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die dargestellten Ergebnisse sind der Durchschnitt von mindestens 5 gesunden Spendern. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Durchschnitts. \* = signifikant ( $P < 0,05$ ), \*\* = hoch signifikant ( $P < 0,01$ )

### 3.2.3.2 Expression von Th1-polarisierendem IL-12 in DCs nach Infektion mit MVA-IE1, MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1

Für MVA-wt konnte bereits eine hoch signifikant verstärkte Expression ( $P < 0,01$ ) der *IL-12p35*-Untereinheit des Th1-polarisierenden IL-12 in DCs nachgewiesen werden, wobei sich die Expression des anti-inflammatorischen *IL-10* nicht signifikant veränderte [Abbildung 10]. Eine Infektion der DCs mit den 3 verschiedenen MVA-CMV-Stämmen rief ebenfalls eine signifikant erhöhte Expression ( $P < 0,05$ ) von IL-12p35 hervor. Darüber hinaus verursachte MVA-pp65-IE1 in iDCs und MVA-pp65 in mDCs sogar eine signifikante Reduktion der IL-10-Expression ( $P < 0,05$ ) [Abbildung 18A].

Zusätzlich wurde die *IL-12p35*-Expression durch eine intrazelluläre Zytokinfärbung überprüft. Dazu wurden die DCs mit MVA-wt, MVA-IE1, MVA-pp65 oder MVA-pp65-IE1 infiziert. 7h nach der Infektion wurde Brefeldin A zu den DCs gegeben. Nach weiteren 16h wurde schließlich IL-12p35 intrazellulär angefärbt und dessen Expression mittels Durchflusszytometrie analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass der Anteil der IL-12p35-positiven iDCs von 12,11% auf mehr als 44,78% und der Anteil der IL-12p35-positiven mDCs von 46,22% auf mehr als 77,24% nach Infektion mit den verschiedenen MVA-Stämmen erhöht wurde [Abbildung 18B].



**Abbildung 18: MVA-IE1, MVA-pp65 und MVA-IE1-pp65 induzieren eine Th1-polarisierende Zytokinexpression in DCs**

(A) DCs wurden mit MVA-IE1, MVA-pp65 oder MVA-pp65-IE1 mit einer MOI=5 infiziert, nach 6h wurde die mRNA isoliert und die Genexpression mittels qRT-PCR analysiert. Die erhaltenen *Crossing Points* (CP) wurden gegen die des *Housekeeping*-Gens hALAS mit folgender Gleichung  $2^{(CP \text{ Zielgen uninfiziert} - CP \text{ Zielgen MVA-infiziert})} / 2^{(CP \text{ hALAS uninfiziert} - CP \text{ hALAS MVA-infiziert})}$  normalisiert. Die dargestellten Ergebnisse sind der Durchschnitt von mindestens 4 gesunden Spendern. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Durchschnitts. \* = signifikant ( $P < 0,05$ ). (B) DCs wurden mit MVA-wt, MVA-IE1, MVA-pp65 oder MVA-pp65-IE1 infiziert. 7h nach der Infektion wurde Brefeldin A zu den DCs gegeben. Nach 16h wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert und mit einem anti-IL-12p35 Antikörper angefärbt. Die Expression von IL-12p35 wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Tote Zellen wurden mittels SSC/FSC ausgeschlossen. Ein anti-Maus-IgG1-Ak diente als Negativkontrolle für das Gate R2. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 3 gesunde Spender.

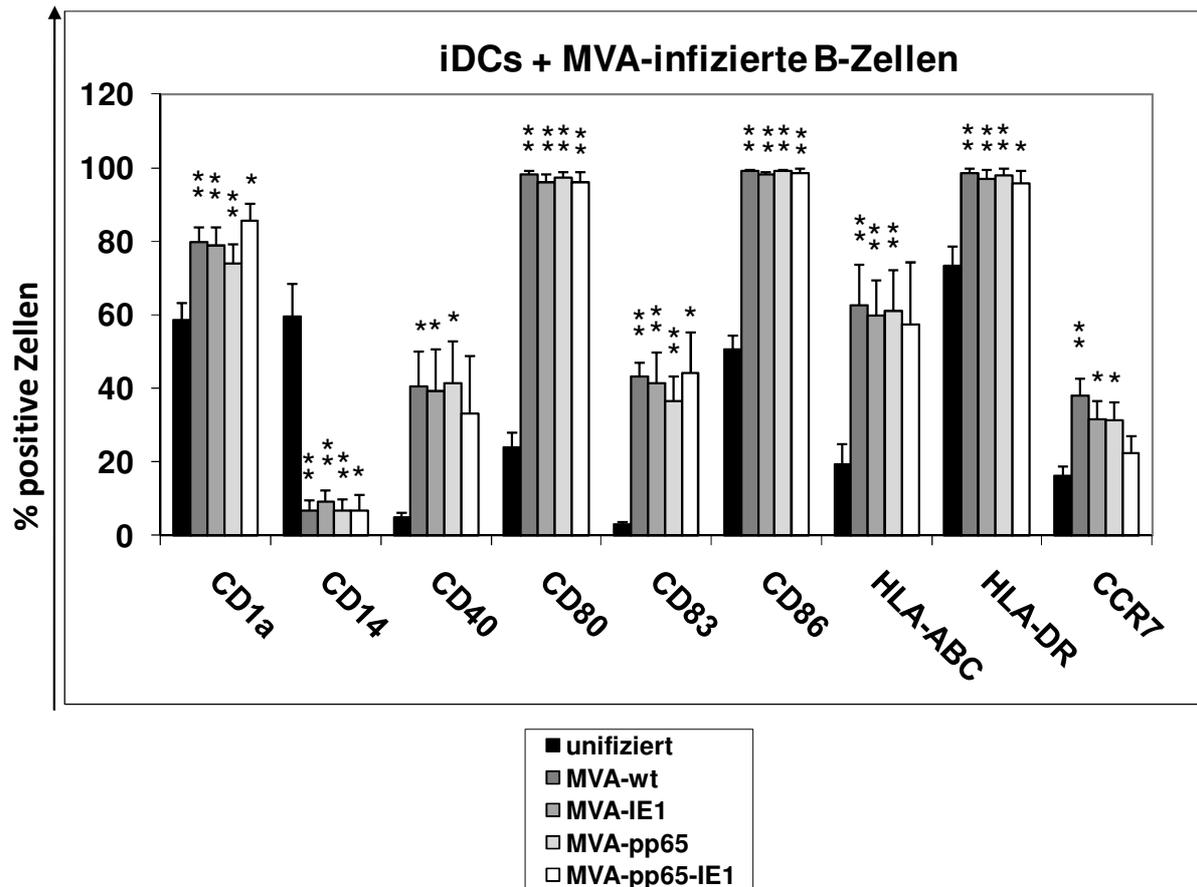
### 3.2.4 Kreuzpräsentation der in MVA kodierten CMV-Antigene

MVA-infizierte DCs wiesen eine hohe Apoptoserate auf [Abbildung 11B]. Zusätzlich war die Expression der kostimulatorischen Moleküle und MHC-Komplexe sowohl nach Infektion mit MVA-wt [Abbildung 9, links] als auch nach Infektion mit den MVA-CMV-Stämmen [Abbildung 17] unzureichend. Eine ausreichende Stimulation von CMV-spezifischen T-Zellen durch direkt infizierte DCs erscheint deshalb unwahrscheinlich. Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass iDCs Partikel von MVA-infizierten, bestrahlten B-Zellen phagozytieren [Abbildung 12] und durch diese Antigenaufnahme vollständig ausreifen [Abbildung 14], was eine Kreuzpräsentation MHC-I-restringierter Antigene möglich macht. Die Effektivität dieser Kreuzpräsentation sollte nun anhand der MVA-CMV-Stämme überprüft werden.

#### 3.2.4.1 Ausreifung von DCs nach Phagozytose von Antigenen MVA-IE1, MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1 infizierter B-Zellen

Nachdem gezeigt wurde, dass iDCs Partikel von MVA-infizierten Zellen aufnehmen [Abbildung 12] und danach weiterhin eine hohe Viabilität erhalten bleibt [Abbildung 13], sollte nach Infektion der B-Zellen mit MVA-IE1, MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1 und anschließender Antigen-Aufnahme durch iDCs die Fähigkeit zur Kostimulation und Antigenpräsentation überprüft werden.

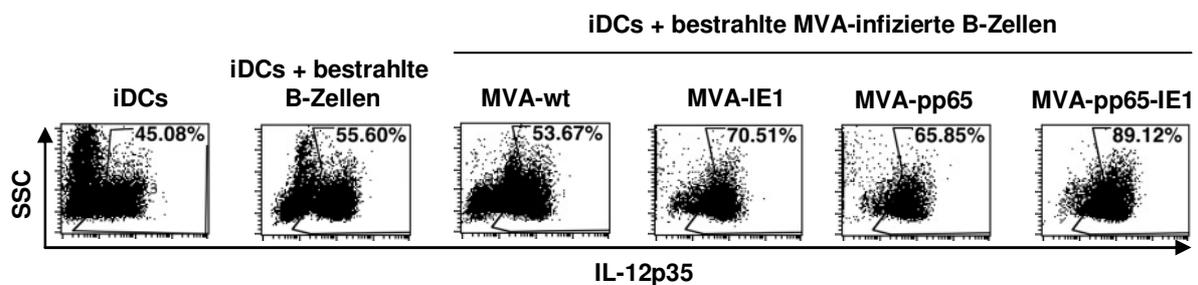
Dazu wurden den iDCs am Tag 4 der Differenzierung MVA-infizierte B-Zellen im Verhältnis 1:6 hinzugegeben und diese für ca. 72h inkubiert. Anschließend wurden die DCs mittels Durchflusszytometrie analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Antigen-Aufnahme von MVA-wt, MVA-IE1, MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1 infizierten B-Zellen eine vollständige Ausreifung der DCs mit verstärkter Expression aller kostimulatorischen Moleküle, MHC-Moleküle und des *Homing*-Markers CCR7 verursachte [Abbildung 19].



**Abbildung 19: Ausreifung der DCs nach Antigen-Aufnahme von MVA-infizierten B-Zellen**

B-Zellen wurden mit MVA-wt, MVA-IE1, MVA-pp65 oder MVA-pp65-IE1 mit einer MOI=5 infiziert. 24h nach der Infektion wurden die B-Zellen bestrahlt und  $5 \times 10^5$  B-Zellen wurden zu  $3 \times 10^6$  iDCs an Tag 4 der DC-Differenzierung gegeben. Nach ca. 72h wurden die DCs geerntet und die Expression der angegebenen Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Neben einer starken Antigenpräsentation und Kostimulation ist für die Generierung von potenten Effektor-T-Zellen ein drittes Signal wie das Th1-polarisierende IL-12 wichtig (Mescher et al. 2006). Es konnte gezeigt werden, dass 45,08% der unbehandelten iDCs IL-12p35 exprimierten. Nach Antigen-Aufnahme von apoptotischen Material sowohl von B-Zellen (Negativkontrolle) als auch von MVA-wt infizierten B-Zellen stieg die Expression von IL-12p35 um ca. 10% an [Abbildung 20]. Dass auch die bestrahlten B-Zellen eine leichte Erhöhung der IL-12p35-Expression hervorriefen, lässt sich damit begründen, dass die Aufnahme von apoptotischen Material generell eine Aktivierung von DCs induziert. Die Expression von IL-12p35 wurde allerdings durch Antigen-Aufnahme von MVA-IE1, MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1 infizierten B-Zellen noch weiter gesteigert [Abbildung 20].



**Abbildung 20: IL-12p35 Expression in iDCs nach Antigen-Aufnahme von MVA-infizierten B-Zellen**  
 B-Zellen wurden mit MVA-wt, MVA-IE1, MVA-pp65 oder MVA-pp65-IE1 mit einer MOI=5 infiziert. 24h nach der Infektion wurden die B-Zellen bestrahlt und  $5 \times 10^5$  B-Zellen wurden zu  $3 \times 10^6$  iDCs an Tag 4 der DC-Differenzierung gegeben und 72h kokultiviert. Die letzten 16h wurde Brefeldin A hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert und mit einem anti-IL-12p35 Antikörper angefärbt. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem anti-CD19-Antikörper angefärbt um die B-Zellen auszuschließen. Die Expression von IL-12p35 wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 3 gesunde Spender.

### 3.2.4.2 Expansion CMV spezifischer T-Zellen mittels Kreuzpräsentation

Zur Überprüfung der Kapazität der ausgereiften DCs zur Expansion von IE1- und pp65-spezifischen T-Zellen mittels Kreuzpräsentation wurden die PBMCs von 4 gesunden CMV-positiven Pocken-geimpften HLA-A0201- und/oder HLA-B0702-positiven Spendern evaluiert. Dazu wurden iDCs 1:6 mit autologen B-Zellen inkubiert, die mit den MVA-CMV-Stämmen oder MVA-wt als Kontrolle infiziert wurden. Nach ca. 72h wurden die so ausgereiften DCs geerntet und 1:5 mit autologen CD14<sup>-</sup>/CD20<sup>-</sup> PBMCs kokultiviert. Ab Tag 3 der Kokultur wurde jeden zweiten Tag die Hälfte des Medium unter Zugabe von IL-2 ausgetauscht. Am Tag 14 der Kokultur wurden die T-Zellen geerntet. Ein Teil der T-Zellen wurde sofort für CMV-pp65-Tetramer-spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen [Abbildung 21A] und zur Bestimmung der Gedächtnis-T-Zell-Populationen [Abbildung 21B] angefärbt. Der andere Teil der T-Zellen wurde über Nacht ohne IL-2 weiter kultiviert und anschließend mit IE1- und pp65-Peptid-Mixen restimuliert. Zur Kontrolle einer Immunantwort gegen den Vektor MVA wurde mit einem Peptid-Mix des Host-Range-Proteins 2 (MVA-018L), welches ein stark konserviertes Pockenvirus-Epitop enthält (Terajima et al. 2003), restimuliert. Alle Peptide hatten eine Länge von 15 Aminosäuren, somit war eine gleichzeitige Restimulation von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen möglich [Abbildung 22].

Die pp65-Tetramer-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wurden bei Spender 1 (HLA-B0702<sup>+</sup>) von 2,48% auf 28,01%, bei Spender 2 (HLA-B0702<sup>+</sup>, HLA-A0201<sup>+</sup>) von 0,86% auf 18,68% bzw. von 0,11% auf 0,68% und bei Spender 3 (HLA-A0201<sup>+</sup>) von 6,01% auf 28,37% expandiert [Abbildung 21A].

Die Verteilung der Gedächtnis-T-Zell-Populationen unter den CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wird hier am Beispiel des Spenders 1 dargestellt. Vor der Stimulation mit den verschiedenen MVA-Stämmen enthielten die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen 4 verschiedene Populationen, die mit der Beschreibung von Sallusto et al. (Sallusto et al. 1999; Sallusto et al. 2004): CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> = *naïve* T-Zellen (NA), CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup> = zentrale Gedächtnis-Zellen (CM), CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> = Effektor-Gedächtnis-Zellen (EM) und CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> = terminale/späte Effektor-Gedächtnis-Zellen (EMRA). In Spender 1 war der Anteil der unstimulierten CD14<sup>-</sup>/CD20<sup>-</sup> PBMCs folgendermaßen verteilt: 23,13% NA, 13,66% CM, 36,14% EM und 27,07% EMRA CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Es ist bekannt, dass CMV-spezifische T-Zellen in CMV-positiven Spendern hauptsächlich EMRA CD8<sup>+</sup>-T-Zellen sind (Appay et al. 2002), was durch das *Gating* unstimulierter pp65-Tetramer-positiver CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bestätigt werden konnte [Daten nicht gezeigt].

Nach der Expansion der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch Kreuzpräsentation der in MVA-IE1, MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1 kodierten Antigene waren die NA (7,85%-3,05%) und EMRA (5,86%-2,49%) CD8<sup>+</sup>-T-Zellen stark reduziert, wohingegen die EM CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (69,34%-78,68%) stark vermehrt wurden und die CM CD8<sup>+</sup>-T-Zellen unverändert blieben [Abbildung 21B, oben].

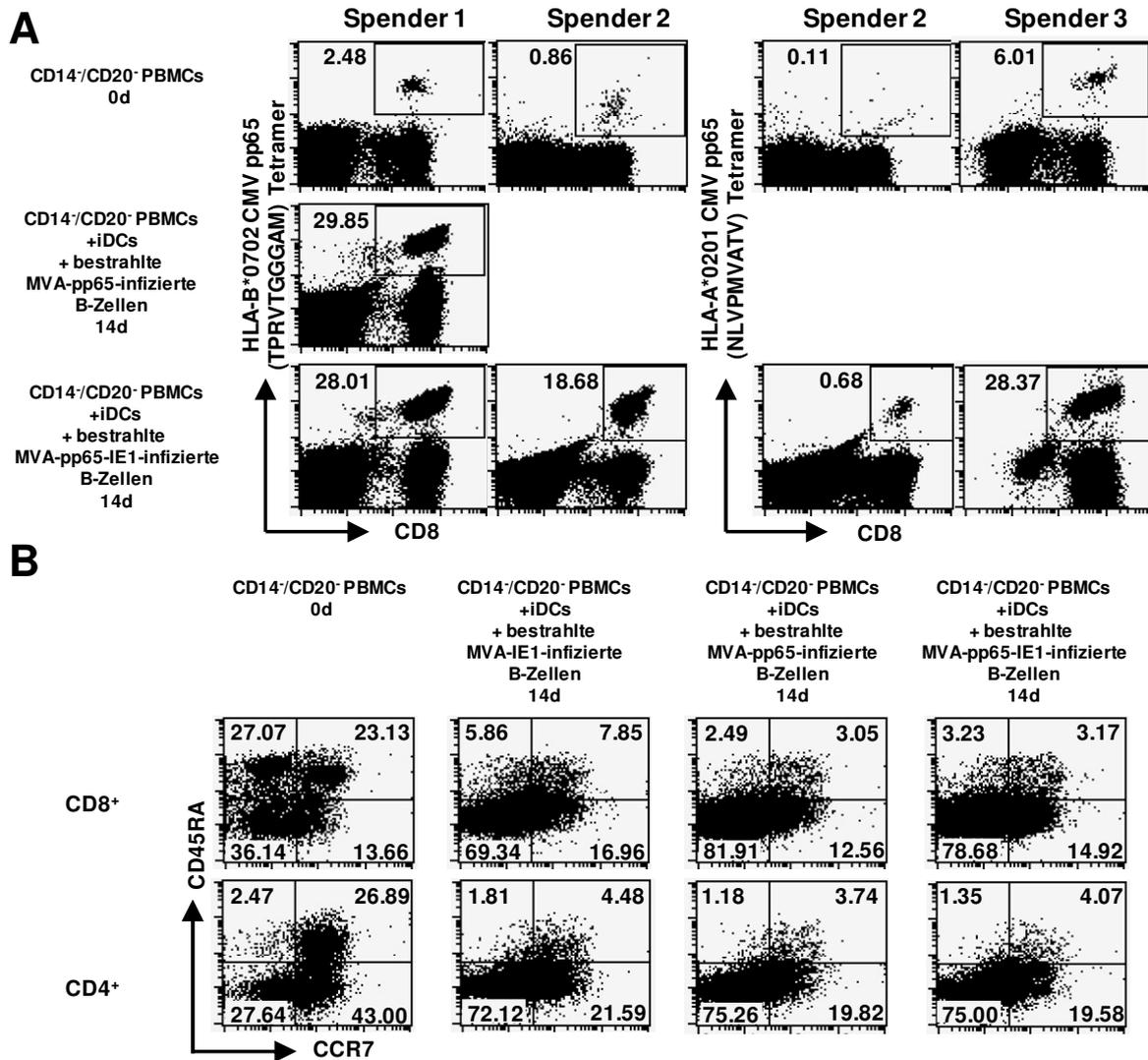
Die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen bestanden vor der Stimulation aus 3 verschiedenen Populationen: NA mit 26,89%, CM mit 43,00% und EM mit 27,64%. Nach der Expansion waren die NA CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (4,48%-3,74%) ebenfalls wie die NA CD8<sup>+</sup>-T-Zellen stark reduziert, und auch die EM CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (72,12%-75,26%) waren stark vermehrt wie die EM CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, aber im Gegensatz zu den CM CD8<sup>+</sup>-T-Zellen waren die CM CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (21,59%-19,58%) stark reduziert [Abbildung 21B, unten].

Die Expansion der pp65-spezifischen T-Zellen wurde durch Restimulation mit dem pp65-Peptid-Mix in allen 4 Spendern untersucht, dagegen wurde die Restimulation mit dem IE1-Peptid-Mix nur bei Spender 1,2 und 4 durchgeführt. Dabei konnte eine Expansion der IE1-spezifischen T-Zellen nur bei Spender 1 und 2 detektiert werden. Die Ergebnisse sind hier wieder am Beispiel von Spender 1 dargestellt.

Nach der Restimulation der T-Zellen von Spender 1 mit den Peptid-Mixen konnte gezeigt werden, dass die IE1-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, die vor der Stimulation einen Anteil von 0,12% ausmachten, mittels Kreuzpräsentation von MVA-IE1-kodierten Antigenen auf 13,95% und von MVA-pp65-IE1-kodierten Antigenen auf 2,24% expandiert werden konnten. Desweiteren konnten die pp65-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, die vor der Stimulation einen Anteil von 1,18% betrugten, mittels Kreuzpräsentation von MVA-pp65-kodierten Antigenen auf 72,76% und von MVA-pp65-IE1-kodierten Antigenen auf 58,98% expandiert werden [Abbildung 22, oben].

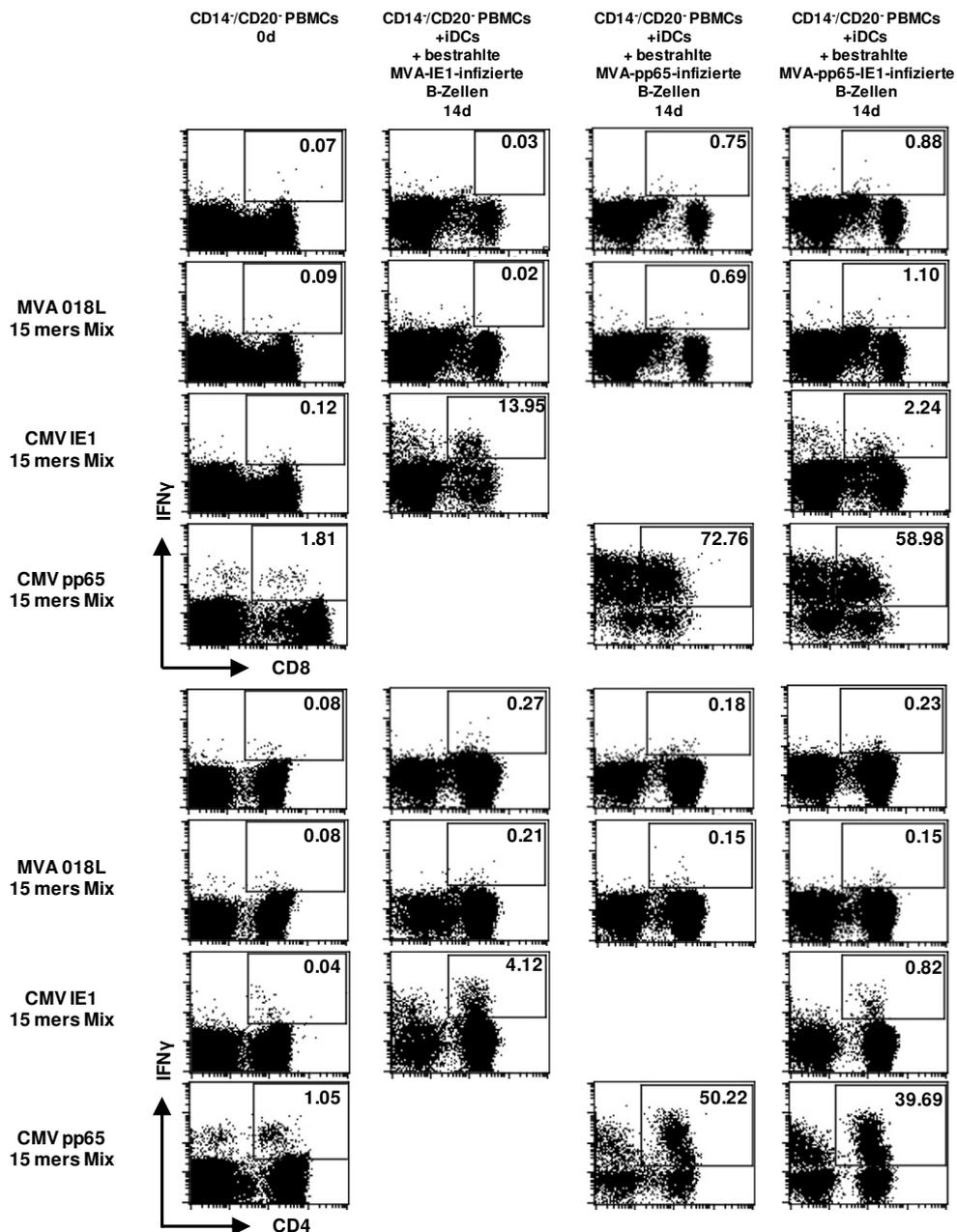
Die IE1-spezifischen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, die vor der Stimulation einen Anteil von 0,04% ergaben, konnten durch MVA-IE1 auf 4,12% und durch MVA-pp65-IE1 auf 2,24% expandiert werden. Ebenso konnten die pp65-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, die vor der Stimulation einen Anteil von 1,05% ausmachten, durch MVA-pp65 auf 50,22% und durch MVA-pp65-IE1-kodierten Antigenen auf 39,69% expandiert werden [Abbildung 22, unten].

Obwohl alle Spender gegen Pocken geimpft waren, konnten weder mit MVA-wt noch mit den MVA-CMV-Stämmen MVA-spezifische T-Zellen expandiert werden. Die T-Zellen zeigten nach Restimulation mit dem MVA-018L-Peptid-Mix oder MVA-wt-infizierten PBMCs keine IFN $\gamma$ -Expression [Abbildung 22; Daten nicht gezeigt].



**Abbildung 21: Expansion CMV-spezifischer T-Zellen mittels Kreuzpräsentation**

iDCs wurden mit MVA-wt, MVA-IE1, MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1 infizierten B-Zellen inkubiert. Nach 72h wurden die ausgereiften DCs geerntet und 1:5 mit autlogen CD14<sup>+</sup>/CD29<sup>-</sup> PBMCs eines CMV positiven pockengeimpften Spenders kokultiviert. An Tag 3 wurden die Hälfte des Mediums ausgetauscht und IL-2 hinzugegeben und dann jeden 2 Tag. An Tag 14 der Kokultur wurden die T-Zellen geerntet. Die T-Zellen wurden sofort mit anti-CD3, -CD8, -CD45RA, -CCR7 Antikörpern, Isotypkontrollen (A) und abhängig vom HLA-Typ des Spenders, mit with HLA-A\*0201 CMV pp65 (NLVPMVATV) Tetramer und/oder HLA-B\*0702 CMV pp65 (TPRVTGGGAM) Tetramer angefärbt (B) und im Durchflusszytometer analysiert. Der Anteil der CMV-pp65-Tetramer positiven CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ist oben links angegeben.



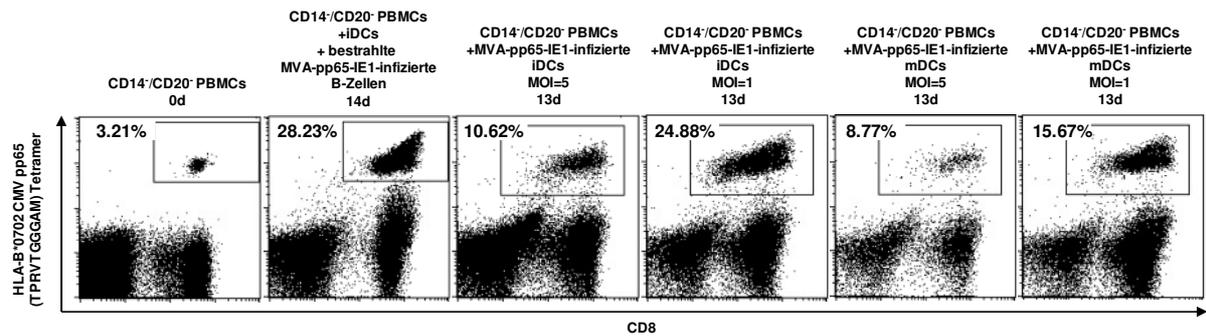
**Abbildung 22: Restimulation der CMV-spezifischer T-Zellen nach Expansion mittels Kreuzpräsentation**

iDCs wurden mit MVA-wt, MVA-IE1, MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1 infizierten B-Zellen inkubiert. Nach 72h wurden die ausgereiften DCs geerntet und 1:5 mit autologen CD14<sup>+</sup>/CD29<sup>-</sup> PBMCs eines CMV positiven pockengeimpften Spenders kokultiviert. An Tag 3 wurden die Hälfte des Mediums ausgetauscht und IL-2 hinzugegeben und dann jeden 2 Tag. An Tag 14 der Kokultur wurden die T-Zellen geerntet. Die T-Zellen wurden über Nacht ohne IL-2 weiterkultiviert. Danach wurden die T-Zellen mit MVA-018L, pp65 oder IE1 Peptidmischen restimuliert. 1h nach Zugabe der Peptidmische wurden Brefeldin A hinzugefügt. Nach 16h wurden die T-Zellen geerntet, fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden die T-Zellen für IFN $\gamma$ , CD3, CD4 und CD8 angefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Der Anteil der IFN $\gamma$ -positiven CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bzw. CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ist oben rechts angegeben. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 4 gesunde Spender.

### 3.2.4.3 Eine Infektion von DCs mit MVA bei niedriger MOI führt zur Kreuzpräsentation durch uninfizierte *Bystander*-DCs

Das hier beschriebene Modell der Kreuzpräsentation von MVA-kodierten Antigenen aus MVA-infizierten B-Zellen müsste theoretisch auch bei einer Infektion DCs mit einer niedrigen MOI zu beobachten sein. Hier müssten die nicht infizierten *Bystander*-DCs apoptotisches Material von MVA-infizierten DCs phagozytieren und anschließend kreuzpräsentieren.

Um dies nachzuweisen, wurden CD14<sup>+</sup>/CD20<sup>-</sup> PBMCs von Spender 1 parallel mit autologen DCs kokultiviert, die entweder CMV-Antigene von MVA-pp65-IE1-infizierten B-Zellen aufgenommen hatten oder direkt mit MVA-pp65-IE1 bei einer MOI=1 bzw. MOI=5 infiziert wurden. Ab Tag 3 der Kokultur wurde jeden zweiten Tag die Hälfte des Medium unter Zugabe von IL-2 ausgetauscht. Am Tag 14 bzw. 13 der Kokultur wurden die T-Zellen geerntet und der Anteil der CMV-pp65-Tetramer-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt [Abbildung 23]. Hierbei konnte durch Kreuzpräsentation von CMV-Antigenen aus MVA-infizierten B-Zellen die pp65-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen von 3,21% auf 28,23% expandieren, was den Wert in Abbildung 21A bestätigte. Mit 24,88% wurde ein ähnlich hoher Wert bei den CD8<sup>+</sup>-T-Zellen erreicht, welche mit iDCs kokultiviert wurden, die mit MVA-pp65-IE1 bei einer MOI=1 infiziert wurden. Dagegen war bei einer MOI=5 die Anzahl der pp65-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen um mehr als die Hälfte niedriger (10,62%). Die Kokultur mit mDCs, die mit einer MOI=5 infiziert wurden, konnte die pp65-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nur auf 8,77% expandieren. Bei einer MOI=1 war der Anteil der pp65-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen fast 10% niedriger als bei der Kokultur mit iDCs bei gleicher MOI [Abbildung 23].



**Abbildung 23: Nachweis der Kreuzpräsentation bei iDCs, die bei niedriger MOI mit MVA-pp65-IE1 infiziert wurden, durch Expansion pp65-spezifischer CD8<sup>+</sup>-T-Zellen**

iDCs wurden mit MVA-pp65-IE1 infizierten B-Zellen inkubiert. Nach 72h wurden die ausgereiften DCs geerntet und 1:5 mit autologen CD14<sup>+</sup>/CD29<sup>-</sup> PBMCs eines CMV positiven pockengeimpften Spenders kokultiviert. Oder iDCs und mDCs wurden an Tag 9 der Differenzierung geerntet, mit MVA-pp65-IE bei MOI=1 oder MOI=5 infiziert und nach 24h 1:5 zu autologen CD14<sup>+</sup>/CD29<sup>-</sup> PBMCs gegeben. An Tag 3 wurden die Hälfte des Mediums ausgetauscht und IL-2 hinzugegeben und dann jeden 2 Tag. An Tag 14 der Kokultur wurden die T-Zellen geerntet. Anschließend wurden die T-Zellen mit anti-CD3 und -CD8-Antikörpern sowie HLA-B\*0702 CMV pp65 (TPRVTGGGAM) Tetramer angefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Der Anteil der HLA-B\*0702 CMV pp65 (TPRVTGGGAM) Tetramer positiven CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ist oben links angegeben.

## 4 Diskussion

Eine CMV-Infektion ist heute immer noch eine lebensbedrohliche Komplikation für immunsupprimierte Patienten und Patienten nach allogener SCT. Gewiss hat die Verfügbarkeit von verschiedenen antiviralen Medikamenten wie Ganciclovir die Prognose für Patienten verbessert, aber CMV bleibt die Ursache für eine erhebliche Morbidität und Mortalität. Die Entwicklung eines CMV-Vakzins mit effektiver Stimulation der zellulären Immunantwort wäre am geeignetsten um eine CMV-Reaktivierung oder Infektion zu kontrollieren und gleichzeitig die schweren Nebenwirkungen einer antiviralen Therapie zu umgehen.

### 4.1 Tropismus von MVA

Bezüglich des Tropismus von MVA konnte nachgewiesen werden, dass MVA hauptsächlich APCs (DCs, Monozyten, B-Zellen) infiziert, gefolgt von NK-Zellen. Diese Ergebnisse lassen sich durch die Daten von Chahroudi et al. (Chahroudi et al. 2005) bestätigen, sie zeigten, dass MVA bevorzugt Monozyten und B-Zellen infiziert. Dagegen wiesen Sanchez-Puig et al. (Sanchez-Puig et al. 2004) eine sehr viel geringere Infektionsrate von B-Zellen nach. Auch innerhalb muriner Leukozyten konnte nur eine geringe MVA-Infektion von B-Zellen gezeigt werden (L. Liu et al. 2008). Jedoch konnte wiederum bei einer humanen EBV-transformierten B-Zell-Linie eine hohe MVA-Infektionsrate demonstriert werden (La Rosa et al. 2006). Desweiteren wurde auch mehrfach eine hohe Infektionsrate von aus Monozyten generierten DCs durch MVA dargestellt (Chahroudi et al. 2006; Drillien et al. 2004; Kastenmuller et al. 2006).

Innerhalb der PBMCs waren jedoch bei einigen Zellpopulationen weniger Zellen GFP-positiv als MVA-Ag-positiv, was vermutlich auf unterschiedliche Expressionslevel oder Adhärenz von Viruspartikeln an der Außenseite der Zellmembran zurückzuführen ist. Dagegen zeigten Monozyten eine viel höhere GFP-Expression als MVA-Ag-Expression nach der Infektion von PBMCs, und sie zeigten auch eine deutlich höhere GFP-Expression, wenn die kompletten PBMCs anstelle der einzeln isolierten Populationen mit MVA infiziert wurden. Es konnte nachgewiesen werden, dass dieses Phänomen durch die Phagozytose von anderen MVA-GFP infizierten PBMCs bedingt ist.

## 4.2 Immunogenität von MVA

Nachdem gezeigt wurde, dass APCs innerhalb der Leukozyten bevorzugt von MVA infiziert werden, wurden die Effekte von MVA auf die Oberflächenmoleküle und die Zytokinexpression untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass MVA Monozyten stark und DCs hingegen nur unvollständig aktiviert.

Die Expression von *CXCL10*, *TNF $\alpha$* , *IL-6*, und der IL-12p70-Untereinheit *IL-12p35* war signifikant ( $p < 0.05$ ) erhöht in den APCs nach Infektion mit MVA-wt. Die Hochregulierung von den proinflammatorischen Zytokinen *TNF $\alpha$*  und *IL-6* wurde bereits für iDCs (Drillien et al. 2004; Guerra et al. 2007), Monozyten (Lehmann et al. 2009), Vollblut und auch in einem Mausmodell (Delaloye et al. 2009; Ramirez et al. 2000) nach MVA-Infektion beschrieben. *IL-6* in Kombination mit *TGF $\beta$*  führt zu einer Differenzierung der  $CD4^+$ -T-Zellen in Richtung Th17-Zellen (Zhu und Paul 2008). Dieser Signalweg wird durch das Th1-polarisierende Zytokin IL-12p70 (Zhu und Paul 2008) inhibiert, welches wiederum auch eine Th2-Polarisierung hemmt. Für die Sekretion von funktionellem IL-12p70 ist die Expression der beiden Untereinheiten p35 und p40 essentiell (Snijders et al. 1996). Andere Autoren (Delaloye et al. 2009; Guerra et al. 2007) haben die verstärkte Expression von *IL-12p40* in MVA-infizierten humanen iDCs sowie in einem Mausmodell nachgewiesen, jedoch ist die *p40*-Expression nicht ausreichend für eine IL-12p70-Sekretion. Homodimere oder Monomere von p40 können sogar die Bindung von IL-12p70 an seinen Rezeptor behindern und eine Th2-Polarisierung induzieren (Kalinski et al. 2001; Ling et al. 1995; Mattner et al. 1993). Außerdem kann p40 zusammen mit p19 auch als Untereinheit von IL-23 dienen (Oppmann et al. 2000). Deshalb ist der Nachweis einer erhöhten IL-12p35-Expression besser geeignet um eine Th1-Polarisierung vorherzusagen, was in dieser Arbeit gelang. Des Weiteren wurde gezeigt, dass *CXCL10* ebenfalls Th1-polarisierend wirkt und eine Th2-Polarisierung hemmt (Romagnani et al. 2005). Eine verstärkte *CXCL10*-Expression nach Infektion mit MVA wurde auch für iDCs (Drillien et al. 2004), Monozyten (Lehmann et al. 2009) und Vollblut (Delaloye et al. 2009) beschrieben. Ein weiterer Nachweis für den Th1-polarisierenden Charakter von MVA bringt die Beobachtung der immuninhibitorischen Effekte auf B-Zellen: erstmals konnte hier demonstriert werden, dass MVA eine signifikante Reduktion ( $P < 0.05$ ) von *CD25*, *CD80*, *CD68* sowie *IL-1 $\beta$*  bei B-Zellen induziert. Eine reduzierte Expression von *IL-1 $\beta$*  durch MVA bei iDCs wurde auch von Guerra et al. beschrieben (Guerra et al. 2007). In Mausmodellen ist *IL-1 $\beta$*  essentiell für die Antikörperproduktion (Boraschi et al. 1990)

und trägt zur Th2-Polarisierung bei (Johnson et al. 2005; C. C. Wang et al. 2006). Zusätzlich steuert IL-1 $\beta$  auch einer Th17-Differenzierung bei (Annunziato und Romagnani 2009). Darüber hinaus konnte die Th1-polarisierende Kapazität von MVA auch in einem Mausmodell bestätigt werden (Ramirez et al. 2000). Nach Infektion von DCs mit MVA-IE1, MVA-pp65 oder MVA-pp65-IE1 konnte ebenfalls eine signifikant ( $P < 0.05$ ) verstärkte *IL-12p35*-mRNA-Expression nachgewiesen werden, welche durch eine intrazelluläre Zytokinfärbung verifiziert wurde. Zum Teil wurde sogar die *IL-10*-Expression signifikant ( $P < 0.05$ ) reduziert.

Allerdings zeigten die DCs im Gegensatz zu den Monozyten nach Infektion MVA-wt und MVA-GFP sowie mit den MVA-CMV-Vakzinkandidaten eine unzureichende Expression von kostimulatorischen Molekülen und MHC-Komplexen und starben zudem auch schnell durch Apoptose. Da die DCs die bedeutendsten APCs sind, schien somit eine ausreichende T-Zellstimulation unwahrscheinlich. Eine frühe Apoptose von DCs nach Infektion mit MVA wurde auch von Guerra et al. beobachtet (Guerra et al. 2007). Insbesondere scheinen iDCs anfälliger für eine Apoptose zu sein als mDCs (Kastenmuller et al. 2006). Ein schneller Zelltod kann die Antigenexpression limitieren und somit die Induktion einer spezifischen Immunantwort gegen MVA-kodierte Antigene behindern. Darüber hinaus kann Apoptose zu einer direkten Immunsuppression führen.

Andererseits kann Apoptose auch wünschenswert sein für die Antigenaufnahme und Kreuzpräsentation durch uninfizierte APCs. Das letztere scheint der Fall zu sein, da MVA trotz der frühen Apoptose von APCs eine hohe Immunogenität besitzt. Die Kreuzpräsentation von MVA-kodierten Antigenen wurde bereits mehrfach beschrieben (Drillien et al. 2004; Gasteiger et al. 2007; Greiner et al. 2006; L. Liu et al. 2008). Auch die Kreuzpräsentation von CMV-Antigenen wurde mehrfach bestätigt (Arrode et al. 2000; Mandron et al. 2008). Um dieses Phänomen genauer zu untersuchen, wurden MVA-infizierte bestrahlte B-Zellen zu iDCs an Tag 4 der Differenzierung hinzugegeben. So konnte gezeigt werden, dass Partikel von MVA-GFP-infizierten B-Zellen durch iDCs phagozytiert wurden. Darüber hinaus induzierten MVA-wt-, MVA-IE1-, MVA-pp65- und MVA-pp65-IE1-infizierte B-Zellen innerhalb von 3 Tagen eine vollständige Ausreifung der DCs mit einer Reduktion von CD14 und einer erhöhten Expression der kostimulatorischen Moleküle, MHC-Komplexe und dem Lymphknoten-*Homing*-Marker CCR7. Diese Effekte gingen einher mit einer erhöhten *IL-12p35*-Expression und einer reduzierten Apoptoserate der iDCs im Vergleich zu direkt

infizierten iDCs. IL-12 ist neben einer starken Antigenpräsentation und Kostimulation essentiell für die Generierung von potenten Effektor-T-Zellantworten und die Vermeidung von Apoptose und/oder Toleranzinduktion (Mescher et al. 2006).

Die DCs, die durch die Antigenaufnahme von B-Zellen, welche mit den MVA-CMV-Vakzinkandidaten infiziert wurden, reiften komplett aus und konnten CMV-spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch Kreuzpräsentation erfolgreich stimulieren und expandieren. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass DCs, die mit MVA-pp65-IE1 bei MOI=1 infiziert wurden, deutlich mehr HLA-B\*0702 CMV pp65 (TPRVTGGGAM) Tetramer positive CD8<sup>+</sup>-T-Zellen mittels Kreuzpräsentation durch uninfizierte *Bystander*-DCs expandieren konnten als bei einer MOI=5.

Nörder et al. (Nörder et al. 2010) scheinen diese Ergebnisse widerzuspiegeln, da sie die höchste Expression von CD80, CD86, MHC I- und MHC II-Molekülen bei MOI=0,5 nachwies im Vergleich zu MOI=5, wo die Expression Moleküle sogar reduziert war. Außerdem konnten sie zeigen, dass die Infektion von murinen DCs mit einer MOI=0,5 die Kreuzpräsentation von OVA-Protein zur Stimulation von OT-I-restringierten CD8<sup>+</sup>-T-Zellen fördert. Dieses Phänomen lässt sich durch die hier gezeigten Ergebnisse erklären. Es wird vermutet, dass uninfizierte *Bystander*-iDCs apoptotisches Material von MVA-infizierten iDCs phagozytieren und anschließend kostimulatorische Moleküle und MHC-Komplexe durch die Antigenaufnahme verstärkt exprimiert haben. Höhere MOIs schwächen diesen Effekt möglicherweise ab, wegen einer höheren Apoptoserate und somit einer geringeren Anzahl von phagozytierenden DCs. Drillien et al. konnte ebenfalls einen Anstieg von CD86 auf DCs in einem ähnlichen Experiment mit MVA-infizierten HeLa-Zellen, die den DCs an Tag 5-6 der Differenzierung hinzugegeben wurden, demonstrieren (Drillien et al. 2004). Kürzlich wurde auch von Pascutti et al. (Pascutti et al. 2011) nachgewiesen, dass bei einer Infektion von iDCs mit MVA bei einer niedrigen MOI die *Bystander*-DCs durch Phagozytose von apoptotischen DCs ausreifen und spezifisch T-Zellen stimulieren können. Ein weiteres Beispiel für die durch MVA begünstigte Kreuzpräsentation konnten Greiner et al. (Greiner et al. 2006) aufzeigen. Sie bewiesen, dass MVA-infizierte Melanomzellen apoptotisch werden und von iDCs phagozytiert, welche anschließend erfolgreich Melanom-spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen induzieren konnten. Die Aufnahme von Antigenen von MVA-infizierten Zellen durch iDCs sowie die anschließende Kreuzpräsentation zu CD8<sup>+</sup>-T-Zellen scheint also ein genereller Mechanismus zu sein.

Neben den IE1- und pp65-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wurden IE1- und pp65-spezifische CD4<sup>+</sup>-T-Zellen expandiert, welche klassisch durch exogene Antigene über die MHC-II-Moleküle stimuliert wurden. Jedoch wurden die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in einem geringeren Ausmaß als die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen expandiert. Eine effiziente Stimulation von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ist notwendig um IL-2 für die klonale Expansion und Ansprechbarkeit von CMV-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zur Verfügung zu stellen, wenn das Antigen nach der initialen Expansion der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nicht beseitigt wurde, andernfalls würden die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen anergisch werden (Mescher et al. 2006).

Darüber hinaus war der Anteil der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, die auf eine Restimulation mit dem pp65-Peptidmix ansprachen wesentlich höher als der Anteil der HLA-A\*0201 CMV pp65 (NLVPMVATV) Tetramer und HLA-B\*0702 CMV pp65 (TPRVTGGGAM) Tetramer positiven CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Das bedeutet, dass die pp65-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nicht nur HLA-A\*0201- und HLA-B\*0702-Epitope erkennen sondern auch andere Epitope, wodurch die MVA-CMV-Vakzinkandidaten unabhängig vom HLA-Typ eingesetzt werden können.

Im Vergleich zu den pp65-spezifischen T-Zellen wurden die IE1-spezifischen T-Zellen in einem geringeren Ausmaß expandiert. Jedoch gab es keinen signifikanten Unterschied in der Expression von IE1 und pp65 in B-Zellen, welche nach Infektion mit MVA-IE1 bzw. MVA-pp65 als Antigenquelle für die Kreuzpräsentation dienten. Die IE1-Expression war sogar signifikant höher als pp65 in MVA-pp65-IE1-infizierten B-Zellen. Es ist bekannt, dass pp65 in den meisten Individuen das immundominante Antigen bei CMV-spezifischen T-Zell-Antworten ist (Wills et al. 1996) aber in einigen Individuen scheint IE1 das immundominante zu sein, oder beide Antigene sind vergleichbar in ihrer Immunogenität (Bao et al. 2008). Deshalb ist es wichtig einen Impfstoff zu haben der beide Antigene, pp65 und IE1, kombiniert um die zelluläre Immunantwort zu erweitern und alle potentiellen Impflinge abzudecken.

Außerdem wurde bei 2 Spendern nach Stimulation mit MVA-pp65-IE1 eine geringere Zahl IE1-spezifischer T-Zellen expandiert als nach Stimulation mit MVA-IE1, obwohl es keinen signifikanten Unterschied in der IE1-Expression in MVA-IE1- und MVA-pp65-IE1-infizierten B-Zellen gab. Dagegen war der Unterschied für pp65-spezifische T-Zellen bei der Expansion mit MVA-pp65-IE1 und MVA-pp65 bei einem Spender nicht signifikant. Die Expansion der pp65-spezifischen T-Zellen war bei drei Spendern sogar besser nach der Stimulation mit dem doppelrekombinanten Stamm. Die reduzierte Immunantwort gegen IE1 bei Verwendung von MVA-pp65-IE1 könnte auf die

Phosphorylierung von IE1 durch pp65 and die daraus resultierende Hemmung der proteasomalen Prozessierung zu Grunde liegen (Gilbert et al. 1996). Ein weiterer Hinweis auf diesen Mechanismus könnte die Tatsache sein, dass IE1 eine signifikant höhere Expression in MVA-pp65-IE1-infizierten B-Zellen vorweist als pp65. Wenn dies verifiziert werden würde, sollte man eine sequentielle Impfung durchführen, bei der zuerst MVA-IE1 geimpft wird und später MVA-pp65 einzeln oder MVA-pp65-IE1, um die IE1-spezifische T-Z-Antwort zu verbessern. Dieses Phänomen müsste aber noch in weiteren Versuchen bestätigt werden.

Der größte Teil der expandierten CMV spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wiesen einen EM-Phänotyp auf, und ein kleinerer Anteil hatte einen CM-Phänotyp, wie es typisch für spezifische T-Zellen ist, die *in vitro* generiert wurden (Gattinoni et al. 2006). Allerdings müsste der Anteil der CM-T-Zellen ausreichend sein um für längere Zeit *in vivo* zu persistieren (Berger et al. 2008). Effektor-T-Zell-Klone, die von EM T-Zellen abstammen, überleben nur kurze Zeit im Blut, besitzen nicht die Fähigkeit für das *Homing* in die Lymphknoten oder das Knochenmark und können nicht die phänotypischen Eigenschaften von Gedächtnis-T-Zellen wiedererlangen. Effektor-T-Zell-Klone, die dagegen von CM T-Zellen abstammen können für lange Zeit im Körper persistieren, zu Gedächtnis-T-Zell-Nischen migrieren, die phänotypischen Eigenschaften von Gedächtnis-T-Zellen wiedererlangen und auf Antigenstimulation antworten (Berger et al. 2008).

### **4.3 Sicherheit und Stabilität von MVA-IE1, MVA-pp65 und MVA-pp65-IE1**

Für den klinischen Einsatz sollte ein rekombinanter Lebendimpfstoff genetisch stabil und frei von Selektionsmarkern sein. Die inserierten rekombinanten Gene sollten allerdings nicht nur stabil exprimiert werden sondern, wie von Wyatt et al. Sowie von Diamond und Kollegen empfohlen, einen starken Promoter besitzen (Manuel et al. 2010; Z. Wang et al. 2010; Wyatt et al. 2009). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die ersten MVA-CMV-Vakzinkandidaten untersucht, die pp65 und/oder IE1 stabil exprimieren und zugleich frei von Selektionsmarkern sind. Die stabile Expression von pp65 und IE1 in rMVA ist eine unabdingbare Voraussetzung, da das rMVA mehrere Male amplifiziert werden muss um eine ausreichende Menge für den cGMP-Herstellungsprozess zu erhalten, wobei das rMVA seine Stabilität und Potenz erhalten muss, um die Erwartungen der Zulassungsbehörden zu erfüllen (Z. Wang et al. 2010).

Die Stabilität des Vakzins wird erreicht durch: (i) Benutzung der relativ stabilen Insertionsstelle Deletion III (del III) für pp65 und IE1 in MVA. Es konnte nachgewiesen werden, dass Gene, die in del III inseriert wurden nach mehreren Passagen, wegen essentiellen Genen auf beiden Seiten von del III, keine Deletionen vorwiesen. Deletionen in diesen essentiellen Genen würde Nachteile für das Wachstum haben (Wyatt et al. 2009). (ii) Die Kodons wurden optimiert um eine Bildung von tertiären Strukturen und spontane Deletionen zu vermeiden (Wyatt et al. 2009). (iii) Starke Promotoren wie PmH5 stabilisieren nachweislich die Expression von inserierten Genen über viele Passagen (Z. Wang et al. 2010). (iv) Die Entfernung der homologen Rekombinationstellen, was eine spontane neue homologe Rekombination verhindert (Staub et al. 2003).

Weitere Eigenschaften der MVA-CMV-Vakzinkandidaten, welche die Bedenken der Zulassungsbehörden beseitigen können sind: (i) Die hier vorgestellten MVA-CMV-Vakzinkandidaten sind absolut frei von Selektionsmarkern. Dies ist besonders wichtig, da sonst Antibiotikaresistenzgene auf die endogen mikrobielle Flora übertragen oder unerwünschte Transkriptionsprodukte gebildet werden könnten (Luke et al. 2009), die andere klinische Therapien nachteilig beeinflussen könnten (EMA 2001). (ii) Vacciniaviren integrieren nicht in das Wirtsgenom, da sie wegen ihrer Genomgröße nur im Zytoplasma der Wirtszelle replizieren (Oh und Broyles 2005). (iii) Es kann keine unerwarteten und unerwünschten Konsequenzen einer Langzeitexpression des fremden Antigens geben (EMA 2001), da die Infektion von humane Zellen mit MVA abortiv ist (Carroll und Moss 1997; Drexler et al. 1998; H. Meyer et al. 1991). (iv) Während der 1970er Jahre wurde MVA erfolgreich in intensiven Feldstudien als Pockenimpfstoff an über 120.000 Impfungen in Bayern getestet, einschließlich Hochrisikopatienten (z. B. mit atopischer Dermatitis, Ekzemen oder Immunsuppression), welche keine der gefürchteten Nebenwirkungen (generalisierter Hautausschlag, progressive Vacciniavirus-Infektion oder postvakzinale Enzephalitis) zeigten (Mayr et al. 1975; Mayr et al. 1978; Mayr und Danner 1978; Stickl et al. 1974). Sogar immunsupprimierte Patienten mit AIDS waren frei von Nebenwirkungen nach einer Impfung mit MVA (Cosma et al. 2007). (v) Bedenken eine Immunantwort gegen den Vektor zu generieren (EMA 2001), insbesondere bei einer bereits bestehenden Immunität (EMA 2010) durch eine Pockenimpfung, konnten ebenfalls zerstreut werden, da Vaccinia-spezifische T-Zellen bei den gegen Pocken geimpften Spendern weder durch MVA-wt noch durch die die MVA-CMV-Stämme expandiert werden

konnten. Die Immunogenität der CMV-Antigene wird demzufolge durch den MVA-Vektor nicht beeinträchtigt.

#### **4.4 Schlussfolgerung**

Es konnte gezeigt werden, dass MVA bevorzugt APCs infiziert und eine Th1-polarisierende Zytokinexpression in diesen APCs induziert. Jedoch konnte eine effektive Stimulation und Expansion CMV-spezifischer T-Zellen nicht durch DCs erreicht werden, welche direkt mit MVA-IE1, MVA-pp65 oder MVApp65-IE1 infiziert wurden, da diese eine unzureichende Expression der kostimulatorischen Moleküle und MHC-Komplexe aufwiesen. Vielmehr konnten die CMV-spezifischen T-Zellen mittels Kreuzpräsentation von CMV-Antigenen stimuliert und expandiert werden. Uninfizierte *Bystander*-DCs phagozytierten apoptotisches Material MVA-infizierter Leukozyten, prozessierten die darin enthaltenen CMV-Antigene und reiften vollständig aus. Neben pp65-spezifischen T-Zellen konnten auch IE1-spezifische T-Zellen erfolgreich expandiert werden, wenn auch in einem geringeren Ausmaß. Die expandierten T-Zellen wiesen zum großen Teil einen EM-Phänotyp auf. Ein kleinerer Anteil besaß einen CM-Phänotyp, dieser müsste allerdings ausreichen, um für längere Zeit im Körper des potentiellen Impflings zu persistieren um einen Gedächtnis-T-Zell-Pool zu etablieren. Darüber hinaus konnten keine Vaccinia-spezifische T-Zellen bei den gegen Pocken geimpften Spendern expandiert werden. Dadurch ist die Immunogenität der CMV-Antigene nicht beeinträchtigt. Die drei untersuchten stabilen und markerfreien MVA-CMV-Vakzinkandidaten erfüllen alle Stabilitäts-, Immunogenitäts- und Sicherheitsbestimmungen der Europäischen Arzneimittelbehörde (EMA) für virale Vektorimpfstoffe und sind deshalb bereit für die cGMP-Produktion und anschließende klinische Prüfung (EMA 2001, 2010). Während dieser klinischen Versuche sollten die MVA-CMV-Vakzinkandidaten in CMV-seropositiven und seronegativen Impflingen mit MVA-IE1 und MVA-pp65 in bestimmten Intervallen oder mit MVA-pp65-IE1 geimpft werden, um die optimale Immunantwort gegen CMV zu bestimmen. In der Zukunft könnten diese Vakzine bei CMV-seronegativen SCT-Spendern eingesetzt werden und deren spezifische T-Zellen auf einen CMV-seropositiven SCT-Empfänger zu übertragen.

## 5 Literaturverzeichnis

- Altenburger, W. et al. (1989), 'Partial deletion of the human host range gene in the attenuated vaccinia virus MVA', *Arch Virol*, 105 (1-2), 15-27.
- Annunziato, F. et al. (2009), 'Do studies in humans better depict Th17 cells?', *Blood*, 114 (11), 2213-2219.
- Antoine, G. et al. (1998), 'The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses', *Virology*, 244 (2), 365-396.
- Appay, V. et al. (2002), 'Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections', *Nat Med*, 8 (4), 379-385.
- Arrode, G. et al. (2000), 'Incoming human cytomegalovirus pp65 (UL83) contained in apoptotic infected fibroblasts is cross-presented to CD8(+) T cells by dendritic cells', *J Virol*, 74 (21), 10018-10024.
- AuCoin, D. P. et al. (2006), 'Betaherpesvirus-conserved cytomegalovirus tegument protein ppUL32 (pp150) controls cytoplasmic events during virion maturation', *J Virol*, 80 (16), 8199-8210.
- Azzeh, M. et al. (2006), 'Structural changes in human cytomegalovirus cytoplasmic assembly sites in the absence of UL97 kinase activity', *Virology*, 354 (1), 69-79.
- Baldick, C. J., Jr. et al. (1996), 'Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles', *J Virol*, 70 (9), 6097-6105.
- Bao, L. et al. (2008), 'Expansion of cytomegalovirus pp65 and IE-1 specific cytotoxic T lymphocytes for cytomegalovirus-specific immunotherapy following allogeneic stem cell transplantation', *Biol Blood Marrow Transplant*, 14 (10), 1156-1162.
- Battista, M. C. et al. (1999), 'Expression and characterization of a novel structural protein of human cytomegalovirus, pUL25', *J Virol*, 73 (5), 3800-3809.
- Bechtel, J. T. et al. (2002), 'Human cytomegalovirus UL47 tegument protein functions after entry and before immediate-early gene expression', *J Virol*, 76 (3), 1043-1050.

- Boeckh, M. et al. (2003a), 'Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: Current status, known challenges, and future strategies', *Biol Blood Marrow Transplant*, 9 (9), 543-558.
- Boeckh, M. et al. (2003b), 'Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity', *Blood*, 101 (2), 407-414.
- Boehme, K. W. et al. (2006), 'Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells', *J Immunol*, 177 (10), 7094-7102.
- Boraschi, D. et al. (1990), 'Differential activity of interleukin 1 alpha and interleukin 1 beta in the stimulation of the immune response in vivo', *Eur J Immunol*, 20 (2), 317-321.
- Britt, W. J. et al. (2004), 'Human cytomegalovirus virion proteins', *Hum Immunol*, 65 (5), 395-402.
- Britt, W. J. et al. (1990), 'Cell surface expression of human cytomegalovirus (HCMV) gp55-116 (gB): use of HCMV-recombinant vaccinia virus-infected cells in analysis of the human neutralizing antibody response', *J Virol*, 64 (3), 1079-1085.
- Carroll, M. W. et al. (1997), 'Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line', *Virology*, 238 (2), 198-211.
- Chahroudi, A. et al. (2005), 'Vaccinia virus tropism for primary hematolymphoid cells is determined by restricted expression of a unique virus receptor', *J Virol*, 79 (16), 10397-10407.
- Chahroudi, A. et al. (2006), 'Differences and similarities in viral life cycle progression and host cell physiology after infection of human dendritic cells with modified vaccinia virus Ankara and vaccinia virus', *J Virol*, 80 (17), 8469-8481.
- Chee, M. S. et al. (1990), 'Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169', *Curr Top Microbiol Immunol*, 154, 125-169.

- Compton, T. (2004), 'Receptors and immune sensors: the complex entry path of human cytomegalovirus', *Trends Cell Biol*, 14 (1), 5-8.
- Compton, T. et al. (2003), 'Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2', *J Virol*, 77 (8), 4588-4596.
- Cosma, A. et al. (2007), 'Evaluation of modified vaccinia virus Ankara as an alternative vaccine against smallpox in chronically HIV type 1-infected individuals undergoing HAART', *AIDS Res Hum Retroviruses*, 23 (6), 782-793.
- Crough, T. et al. (2009), 'Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside', *Clin Microbiol Rev*, 22 (1), 76-98, Table of Contents.
- Crough, T. et al. (2005), 'Contemporaneous fluctuations in T cell responses to persistent herpes virus infections', *Eur J Immunol*, 35 (1), 139-149.
- Cyrklaff, M. et al. (2005), 'Cryo-electron tomography of vaccinia virus', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (8), 2772-2777.
- Delaloye, J. et al. (2009), 'Innate immune sensing of modified vaccinia virus Ankara (MVA) is mediated by TLR2-TLR6, MDA-5 and the NALP3 inflammasome', *PLoS Pathog*, 5 (6), e1000480.
- Dietz, A. B. et al. (2006), 'A novel source of viable peripheral blood mononuclear cells from leukoreduction system chambers', *Transfusion*, 46 (12), 2083-2089.
- Dreicer, R. et al. (2005), 'Vaccine immunotherapy with MVA-Muc1-IL2 (TG4010) in prostate cancer patients with biochemical failure', *Journal of Clinical Oncology*, 23 (16S), 4581.
- Drexler, I. et al. (1998), 'Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells', *J Gen Virol*, 79 ( Pt 2), 347-352.
- Drillien, R. et al. (2004), 'Modified vaccinia virus Ankara induces moderate activation of human dendritic cells', *J Gen Virol*, 85 (Pt 8), 2167-2175.
- Earl, P. L. et al. (2004), 'Immunogenicity of a highly attenuated MVA smallpox vaccine and protection against monkeypox', *Nature*, 428 (6979), 182-185.
- Einsele, H. et al. (1991), 'Polymerase chain reaction to evaluate antiviral therapy for cytomegalovirus disease', *Lancet*, 338 (8776), 1170-1172.

- EMA (2001), 'Note for guidance on the quality, preclinical and clinical aspects of gene transfer medicinal products', (CPMP/BWP/3088/99; London: European Medicines Agency).
- (2010), 'Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of live recombinant viral vectored vaccines', (EMA/CHMP/VWP/141697/2009: European Medicines Agency).
- Falkner, F. G. et al. (1990), 'Transient dominant selection of recombinant vaccinia viruses', *J Virol*, 64 (6), 3108-3111.
- Fietze, E. et al. (1994), 'Cytomegalovirus infection in transplant recipients. The role of tumor necrosis factor', *Transplantation*, 58 (6), 675-680.
- Frey, S. E. et al. (2007), 'Clinical and immunologic responses to multiple doses of IMVAMUNE (Modified Vaccinia Ankara) followed by Dryvax challenge', *Vaccine*, 25 (51), 8562-8573.
- Gasteiger, G. et al. (2007), 'Cross-priming of cytotoxic T cells dictates antigen requisites for modified vaccinia virus Ankara vector vaccines', *J Virol*, 81 (21), 11925-11936.
- Gattinoni, L. et al. (2006), 'Adoptive immunotherapy for cancer: building on success', *Nat Rev Immunol*, 6 (5), 383-393.
- Gilbert, M. J. et al. (1996), 'Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product', *Nature*, 383 (6602), 720-722.
- Gillespie, G. M. et al. (2000), 'Functional heterogeneity and high frequencies of cytomegalovirus-specific CD8(+) T lymphocytes in healthy seropositive donors', *J Virol*, 74 (17), 8140-8150.
- Gleaves, C. A. et al. (1984), 'Rapid detection of cytomegalovirus in MRC-5 cells inoculated with urine specimens by using low-speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen', *J Clin Microbiol*, 19 (6), 917-919.
- Greenough, T. C. et al. (2008), 'Safety and immunogenicity of recombinant poxvirus HIV-1 vaccines in young adults on highly active antiretroviral therapy', *Vaccine*, 26 (52), 6883-6893.
- Greiner, S. et al. (2006), 'The highly attenuated vaccinia virus strain modified virus Ankara induces apoptosis in melanoma cells and allows bystander dendritic

- cells to generate a potent anti-tumoral immunity', *Clin Exp Immunol*, 146 (2), 344-353.
- Griffiths, P. D. et al. (1984), 'Rapid diagnosis of cytomegalovirus infection in immunocompromised patients by detection of early antigen fluorescent foci', *Lancet*, 2 (8414), 1242-1245.
- Griffiths, Paul D. (2006), 'CMV as a cofactor enhancing progression of AIDS', *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 35 (4), 489-492.
- Grigoleit, G. U. et al. (2007), 'Dendritic cell vaccination in allogeneic stem cell recipients: induction of human cytomegalovirus (HCMV)-specific cytotoxic T lymphocyte responses even in patients receiving a transplant from an HCMV-seronegative donor', *J Infect Dis*, 196 (5), 699-704.
- Grigoleit, U. et al. (2002), 'Human cytomegalovirus induces a direct inhibitory effect on antigen presentation by monocyte-derived immature dendritic cells', *Br J Haematol*, 119 (1), 189-198.
- Gudmundsdotter, L. et al. (2009), 'Recombinant Modified Vaccinia Ankara (MVA) effectively boosts DNA-primed HIV-specific immune responses in humans despite pre-existing vaccinia immunity', *Vaccine*, 27 (33), 4468-4474.
- Guerra, S. et al. (2007), 'Distinct gene expression profiling after infection of immature human monocyte-derived dendritic cells by the attenuated poxvirus vectors MVA and NYVAC', *J Virol*, 81 (16), 8707-8721.
- Harrop, R. et al. (2008), 'Vaccination of colorectal cancer patients with TroVax given alongside chemotherapy (5-fluorouracil, leukovorin and irinotecan) is safe and induces potent immune responses', *Cancer Immunol Immunother*, 57 (7), 977-986.
- Hawkrige, T. et al. (2008), 'Safety and immunogenicity of a new tuberculosis vaccine, MVA85A, in healthy adults in South Africa', *J Infect Dis*, 198 (4), 544-552.
- Hebart, H. et al. (2004), 'Clinical aspects of CMV infection after stem cell transplantation', *Hum Immunol*, 65 (5), 432-436.
- Hebart, H. et al. (2002), 'Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by interferon-gamma-enzyme-linked

- immunospot assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation', *Blood*, 99 (10), 3830-3837.
- <http://www.tib-molbiol.com/de/lightcycler/design/> (2009), *TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH*.
- [http://www.tib-molbiol.com/de/lightcycler/products/hybpr\\_amounts.html](http://www.tib-molbiol.com/de/lightcycler/products/hybpr_amounts.html) (2009), *TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH*.
- Hume, A. J. et al. (2008), 'Phosphorylation of retinoblastoma protein by viral protein with cyclin-dependent kinase function', *Science*, 320 (5877), 797-799.
- Johnson, V. J. et al. (2005), 'Prevention of IL-1 signaling attenuates airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma', *J Allergy Clin Immunol*, 116 (4), 851-858.
- Kalejta, R. F. (2008a), 'Tegument proteins of human cytomegalovirus', *Microbiol Mol Biol Rev*, 72 (2), 249-265, table of contents.
- (2008b), 'Functions of human cytomegalovirus tegument proteins prior to immediate early gene expression', *Curr Top Microbiol Immunol*, 325, 101-115.
- Kalinski, P. et al. (2001), 'Prostaglandin E(2) is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer', *Blood*, 97 (11), 3466-3469.
- Kastenmuller, W. et al. (2006), 'Infection of human dendritic cells with recombinant vaccinia virus MVA reveals general persistence of viral early transcription but distinct maturation-dependent cytopathogenicity', *Virology*, 350 (2), 276-288.
- Kaufman, H. L. et al. (2009), 'Phase II trial of Modified Vaccinia Ankara (MVA) virus expressing 5T4 and high dose Interleukin-2 (IL-2) in patients with metastatic renal cell carcinoma', *J Transl Med*, 7, 2.
- Kenneson, A. et al. (2007), 'Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection', *Rev Med Virol*, 17 (4), 253-276.
- Khan, N. et al. (2004), 'Herpesvirus-specific CD8 T cell immunity in old age: cytomegalovirus impairs the response to a coresident EBV infection', *J Immunol*, 173 (12), 7481-7489.

- Konrad, Regina et al. (2010), 'PCR und Real-Time PCR', in Ulrich Busch (ed.), *Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik* (Springer Berlin Heidelberg), 35-47.
- Krause, H. et al. (1997), 'Screening for CMV-specific T cell proliferation to identify patients at risk of developing late onset CMV disease', *Bone Marrow Transplant*, 19 (11), 1111-1116.
- Krosky, P. M. et al. (2003), 'The human cytomegalovirus UL97 protein kinase, an antiviral drug target, is required at the stage of nuclear egress', *J Virol*, 77 (2), 905-914.
- La Rosa, C. et al. (2006), 'In vitro expansion of polyclonal T-cell subsets for adoptive immunotherapy by recombinant modified vaccinia Ankara', *Exp Hematol*, 34 (4), 497-507.
- Lafemina, R. L. et al. (1989), 'Expression of the acidic nuclear immediate-early protein (IE1) of human cytomegalovirus in stable cell lines and its preferential association with metaphase chromosomes', *Virology*, 172 (2), 584-600.
- Landolfo, S. et al. (2003), 'The human cytomegalovirus', *Pharmacol Ther*, 98 (3), 269-297.
- Lehmann, M. H. et al. (2009), 'Modified vaccinia virus ankara triggers chemotaxis of monocytes and early respiratory immigration of leukocytes by induction of CCL2 expression', *J Virol*, 83 (6), 2540-2552.
- Ling, P. et al. (1995), 'Human IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity', *J Immunol*, 154 (1), 116-127.
- Lischka, P. et al. (2006), 'The UL69 transactivator protein of human cytomegalovirus interacts with DEXD/H-Box RNA helicase UAP56 to promote cytoplasmic accumulation of unspliced RNA', *Mol Cell Biol*, 26 (5), 1631-1643.
- Littler, E. et al. (1992), 'Human cytomegalovirus UL97 open reading frame encodes a protein that phosphorylates the antiviral nucleoside analogue ganciclovir', *Nature*, 358 (6382), 160-162.
- Liu, B. et al. (1992), 'Human cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promoters with upstream ATF and AP-1 cis-acting elements', *J Virol*, 66 (7), 4434-4444.

- Liu, L. et al. (2008), 'Dendritic cells are preferentially targeted among hematolymphocytes by Modified Vaccinia Virus Ankara and play a key role in the induction of virus-specific T cell responses in vivo', *BMC Immunol*, 9, 15.
- Ljungman, P. (2007), 'Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: viral status', *Best Pract Res Clin Haematol*, 20 (2), 209-217.
- Ljungman, P. et al. (2003), 'Donor CMV serologic status and outcome of CMV-seropositive recipients after unrelated donor stem cell transplantation: an EBMT megafile analysis', *Blood*, 102 (13), 4255-4260.
- Lorz, K. et al. (2006), 'Deletion of open reading frame UL26 from the human cytomegalovirus genome results in reduced viral growth, which involves impaired stability of viral particles', *J Virol*, 80 (11), 5423-5434.
- Lu, M. et al. (1999), 'Human cytomegalovirus UL69 protein induces cells to accumulate in G1 phase of the cell cycle', *J Virol*, 73 (1), 676-683.
- Luke, J. et al. (2009), 'Improved antibiotic-free DNA vaccine vectors utilizing a novel RNA based plasmid selection system', *Vaccine*, 27 (46), 6454-6459.
- Malm, G. et al. (2007), 'Congenital cytomegalovirus infections', *Semin Fetal Neonatal Med*, 12 (3), 154-159.
- Mandron, M. et al. (2008), 'Dendritic cell-induced apoptosis of human cytomegalovirus-infected fibroblasts promotes cross-presentation of pp65 to CD8+ T cells', *J Gen Virol*, 89 (Pt 1), 78-86.
- Manuel, E. R. et al. (2010), 'Intergenic region 3 of modified vaccinia ankara is a functional site for insert gene expression and allows for potent antigen-specific immune responses', *Virology*, 403 (2), 155-162.
- Mattner, F. et al. (1993), 'The interleukin-12 subunit p40 specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer', *Eur J Immunol*, 23 (9), 2202-2208.
- Mayr, A. et al. (1978), 'Vaccination against pox diseases under immunosuppressive conditions', *Dev Biol Stand*, 41, 225-234.
- Mayr, A. et al. (1975), 'Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes MVA', *Infection*, 3 (1), 6-14.
- Mayr, A. et al. (1978), '[The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in

- organisms with a debilitated defence mechanism (author's transl)]', *Zentralbl Bakteriol [B]*, 167 (5-6), 375-390.
- Meier, J. L. et al. (2006), 'Major Immediate-early Enhancer and its Gene Products', in M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology* (Wyomondham: Caister Academic Press), 151-166.
- Mercorelli, B. et al. (2008), 'Human cytomegalovirus DNA replication: antiviral targets and drugs', *Rev Med Virol*, 18 (3), 177-210.
- Mescher, M. F. et al. (2006), 'Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells', *Immunol Rev*, 211, 81-92.
- Meyer, H. et al. (1991), 'Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence', *J Gen Virol*, 72 ( Pt 5), 1031-1038.
- Meyer, R. G. et al. (2005), 'A phase I vaccination study with tyrosinase in patients with stage II melanoma using recombinant modified vaccinia virus Ankara (MVA-hTyr)', *Cancer Immunol Immunother*, 54 (5), 453-467.
- Mezger, M. et al. (2008), 'Proinflammatory response of immature human dendritic cells is mediated by dectin-1 after exposure to *Aspergillus fumigatus* germ tubes', *J Infect Dis*, 197 (6), 924-931.
- Modrow, Susanne et al. (2010a), 'Viren mit doppelsträngigem DNA-Genom', *Molekulare Virologie* (3. Auflage: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg), 461-634.
- Modrow, Susanne et al. (2010b), 'Chemotherapie', *Molekulare Virologie* (Spektrum Akademischer Verlag), 91-105.
- Moutaftsi, M. et al. (2002), 'Human cytomegalovirus inhibits maturation and impairs function of monocyte-derived dendritic cells', *Blood*, 99 (8), 2913-2921.
- Mui, T. S. et al. (2010), 'T-cell therapy for cytomegalovirus infection', *Curr Opin Organ Transplant*.
- Neron, S. et al. (2007), 'Characterization of mononuclear cells remaining in the leukoreduction system chambers of apheresis instruments after routine platelet collection: a new source of viable human blood cells', *Transfusion*, 47 (6), 1042-1049.

- Nörder, M. et al. (2010), 'Modified vaccinia virus Ankara exerts potent immune modulatory activities in a murine model', *PLoS One*, 5 (6), e11400.
- Novotny, J. et al. (2001), 'In silico structural and functional analysis of the human cytomegalovirus (HHV5) genome', *J Mol Biol*, 310 (5), 1151-1166.
- Oh, J. et al. (2005), 'Host cell nuclear proteins are recruited to cytoplasmic vaccinia virus replication complexes', *J Virol*, 79 (20), 12852-12860.
- Oppmann, B. et al. (2000), 'Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12', *Immunity*, 13 (5), 715-725.
- Parrino, J. et al. (2007), 'Safety, immunogenicity and efficacy of modified vaccinia Ankara (MVA) against Dryvax challenge in vaccinia-naive and vaccinia-immune individuals', *Vaccine*, 25 (8), 1513-1525.
- Pascutti, M. F. et al. (2011), 'Interplay between Modified Vaccinia Virus Ankara and Dendritic Cells: Phenotypic and Functional Maturation of Bystander Dendritic Cells', *J Virol*, 85 (11), 5532-5545.
- Peters, B. S. et al. (2007), 'Studies of a prophylactic HIV-1 vaccine candidate based on modified vaccinia virus Ankara (MVA) with and without DNA priming: effects of dosage and route on safety and immunogenicity', *Vaccine*, 25 (11), 2120-2127.
- Prichard, M. N. et al. (2005), 'Human cytomegalovirus UL97 Kinase is required for the normal intranuclear distribution of pp65 and virion morphogenesis', *J Virol*, 79 (24), 15494-15502.
- Prichard, M. N. et al. (2008), 'Human cytomegalovirus UL97 kinase activity is required for the hyperphosphorylation of retinoblastoma protein and inhibits the formation of nuclear aggresomes', *J Virol*, 82 (10), 5054-5067.
- Prosch, S. et al. (1995), 'Stimulation of the human cytomegalovirus IE enhancer/promoter in HL-60 cells by TNFalpha is mediated via induction of NF-kappaB', *Virology*, 208 (1), 197-206.
- Rafferty, Martin J. et al. (2001), 'Targeting the Function of Mature Dendritic Cells by Human Cytomegalovirus: A Multilayered Viral Defense Strategy', *Immunity*, 15 (6), 997-1009.

- Ramirez, J. C. et al. (2000), '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*, 74 (2), 923-933.
- Ramlau, R. et al. (2008), 'A phase II study of Tg4010 (Mva-Muc1-II2) in association with chemotherapy in patients with stage III/IV Non-small cell lung cancer', *J Thorac Oncol*, 3 (7), 735-744.
- Rasmussen, L. et al. (1991), 'Antibody response to human cytomegalovirus glycoproteins gB and gH after natural infection in humans', *J Infect Dis*, 164 (5), 835-842.
- Reddehase, M. J. (2000), 'The immunogenicity of human and murine cytomegaloviruses', *Curr Opin Immunol*, 12 (4), 390-396.
- Rolle, A. et al. (2009), 'Dendritic cells in cytomegalovirus infection: viral evasion and host countermeasures', *APMIS*, 117 (5-6), 413-426.
- Romagnani, P. et al. (2005), 'CXCR3-mediated opposite effects of CXCL10 and CXCL4 on TH1 or TH2 cytokine production', *J Allergy Clin Immunol*, 116 (6), 1372-1379.
- Roper, R. L. (2004), 'Rapid preparation of vaccinia virus DNA template for analysis and cloning by PCR', *Methods Mol Biol*, 269, 113-118.
- Sabin, C. A. et al. (2000), 'Cytomegalovirus seropositivity and human immunodeficiency virus type 1 RNA levels in individuals with hemophilia', *J Infect Dis*, 181 (5), 1800-1803.
- Sallusto, F. et al. (2004), 'Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance', *Annu Rev Immunol*, 22, 745-763.
- Sallusto, F. et al. (1999), 'Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions', *Nature*, 401 (6754), 708-712.
- Sanchez-Puig, J. M. et al. (2004), 'Susceptibility of different leukocyte cell types to Vaccinia virus infection', *Virol J*, 1, 10.
- Sanchez, V. et al. (2000), 'Human cytomegalovirus pp28 (UL99) localizes to a cytoplasmic compartment which overlaps the endoplasmic reticulum-golgi-intermediate compartment', *J Virol*, 74 (8), 3842-3851.

- Scheiflinger, F. et al. (1998), 'Transient marker stabilisation: a general procedure to construct marker-free recombinant vaccinia virus', *Arch Virol*, 143 (3), 467-474.
- Schierling, K. et al. (2005), 'Human cytomegalovirus tegument protein ppUL35 is important for viral replication and particle formation', *J Virol*, 79 (5), 3084-3096.
- Schmolke, S. et al. (1995), 'Nuclear targeting of the tegument protein pp65 (UL83) of human cytomegalovirus: an unusual bipartite nuclear localization signal functions with other portions of the protein to mediate its efficient nuclear transport', *J Virol*, 69 (2), 1071-1078.
- Smith, G. L. et al. (2002), 'The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus', *J Gen Virol*, 83 (Pt 12), 2915-2931.
- Snijders, A. et al. (1996), 'Regulation of bioactive IL-12 production in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is determined by the expression of the p35 subunit', *J Immunol*, 156 (3), 1207-1212.
- Spaete, R. R. et al. (1985), 'Regulation of cytomegalovirus gene expression: alpha and beta promoters are trans activated by viral functions in permissive human fibroblasts', *J Virol*, 56 (1), 135-143.
- Stagno, S. et al. (1986), 'Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome', *JAMA*, 256 (14), 1904-1908.
- Staib, C. et al. (2004), 'Construction and isolation of recombinant MVA', *Methods Mol Biol*, 269, 77-100.
- Staib, C. et al. (2003), 'Improved host range selection for recombinant modified vaccinia virus Ankara', *Biotechniques*, 34 (4), 694-696, 698, 700.
- Staib, C. et al. (2000), 'Transient host range selection for genetic engineering of modified vaccinia virus Ankara', *Biotechniques*, 28 (6), 1137-1142, 1144-1136, 1148.
- Stein, J. et al. (1993), 'Tumour necrosis factor alpha stimulates the activity of the human cytomegalovirus major immediate early enhancer/promoter in immature monocytic cells', *J Gen Virol*, 74 ( Pt 11), 2333-2338.
- Steininger, C. et al. (2006), 'Cytomegalovirus disease in the era of highly active antiretroviral therapy (HAART)', *J Clin Virol*, 37 (1), 1-9.

- Stickl, H. et al. (1974), '[MVA vaccination against smallpox: clinical tests with an attenuated live vaccinia virus strain (MVA) (author's transl)]', *Dtsch Med Wochenschr*, 99 (47), 2386-2392.
- Stinski, M. F. et al. (1985), 'Activation of the major immediate early gene of human cytomegalovirus by cis-acting elements in the promoter-regulatory sequence and by virus-specific trans-acting components', *J Virol*, 55 (2), 431-441.
- Stittelaar, K. J. et al. (2001), 'Safety of modified vaccinia virus Ankara (MVA) in immune-suppressed macaques', *Vaccine*, 19 (27), 3700-3709.
- Strasser, E. F. et al. (2007), 'Recovery of white blood cells and platelets from leukoreduction system chambers of Trima Accel and COBE Spectra plateletpheresis devices', *Transfusion*, 47 (10), 1943-1944; author reply 1944-1945.
- Sullivan, V. et al. (1992), 'A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human cytomegalovirus-infected cells', *Nature*, 358 (6382), 162-164.
- Sung, H. et al. (2010), 'Update on the current status of cytomegalovirus vaccines', *Expert Rev Vaccines*, 9 (11), 1303-1314.
- Sutter, G. et al. (1992), 'Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (22), 10847-10851.
- Sylwester, A. W. et al. (2005), 'Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects', *J Exp Med*, 202 (5), 673-685.
- Terajima, M. et al. (2003), 'Quantitation of CD8+ T cell responses to newly identified HLA-A\*0201-restricted T cell epitopes conserved among vaccinia and variola (smallpox) viruses', *J Exp Med*, 197 (7), 927-932.
- Wang, C. C. et al. (2006), 'Adenovirus expressing interleukin-1 receptor antagonist alleviates allergic airway inflammation in a murine model of asthma', *Gene Ther*, 13 (19), 1414-1421.
- Wang, Z. et al. (2010), 'Modified H5 promoter improves stability of insert genes while maintaining immunogenicity during extended passage of genetically engineered MVA vaccines', *Vaccine*, 28 (6), 1547-1557.

- Webster, A. et al. (1989), 'Cytomegalovirus infection and progression to AIDS', *Lancet*, 2 (8664), 681.
- Wills, M. R. et al. (1996), 'The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL', *J Virol*, 70 (11), 7569-7579.
- Wyatt, L. S. et al. (1996), 'Development of a replication-deficient recombinant vaccinia virus vaccine effective against parainfluenza virus 3 infection in an animal model', *Vaccine*, 14 (15), 1451-1458.
- Wyatt, L. S. et al. (2009), 'Elucidating and minimizing the loss by recombinant vaccinia virus of human immunodeficiency virus gene expression resulting from spontaneous mutations and positive selection', *J Virol*, 83 (14), 7176-7184.
- Yust, I. et al. (2004), 'Retinal and extraocular cytomegalovirus end-organ disease in HIV-infected patients in Europe: a EuroSIDA study, 1994-2001', *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 23 (7), 550-559.
- Zhang, Z. et al. (2000), 'A greedy algorithm for aligning DNA sequences', *J Comput Biol*, 7 (1-2), 203-214.
- Zhu, J. et al. (2008), 'CD4 T cells: fates, functions, and faults', *Blood*, 112 (5), 1557-1569.

## 6 Abkürzungen

Tabelle 7: Abkürzungen

AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
Ak	Antikörper
AP-1	<i>activator protein 1</i>
APC	antigenpräsentierende Zelle ( <i>antigen presenting cell</i> )
AS	Aminosäure
ATF	<i>activating transcription factors</i>
BAL	bronchoalveoläre Lavage
bp	Basenpaare ( <i>base pair</i> )
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCR	Chemokin (C-C Motiv) Rezeptor-Typ
CD	Differenzierungsfaktor ( <i>cluster of differentiation</i> )
cDNA	<i>copy DNA</i>
cGMP	<i>current good manufacturing practice</i>
CM	<i>central memory</i>
CMV	Cytomegalievirus
CP	<i>Crossing-Point</i>
CREB	<i>cAMP response element binding</i>
CPE	Cytopathischer Effekt
CXCL	Chemokin-(C-X-C Motiv) Ligand
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
Daxx	death-domain-associated protein
DC	Dendritische Zelle ( <i>dendritic cell</i> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ds	doppelsträngig ( <i>double stranded</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EM	<i>effector memory</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EMRA	<i>effector memory CD45RA<sup>+</sup></i>
<i>et al.</i>	<i>et aliter</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FCS	Fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
FSC	<i>forward scattering</i>
gB	Glykoprotein B
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
hALAS	<i>human <math>\delta</math>-aminolevulinat synthase</i>
HDAC	Histon-Deacetylasen
HHV	humanes Herpesvirus
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
iDCs	unreife dendritische Zelle ( <i>immature dendritic cell</i> )
IE	<i>immediate early</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRL	<i>internal repeat long</i>
IRS	<i>internal repeat sequence</i>
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
LC	<i>Light Cycler<sup>®</sup></i>
MACS	Magnetische Zellsortierung ( <i>magnetic cell sorting</i> )
mDCs	reife dendritische Zelle ( <i>mature dendritic cell</i> )

MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIEP	viraler Haupt- <i>immediate-early</i> -Promoter
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MT	Mikrotubuli
MVA	Modifiziertes Vaccinia Ankara Virus
N	<i>naïve</i>
<i>NFκB</i>	<i>nuclear factor κ B</i>
NK	Natürliche Killerzelle ( <i>natural killer cell</i> )
ORF	offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pDCs	plasmazytoide dendritische Zelle
PI	Propidiumiodid
pp65	Phosphoprotein 65
PML-NBs	<i>premyelocytic leukemia nuclear bodies</i>
qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> - Medium
RT	Raumtemperatur
SCT	<i>stem cell transplantation</i>
SOT	<i>solid organ transplantation</i>
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
Th	T-Helferzelle
<i>TNFα</i>	<i>tumor necrosis factor α</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TRS	<i>terminal repeat sequence</i>

---

UL	<i>unique long</i>
US	<i>unique short</i>
wt	wildtyp

## 7 Publikationen

### **Teile dieser Arbeit wurden oder werden in folgenden Beiträgen veröffentlicht:**

Christin Flechsig, Yasemin Suezzer, Markus Kapp, Sen Mui Tan, Jürgen Löffler, Gerd Sutter, Hermann Einsele and Goetz Ulrich Grigoleit "Expansion of CMV-specific T-cells via cross-presentation by new marker-free modified vaccinia Ankara viruses with stable expression of pp65 and IE1" (Manuskript wurde eingereicht)

Christin Flechsig, Yasemin Suezzer, Markus Kapp, Sen Mui Tan, Jürgen Löffler, Gerd Sutter, Hermann Einsele and Goetz Ulrich Grigoleit "Antigen uptake from modified vaccinia Ankara virus infected leukocytes enhances the immunostimulatory capacity of dendritic cells", *Cytotherapy* 2011, Jul;13(6):739-52. Epub 2011 Jan 20

### **Teile dieser Arbeit wurden als Poster vorgestellt:**

Christin Flechsig, Yasemin Suezzer, Markus Kapp, Gerd Sutter, Hermann Einsele and Goetz Ulrich Grigoleit "Recombinant modified vaccinia Ankara virus stably expressing human cytomegalovirus proteins IE1 or pp65 induces a Th1-polarized immune response in antigen presenting cells and can induce a specific T cell response via cross presentation", 4th European Virology Congress (EVC) in Cernobbio, Lake of Como, IT, April 7-11, 2010

### **Weitere Publikationen:**

S.M. Tan, M. Kapp, C. Flechsig, K. Kapp, J. Rachor, M. Eyrich, J. Loeffler, H. Einsele, G.U. Grigoleit „Stimulating surface molecules, Th1 polarizing cytokines, proven trafficking - A new protocol for the generation of clinical grade dendritic cells (DCs)“ (Manuskript wurde eingereicht)

Mona Zimmermann, Christin Flechsig, Nicola La Monica, Marco Tripodi, Guido Adler, and Nektarios Dikopoulos „Hepatitis C virus core protein impairs in vitro priming of specific T cell responses by dendritic cells and hepatocytes“, *Journal of Hepatology*, Volume 48, Issue 1, January 2008, Pages 51-60

Charlotte Kopitz, Michael Gerg, Obul Reddy Bandapalli, Dilek Ister, Caroline J. Pennington, Stephanie Hauser, Christin Flechsig, Hans-Willi Krell, Dalibor Antolovic, Keith Brew, Hideaki Nagase, Manfred Stangl, Claus W. Hann von Weyhern, Björn L.D.M. Brücher, Karsten Brand, Lisa M. Coussens, Dylan R. Edwards, and Achim Krüger „Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 Promotes Liver Metastasis by Induction of Hepatocyte Growth Factor Signaling“, Cancer Research, 2007, 67: 8615-8623

**Weitere Kongressvorträge:**

Christin Flechsig, Stephanie Hauser, Michael Gerg, Charlotte Kopitz, and Achim Krüger „Inhibition of ADAM10-Mediated c-Met Shedding as a Potential Mechanism of TIMP-1-Induced Liver Metastasis“, 24th Winter School, Tiers/Italien, 28.02.-04.03.2007

**Weitere Kongressposter:**

S.M. Tan, M. Kapp, C. Flechsig, K. Kapp, J. Rachor, M. Eyrich, J. Loeffler, H. Einsele, G.U. Grigoleit „Stimulating surface molecules, Th1 polarizing cytokines, proven trafficking - A new protocol for the generation of clinical grade dendritic cells (DCs)“, 37th Annual Meeting of the EBMT, Paris, 2011

Christin Flechsig, Guido Adler, Nektarios Dikopoulos "The C-Terminus of the Hepatitis C Virus Core Protein is Essential for the Immunogenicity of Preceding CD8 T Cell Epitopes", 44th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Copenhagen, Denmark, April 22 – 26, 2009

Nektarios Dikopoulos, Christin Flechsig, Reinhold Schirmbeck und Jörg Reimann „Erhöhung der Immunogenität von Hepatitis C Virus Core Protein für MHC-I restringierte CD8+ T Zellen“, 21. Jahrestagung der GASL, Ulm, 2005

Maik Friedrich, Christin Flechsig, Karin Wiebauer und Sunna Hauschildt „Genstruktur der humanen ADP-Ribosyltransferase 3“, 34. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Berlin, 2003