

**Untersuchung rekombinanter Vakziniaviren MVA auf  
Eignung als Vektorimpfstoff gegen Infektionen  
mit dem Hepatitis C Virus**

DISSERTATION

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

vorgelegt von  
**Marcus Meyr**  
aus Nördlingen

**Mering, Juli 2004**

Eingereicht am: .....

Bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

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

2. Gutachter: Prof. Dr. Friedrich Grummt  
(*Institut für Biochemie, Universität Würzburg*)

der Dissertation

1. Prüfer: .....

2. Prüfer: .....

3. Prüfer: .....

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

## **Erklärung**

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Molekulare Virologie der GSF-München-Neuherberg unter Anleitung von Priv.-Doz. Dr. Gerd Sutter von März 2001 bis April 2004 angefertigt.

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher, noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben, oder zu erwerben versucht.

München, den 7. Juli 2004

(Marcus Meyr)

# **Danke !!!!**

Ich möchte mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Volker Erfle für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes bedanken. Ganz besonders danke ich Priv.-Doz. Dr. Gerd Sutter für die Bereitstellung des Themas, sein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit und für die zahlreichen Anregungen und fachlichen Diskussionen. Prof. Dr. Friedrich Grummt danke ich für die Bereitschaft, das Zweitgutachten zu übernehmen.

Caroline Staib danke ich für die vorbildliche Betreuung und die Bereitschaft, immer für die kompetente Beantwortung von Fragen zur Verfügung zu stehen. Die Zusammenschrift dieser Arbeit wurde mir durch ihren unermüdlichen Einsatz beim Korrekturlesen und ihre hilfreichen Verbesserungsvorschläge sehr erleichtert.

Meinen Mitdoktorandinnen Yasemin Süzer, Kerstin Zarniko und Susanne EL-Gogo danke ich für die gegenseitige Motivation und dafür, dass sie den gelegentlich vorhandenen Laborfrust mit mir teilten. Für die stets bereitwillige BBQ-Kooperation bedanke ich mich bei Moritz Klemm, Georg Gasteiger, Ronny Ljapoci und F. Ortuna.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich beim Mäusetaxiservice von Wolfgang Kastenmüller und Sigrid Kisling bedanken, die immer dafür sorgten, dass mir nicht die Arbeit ausging.

Für das tolle Klima in unserer Arbeitsgruppe möchte ich mich unter anderem bei Ingo Drexler, Holger Ludwig, Andrea Troppmann, Michael Lehmann (na gloar!), Andrea Schmidbauer, Marianne Löwel, Robert Baier, Ute Finkel, sowie unserer „Labormama“ Eliane (Emine Bilir) bedanken.

Ohne die fortwährende seelische und moralische Unterstützung meiner Eltern, meiner Geschwister Christoph und Julia und natürlich meiner Frau Notburga, wäre diese Arbeit allerdings nicht machbar gewesen.

Dir, liebe Notburga, möchte ich unendlich dafür danken, dass du auch in stressvollen Zeiten geduldig die Launen eines Doktoranden ertragen hast, und mir immer wieder neue Kraft zum Durchhalten gegeben hast. Ich danke dir dafür, dass ich immer auf dein Verständnis und deine Liebe vertrauen konnte. Dir widme ich diese Arbeit.

*Für Notburga*

*„Ernst zu nehmende Forschung erkennt man daran,  
dass plötzlich zwei Probleme existieren,  
wo es vorher nur eines gegeben hat.“*

Thorstein Bunde Veblen (1857-1929)

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>1</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>4</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>6</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>8</b>
1.1 DAS HEPATITIS C VIRUS .....	8
1.1.1 <i>Epidemiologie</i> .....	8
1.1.1.1 Entdeckung des Hepatitis C Virus .....	8
1.1.1.2 Hepatitis C Prävalenz .....	8
1.1.1.3 HCV-Genotypen .....	9
1.1.1.4 Übertragungswege .....	10
1.1.1.5 Krankheitsverlauf .....	11
1.1.1.6 Impfstoffentwicklung .....	11
1.1.2 <i>Aufbau des Viruspartikels</i> .....	12
1.1.2.1 Genomorganisation .....	13
1.1.2.2 Das HCV-Polyprotein .....	14
1.1.2.2.1 HCV-Strukturproteine .....	15
1.1.2.2.1.1 Core .....	15
1.1.2.2.1.2 E1+E2 .....	16
1.1.2.2.1.3 p7 .....	17
1.1.2.2.2 HCV-Nichtstrukturproteine .....	17
1.1.2.2.2.1 NS2 .....	17
1.1.2.2.2.2 NS3 .....	17
1.1.2.2.2.3 NS4A .....	18
1.1.2.2.2.4 NS4B .....	18
1.1.2.2.2.5 NS5A .....	19
1.1.2.2.2.6 NS5B .....	20
1.2 DAS MODIFIZIERTE VAKZINIAVIRUS ANKARA (MVA) ALS IMPFVEKTOR .....	20
<b>2 MATERIALIEN</b> .....	<b>23</b>
2.1 CHEMIKALIEN .....	23
2.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	24
2.3 KITS .....	25
2.4 RADIOCHEMIKALIEN .....	25
2.5 BIOCHEMIKALIEN, ENZYME & MEDIEN .....	25
2.6 PLASMIDE .....	26
2.7 VIREN .....	27
2.8 ANTIKÖRPER .....	28
2.9 MÄUSE .....	28
2.10 SYNTHETISCHE OLIGONUKLEOTIDE (PRIMER) .....	29
2.11 SYNTHETISCHE OLIGOPEPTIDE .....	30
2.12 ZUSAMMENSETZUNG DER ZELLKULTURMEDIEN .....	30
2.13 ZUSAMMENSETZUNG GEBRÄUCHLICHER LÖSUNGEN .....	31
2.14 GERÄTELISTE .....	32
<b>3 METHODEN</b> .....	<b>34</b>
3.1 BAKTERIOLOGISCHE METHODEN .....	34
3.1.1 <i>Herstellung elektrokompenter Bakterienzellen</i> .....	34
3.1.2 <i>Elektrotransformation von Bakterienzellen</i> .....	34
3.1.3 <i>Bestimmung der Transformationsrate kompetenter Zellen</i> .....	35
3.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....	36
3.2.1 <i>Plasmid-DNA-Isolierung</i> .....	36
3.2.1.1 Plasmid-DNA-Isolierung im analytischen Maßstab (Mini-Präp) .....	36
3.2.1.2 Plasmid-DNA-Isolierung im präparativen Maßstab (Maxi-Präp) .....	36
3.2.1.3 Endotoxinfreie Plasmid-DNA-Isolierung (Mega-Präp) .....	37
3.2.2 <i>Reinigung von Plasmid-DNA durch Phenolextraktion und Ethanol-fällung</i> .....	37
3.2.3 <i>Analyse von DNA in Agarosegelen</i> .....	37

3.2.4	<i>Herstellung und Aufarbeitung von DNA-Fragmenten</i> .....	38
3.2.4.1	Photometrische Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen.....	38
3.2.4.2	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	38
3.2.4.3	Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	38
3.2.4.4	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	40
3.2.5	<i>Klonierung rekombinanter DNA-Moleküle</i> .....	40
3.2.5.1	Herstellung von glatten Enden an dsDNA-Molekülen.....	40
3.2.5.2	Ligation von DNA-Fragmenten in vektorielle DNA.....	40
3.2.6	<i>Analyse von Proteinen in denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen</i> .....	41
3.2.7	<i>Immunochemischer Nachweis von Proteinen durch Western-Blot (Semi-Dry-Transfer)</i> .....	42
3.2.8	<i>Immunochemischer Nachweis von immobilisierten Proteinen</i> .....	42
3.2.9	<i>Ablösen von Antikörpern von Nitrozellulosemembranen</i> .....	43
3.3	ZELLKULTUR-TECHNIKEN.....	44
3.3.1	<i>Kultivierung von eukaryontischen Zelllinien</i> .....	44
3.3.2	<i>Transiente Transfektion von eukaryontischen Zellen</i> .....	45
3.3.3	<i>Kryokonservierung eukaryontischer Zellen</i> .....	45
3.3.4	<i>Auftauen kryokonservierter eukaryontischer Zellen</i> .....	45
3.3.5	<i>Bestimmung der Zellzahl in einer Zellsuspension</i> .....	46
3.3.6	<i>Präparation von primären Hühnerembryo-Fibroblasten („chicken embryo fibroblasts“, CEF)</i> .....	47
3.4	VIROLOGISCHE METHODEN.....	48
3.4.1	<i>Virusamplifikation</i> .....	48
3.4.2	<i>Aufreinigung von Viren</i> .....	48
3.4.3	<i>Virustitration durch Immunfärbung</i> .....	49
3.4.4	<i>Herstellung rekombinanter Vakziniaviren MVA</i> .....	51
3.4.4.1	Transfektion MVA-infizierter Zellen mit einem Vektorplasmid.....	52
3.4.4.1.1	Transiente Transfektion zur Analyse der Genexpression.....	52
3.4.4.1.2	Stabile Transfektion zur Herstellung rekombinanter MVA-Viren.....	52
3.4.5	<i>Isolation rekombinanter MVA-Viren</i> .....	53
3.4.6	<i>Extraktion viraler DNA</i> .....	54
3.5	IMMUNBIOLOGISCHE METHODEN.....	55
3.5.1	<i>Immunisierung von Versuchstieren</i> .....	55
3.5.2	<i>Isolierung von murinen Lymphozyten</i> .....	55
3.5.3	<i>Herstellung von Lipopolysaccharid-Blasten (LPS-Blasten)</i> .....	56
3.5.4	<i>Anlegen einer Peptid-spezifischen T-Lymphozyten-Primärkultur</i> .....	56
3.5.5	<i>Anlegen einer T-Lymphozyten-Primärkultur mit MHV-68-infizierten Lymphozyten</i> .....	57
3.5.6	<i>Intrazelluläre Zytokinfärbung</i> .....	57
3.5.7	<i>Fluoreszenzdurchflusszytometrie (FACS-Analyse)</i> .....	58
3.5.8	<i>Chrom-Freisetzungsversuch</i> .....	59
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>61</b>
4.1	PRÄPARATION DER VIREN MVA-P <sub>7,5</sub> -HCV-CORE UND MVA-P <sub>7,5</sub> -HCV-1-830.....	61
4.2	KONSTRUKTION VON REKOMBINANTEM MVA-P <sub>7,5</sub> -HCV-NS3.....	62
4.2.1	<i>Klonierung des Vektorplasmids pIIIΔHR-P<sub>7,5</sub>-HCV-NS3</i> .....	63
4.2.2	<i>Nachweis der Synthese des NS3-Proteins durch pIIIΔHR-P<sub>7,5</sub>-HCV-NS3</i> .....	65
4.2.3	<i>Generierung von MVA-P<sub>7,5</sub>-HCV-NS3</i> .....	65
4.2.4	<i>In vitro Charakterisierung von MVA-NS3</i> .....	69
4.3	UNTERSUCHUNG VON HCV-SPEZIFISCHEN T-ZELLANTWORTEN IM MAUSMODELL.....	71
4.3.1	<i>Nachweis der Immunogenität der MVA-HCV-Vakzinen MVA-core und MVA-1-830 im Mausmodell</i> .....	71
4.3.1.1	Untersuchung der zellulären Immunantwort durch intrazelluläre Interferon-γ-Färbung.....	71
4.3.1.2	Nachweis HCV-core-spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten durch den Chrom-Freisetzungsversuch.....	74
4.3.2	<i>Auswirkung unterschiedlicher Immunisierungsintervalle auf die zelluläre Immunantwort</i> .....	75
4.3.3	<i>Nachweis der Immunogenität von MVA-NS3 im Mausmodell</i> .....	77
4.3.3.1	Untersuchung der zellulären Immunantwort durch intrazelluläre Interferon-γ-Färbung.....	77
4.3.3.2	Nachweis HCV-NS3-spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten durch den Chrom-Freisetzungsversuch.....	78
4.3.4	<i>Identifizierung eines immundominanten HLA-A*0201-restringierten HCV-NS3 CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Epitops</i> .....	80



4.3.5	<i>Steigerung der Immunogenität der MVA-Vakzinen durch heterologe Folgeimpfungen</i> .....	82
4.3.5.1	Steigerung der HCV-spezifischen Immunantwort durch heterologe DNA/MVA-Immunisierung .....	82
4.3.5.1.1	Klonierung des Vektorplasmids pcDNA-core .....	82
4.3.5.1.2	Nachweis der Synthese des HCV-core-Proteins durch pcDNA-core .....	84
4.3.5.1.3	Nachweis HCV-core-spezifischer T-Zellen durch heterologe DNA/MVA Immunisierung .....	85
4.3.5.2	Steigerung der HCV-spezifischen Immunantwort durch heterologe SFV/MVA-Immunisierung .....	87
4.3.5.3	Steigerung der HCV-spezifischen Immunantwort durch heterologe AdV/MVA-Immunisierung .....	91
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>93</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>101</b>
6.1	VERWENDETE ABKÜRZUNGEN .....	101
6.2	HCV-NS3 PEPTID-BIBLIOTHEK .....	105
6.3	AMINOSÄURESEQUENZ DES HEPATITIS C VIRUS NS3-PROTEINS .....	107
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>108</b>
<b>8</b>	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>122</b>

## Zusammenfassung

Die Infektion mit dem Hepatitis C Virus (HCV) gilt als eine der Hauptursachen für chronische Hepatitiden und führt häufig zu Leberzirrhose und Leberkarzinom. Weltweit sind etwa 200 Millionen Menschen mit diesem Virus infiziert. Die aktuelle Behandlung der Hepatitis C mit Ribavirin und Interferon- $\alpha$  ist langwierig, beeinträchtigt durch Nebenwirkungen und führt nur bei einem Teil der Patienten zur Heilung. Aus diesem Grund ist die Entwicklung eines präventiv oder therapeutisch einsetzbaren Impfstoffes gegen HCV-Infektionen sehr wünschenswert. Das hoch attenuierte und in seiner Vermehrungsfähigkeit extrem eingeschränkte modifizierte Vakziniavirus Ankara (MVA) gehört zu den viel versprechendsten Kandidaten für die Entwicklung neuartiger rekombinanter Virusimpfstoffe.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten erste rekombinante MVA-HCV-Viren auf ihre Eignung als Impfstoffe untersucht werden. Als Zielantigene dienten wichtige virale Strukturproteine, darunter das unter den HCV-Genotypen hoch konservierte Nukleokapsidprotein Core, sowie das Nichtstrukturprotein NS3, welches als regulatorisches Virusprotein im HCV-Replikationszyklus eine wichtige Rolle spielt, untersucht werden. Hierfür wurden die rekombinanten MVA-Viren MVA-P<sub>7.5</sub>-HCV-core (MVA-core) und MVA-P<sub>7.5</sub>-HCV-1-830 (MVA-1-830) eingesetzt, welche für die HCV-Strukturproteine codierende Gensequenzen unter der Kontrolle des Vakziniavirus-spezifischen Promotors P<sub>7.5</sub> exprimieren. Zusätzlich wurde ein weiteres rekombinantes Virus MVA-P<sub>7.5</sub>-HCV-NS3 (MVA-NS3) konstruiert, welches die Gensequenz für das HCV-Nichtstrukturprotein NS3 trägt. Alle Vektorviren erwiesen sich in *in vitro* Experimenten als genetisch stabil, erlaubten die Produktion der rekombinanten HCV-Antigene in infizierten Zielzellen und waren somit geeignet für *in vivo* Untersuchungen im Mausmodell.

Da HCV-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellantworten eine wichtige Rolle bei der Ausheilung einer Hepatitis C zugeschrieben wird, sollte insbesondere die Anregung dieser Immunantworten untersucht werden. Dabei zeigte sich, dass bereits eine einmalige Immunisierung mit MVA-core, MVA-1-830 oder MVA-NS3 ausreichend ist, um HCV-spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zellantworten zu induzieren. Diese CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten konnten *ex vivo* in Epitop-spezifischer Weise zur Interferon- $\gamma$ -Synthese stimuliert werden, ließen sich Antigen-spezifisch *in vitro* expandieren und waren in der Lage, HCV-spezifische Zielzellen zu erkennen und zu lysieren. Zudem konnte eine Steigerung der Immunantworten durch Mehrfachapplikation der MVA-Vakzinen erzielt werden.

Im Folgenden gelang es, die HCV-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellantworten durch kombinierte Applikation der MVA-Vakzinen mit anderen rekombinanten Virusimpfstoffen wie Semliki-Forest-Viren oder Adenoviren, sowie mit Plasmid-DNA weiter zu verstärken. Solche Impfstrategien sind viel versprechend, da sich die gemeinsame Komponente der eingesetzten, unterschiedlichen Vektorvakzinen auf die rekombinanten Antigene beschränkt und eine starke Immunreaktion auf diese Antigene angeregt wird.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass rekombinante MVA-Vektoren, die HCV-spezifische Antigene produzieren, dafür geeignet sind, um nach Impffapplikation HCV-spezifische zelluläre Immunantworten zu induzieren. Die im Tiermodell erarbeiteten, optimierten Immunisierungsstrategien liefern eine erste Grundlage für weitere Immunisierungsexperimente in Primatenmodellen und zur Planung erster klinischer Studien im Menschen.

## Summary

Infections with hepatitis C virus (HCV) are considered as one of the main causes for chronic hepatitis and often lead to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. About 200 million people worldwide are chronically infected with this virus. The current antiviral therapy relying on ribavirin and interferon- $\alpha$  is time consuming, often impaired by side effects and leads to resolution of the disease in only a part of the patients. For this reason, the development of a prophylactic or therapeutic vaccine against HCV infections is very desirable. The highly attenuated and replication deficient modified vaccinia virus Ankara (MVA) is one of the most promising candidates for development of new generation virus vaccines.

Purpose of this work was to evaluate first recombinant MVA-HCV viruses for their suitability as vaccines against hepatitis C. HCV structural proteins, amongst them the highly conserved core protein, as well as the non-structural protein NS3, which plays a key regulatory role in the HCV replication cycle, served as target antigens for MVA vaccine development.

First, we investigated recombinant MVA viruses MVA-P<sub>7.5</sub>-HCV-core (MVA-core) and MVA-P<sub>7.5</sub>-HCV-1-830 (MVA-1-830), which express the coding gene sequences for HCV structural proteins under control of the vaccinia virus specific promoter P<sub>7.5</sub>. Second, we constructed and characterized a recombinant virus MVA-P<sub>7.5</sub>-HCV-NS3 (MVA-NS3) that carries the gene sequence for the HCV non-structural protein NS3. As demonstrated by *in vitro* experiments, all vector viruses were genetically stable, permitted the production of recombinant HCV antigens in infected target cells and were thus suitable for *in vivo* experiments using mouse models.

Since HCV specific CD8<sup>+</sup> T cell responses are considered important in hepatitis C virus clearance, special emphasis was given to the analysis of induction of this kind of immune response. When tested in first vaccination experiments, already a single immunization with MVA-core, MVA-1-830 or MVA-NS3 was sufficient to induce HCV specific CD8<sup>+</sup> T cell responses. These CD8<sup>+</sup> T lymphocytes could be stimulated *ex vivo* in an epitope specific manner, resulting in interferon- $\gamma$  production, could be further expanded *in vitro* and were able to recognize and lyse HCV specific target cells. Additionally, multiple applications of the MVA vaccines resulted in an increase of these cellular immune responses.

In a final series of experiments, the possibility to further amplify HCV specific CD8<sup>+</sup> T cell responses could be demonstrated by using combined applications of MVA with other experimental gene transfer vaccines based on Semliki Forest virus, adenovirus or plasmid DNA.

Overall, the results of this work clearly suggest that recombinant MVA vectors delivering HCV specific antigens, are suitable candidate vaccines for induction of HCV specific cellular immune responses upon immunization. Importantly, the definition of optimized immunization strategies offers a rational basis for further immunization studies in primate models and for the conception of first clinical studies in humans.

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Hepatitis C Virus

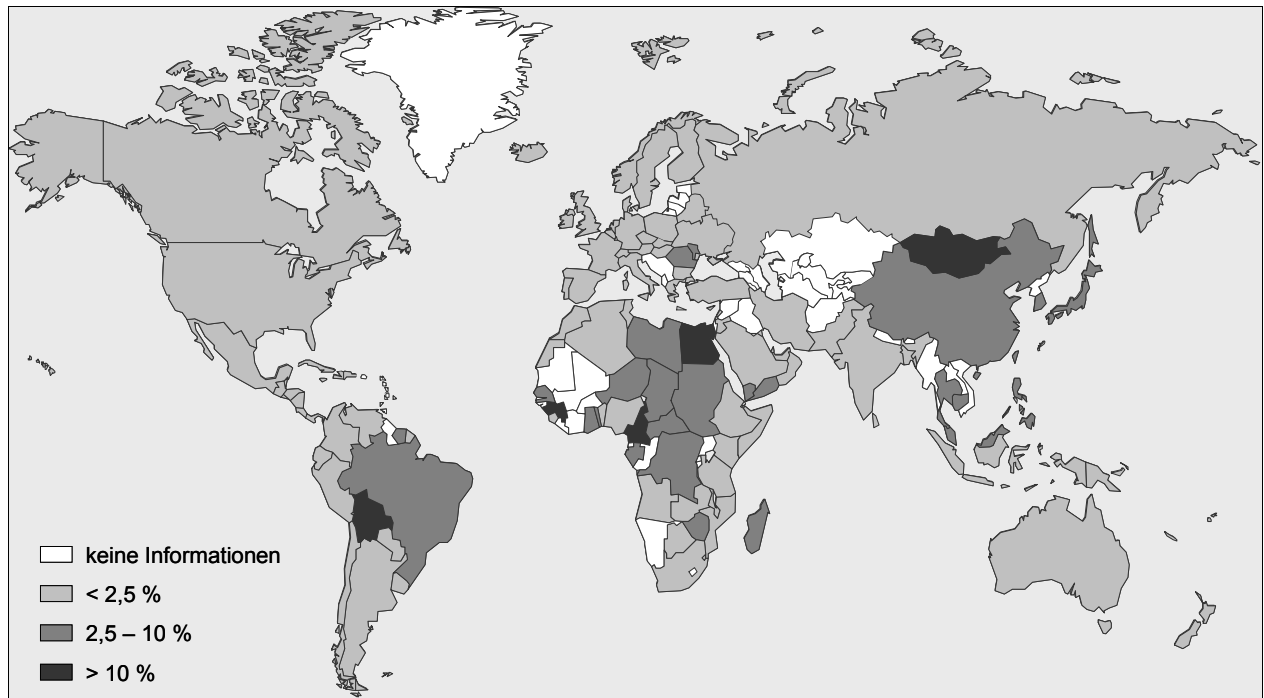
### 1.1.1 Epidemiologie

#### 1.1.1.1 Entdeckung des Hepatitis C Virus

In den 1970er Jahren wurden die Hepatitisviren A und B (HAV/HBV) als die Erreger entzündlicher Lebererkrankungen (Hepatitis) beschrieben. Trotz der Etablierung geeigneter Testverfahren, zeigten etwa 10 % der Personen, die Bluttransfusionen oder Blutprodukte (z.B. Gerinnungsfaktoren) erhielten, Symptome einer Hepatitis (*Feinstone, Kapikian et al. 1975*). Da diese weder auf Hepatitis A, noch auf Hepatitis B Viren zurückgeführt werden konnten, bezeichnete man das Krankheitsbild als Non-A-, Non-B-Hepatitis. Erst 1989 konnte der virale Erreger als Hepatitis C Virus (HCV) identifiziert werden (*Choo, Kuo et al. 1989*). Durch die Entwicklung einer Nachweismethode von anti-HCV-Antikörpern im Blut infizierter Personen (*Kuo, Choo et al. 1989*), konnte das Hepatitis C Virus als Hauptverursacher chronischer Non-A-, Non-B-Hepatitis ermittelt werden.

#### 1.1.1.2 Hepatitis C Prävalenz

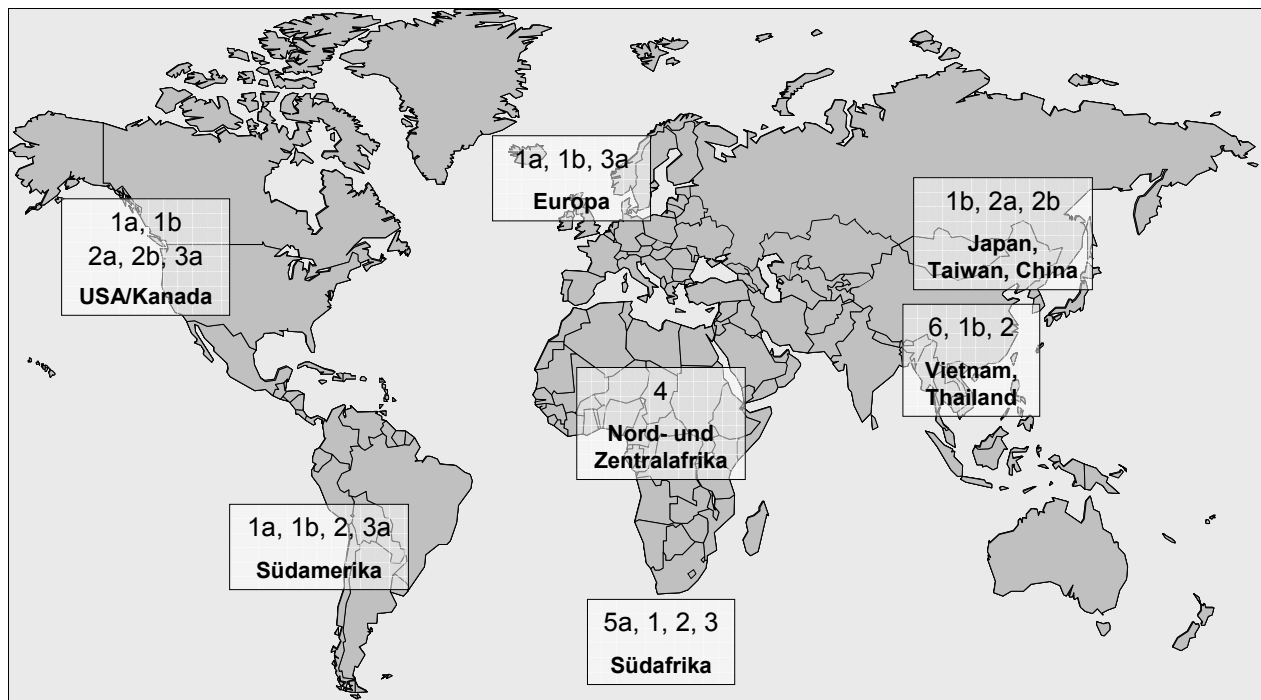
Die Hepatitis C hat weltweit eine große gesundheitsökonomische Bedeutung. Etwa 3 % der Weltbevölkerung ist mit dem Hepatitis C Virus infiziert. Dies entspricht mit etwa 200 Millionen Menschen der fünffachen Anzahl der weltweit mit HIV infizierten Personen (*WHO 2003*). Die Virusprävalenz beträgt von durchschnittlich 1 % in Europa (0,1 % in Deutschland) bzw. 1,8 % in den USA, bis zu 5,3 % auf dem afrikanischen Kontinent (*WHO 1999*). In einzelnen Ländern, wie z.B. Ägypten, sind bis zu 18,1 % der Bevölkerung infiziert (*siehe Abbildung 1, S. 9*). Es wird befürchtet, dass in den kommenden Jahren mehr Leute an den Folgen einer HCV-bedingten Erkrankung sterben, als durch AIDS (*Cohen 1999*).



**Abbildung 1: Globale Prävalenz des Hepatitis C Virus 2002. (WHO 2002)**

### 1.1.1.3 HCV-Genotypen

Derzeit sind weltweit mindestens sechs verschiedene HCV-Genotypen (1-6) mit mittlerweile mehr als 90 Subtypen (z.B. 1b, 3a) bekannt (*Simmonds, Holmes et al. 1993; Penin, Dubuisson et al. 2004*). In infizierten Personen kommt es zudem zur Ausbildung von so genannten „Quasispezies“ (*Martell, Esteban et al. 1992*). Diese hohe Variabilität im HCV-Genom ist darin begründet, dass die RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B (*siehe 1.1.2.2.2.6, S. 20*) des Hepatitis C Virus keine korrekturlesende Aktivität besitzt und somit eine Fehlerrate von  $\sim 1,5 \times 10^{-3}$  Basensubstituierungen pro Position und Jahr erreicht (*Okamoto, Kojima et al. 1992; Major, Mihalik et al. 1999*). Die weltweit größte Verbreitung besitzt der HCV-Subtyp 1b (*siehe Abbildung 2, S. 10*), jedoch spielt der HCV-Subtyp 3a vor allem unter intravenös (i.v.) injizierenden Drogenkonsumenten eine zunehmende Rolle (*Driesel, Wirth et al. 1994; Schreier, Roggendorf et al. 1996*).



**Abbildung 2: Globale Verteilung der verschiedenen HCV-Genotypen/Subtypen.** (Schreier und Höhne 2001)

#### 1.1.1.4 Übertragungswege

Das Hepatitis C Virus wird, nach derzeitigem Wissensstand (Juni 2004), ausschließlich auf parenteralem Wege übertragen, also durch direktes Einbringen des Erregers in die Blutbahn eines Empfängers. Dabei genügen bereits geringe Mengen Virus-RNA (< 20 Kopien) für eine erfolgreiche Infektion (Katayama, Kumagai et al. 2004). Zwar wurde virales Genmaterial bereits in Speichel, Schweiß, Tränen, Muttermilch und Samenflüssigkeit nachgewiesen, jedoch gilt eine Virusübertragung durch diese Körperflüssigkeiten als nicht sehr wahrscheinlich. Ein Großteil der heutigen Hepatitis C Patienten wurde vor der Etablierung geeigneter HCV-Nachweisverfahren (Nukleinsäure-Amplifikationstechnik, PCR) durch kontaminierte Bluttransfusionen oder Blutprodukte infiziert. Mittlerweile stellt der intravenöse (i.v.) Drogenmissbrauch die Hauptinfektionsquelle dar, da in diesem Personenkreis der gemeinsame Gebrauch von Nadeln bzw. Spritzen weit verbreitet ist (siehe Abbildung 3, S. 11). Eine Übertragung auf sexuellem Wege ist zwar scheinbar möglich, tritt jedoch nur in Einzelfällen auf. Ein erhöhtes Risiko konnte nur bei riskanten Sexualpraktiken festgestellt werden, bei denen eine Exposition gegenüber Blut nicht ausgeschlossen werden kann (Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2003). Bei mangelnder Hygiene bergen auch Tätowierungen, Piercing- oder Akupunktur-Behandlungen ein potenzielles Infektionsrisiko. Bei etwa 10 % der infizierten Personen lässt sich der Infektionsweg nicht anhand bekannter



Risikofaktoren nachvollziehen, jedoch ist unklar, ob es sich dabei um neue Übertragungswege handelt, oder ob die Patienten früheren Risikoereignissen (z.B. medizinische Behandlungen, gemeinsame Benutzung von Rasierern, usw.) ausgesetzt waren, die sie nicht als solche erkannt, bzw. vergessen haben.

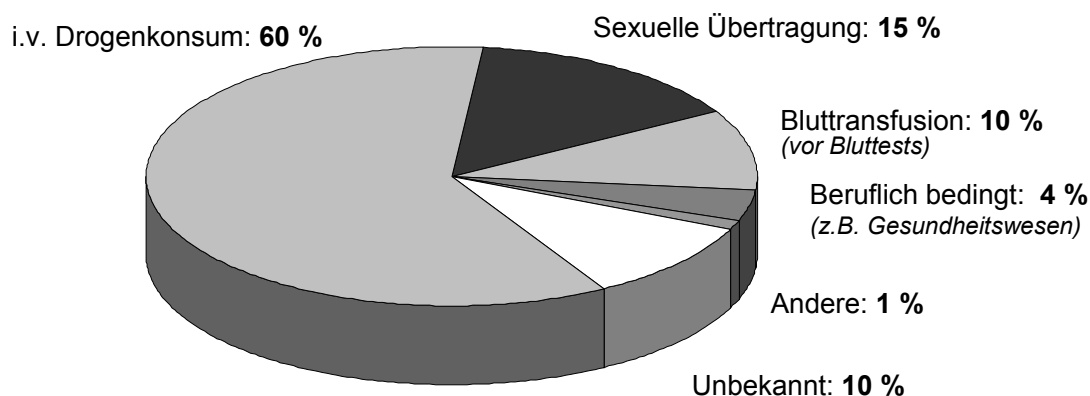


Abbildung 3: Übertragungswege der HCV-Infektion. (CDC 2003)

### 1.1.1.5 Krankheitsverlauf

Die Krankheit verläuft zunächst meist asymptomatisch und führt bei 75-85 % der Patienten zu einer chronischen Infektion. Innerhalb von etwa 20 Jahren entwickeln mindestens 20 % der chronisch infizierten Patienten eine Leberzirrhose\*, die in 1-5 % der Fälle zu Leberkrebs (hepatozelluläres Karzinom) führt (Saito, Miyamura et al. 1990). In den USA ist Hepatitis C mittlerweile die Hauptursache für Lebertransplantationen ("NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C: 2002").

### 1.1.1.6 Impfstoffentwicklung

Die große Prävalenz des Hepatitis C Virus und die hohe Wahrscheinlichkeit eines chronischen Verlaufs der HCV-Infektion, bedeuten eine enorme ökonomische Belastung. Allein in den USA verursacht Hepatitis C Kosten von bis zu 1,3 Milliarden Dollar pro Jahr (Brown und Gaglio 2003). Die aktuelle Behandlung von HCV-Infektionen mit Ribavirin (ein Guanosin-Analogon) und („pegyliertem“†) Interferon- $\alpha$  (Kozłowski, Charles et al. 2001) ist sehr langwierig (6-12 Monate), zeigt große Nebenwirkungen und führt nur in bis zu 75 % der Fälle (< 50 % bei Genotyp 1) zur Ausheilung der Hepatitis C (Gesundheitsberichterstattung

\* Narbige Schrumpfung der Leber

† Polyethylen-Glykol (PEG) gekoppelt

des Bundes 2003). Aus diesem Grund wäre ein präventiv oder therapeutisch einsetzbarer Impfstoff gegen HCV-Infektionen wünschenswert.

Die Entwicklung eines solchen Impfstoffes stellt allerdings eine große Herausforderung dar, da sie unter anderem durch technische Probleme behindert wird (EASL 1999). Bisherige Standardtechniken, wie z.B. die Verabreichung von attenuierten oder abgetöteten Viren, können bei Hepatitis C nicht eingesetzt werden, da sich *in vitro* nur sehr geringe Virusmengen amplifizieren lassen. Zudem schützt eine bereits ausgeheilte Hepatitis C Erkrankung nicht gegen eine Reinfektion mit homologen oder heterologen Virusisolaten (Farci, Alter et al. 1992), wodurch dieser Ansatz auch nur wenig Erfolg versprechend ist. Ein möglicher Grund hierfür ist, dass gerade die Hüllproteine (E1/E2) eine hohe Mutationsrate aufweisen.

Über den Infektions- und Replikationsmechanismus des Hepatitis C Virus ist bislang auch nur wenig bekannt, da noch kein befriedigendes *in vitro* Zellkultursystem existiert, welches eine Erforschung dieser Vorgänge ermöglicht.

Die *in vivo* Evaluierung von potenziellen anti-HCV-Impfstoffen wird dadurch erschwert, dass nur Menschen und Schimpansen mit HCV infizierbar sind. Der Einsatz von Schimpansen als *in vivo* Modell ist allerdings aus ethischen und finanziellen Gründen sehr limitiert. Die Entwicklung eines Kleintiermodells wäre deshalb dringend erforderlich. Erste Experimente mit Tupaias (*Tupaia belangeri chinensis*), einer Halbaffenart, zeigten zwar eine potenzielle Empfänglichkeit dieser Tiere für eine HCV-Infektion, jedoch ist diese nur wenig effizient und nur unter speziellen Bedingungen möglich (Xie, Riezu-Boj et al. 1998).

Da Patienten, die eine akute Hepatitis C ausgeheilt haben, eine starke und persistierende zelluläre Immunantwort gegen HCV-Antigene entwickelten (Lechner, Wong et al. 2000; Wertheimer, Miner et al. 2003), werden in einen Impfstoff, der HCV-spezifische T-Zellen induzieren kann, große Erwartungen gesetzt.

### 1.1.2 Aufbau des Viruspartikels

Das Hepatitis C Viruspartikel besitzt einen Durchmesser von etwa 50 nm und besteht aus einem ikosaedrischen Nukleokapsid (Core), welches von einer Virushülle ummantelt ist (Li, Jeffers et al. 1995). Die Virushülle besteht aus einer, vermutlich von der Wirtszelle stammenden, Lipidmembran, in die die heterodimerisierten Glykoproteine E1 und E2 eingebettet sind (siehe Abbildung 4, S. 13). Im Inneren des Nukleokapsids befindet sich das einzelsträngige RNA-Genom in Plusstrangorientierung, welches mit dem stark basischen Core-Protein in enger Wechselwirkung steht (Fan, Yang et al. 1999; Tanaka, Shimoike et al. 2000).

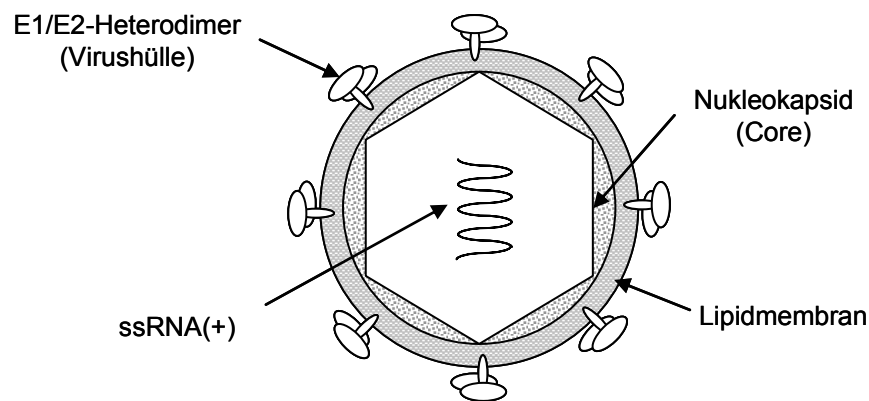


Abbildung 4: Aufbau des Hepatitis C Viruspartikels.

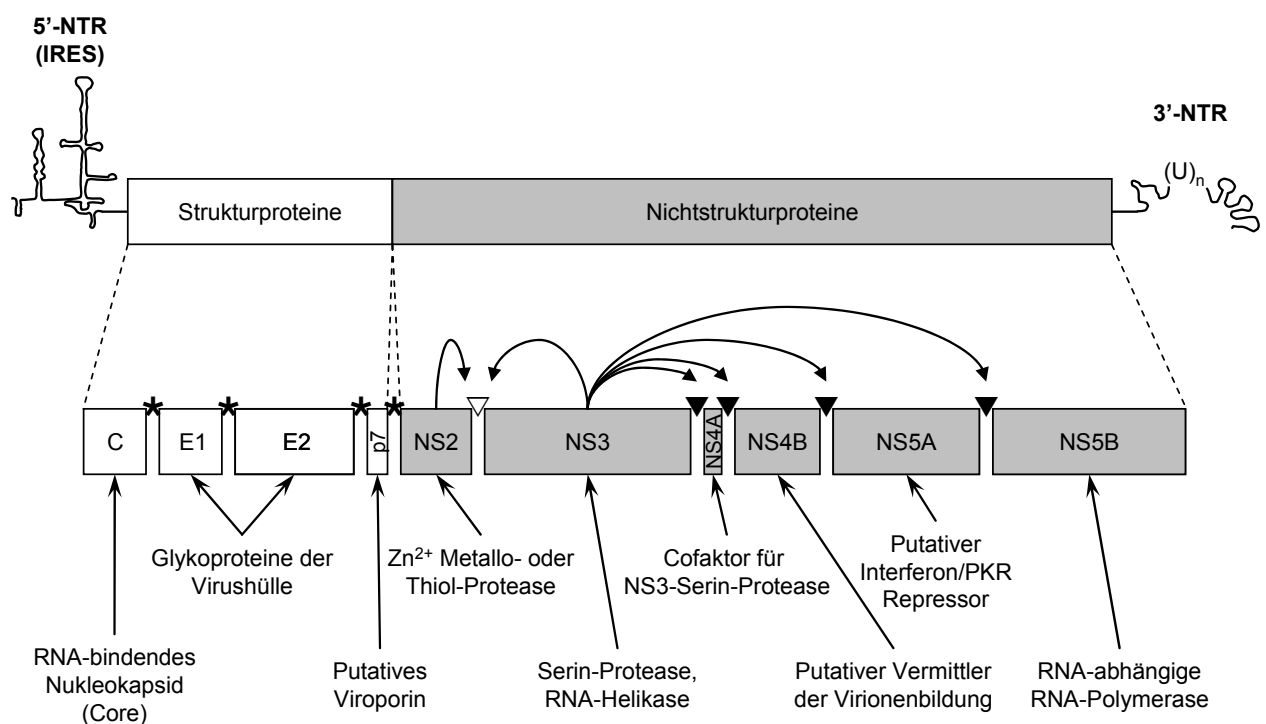
### 1.1.2.1 Genomorganisation

Das Genom des Hepatitis C Virus besteht aus einem einzelsträngigen RNA-Molekül mit etwa 9600 Nukleotiden (nt). Da die RNA in Plusstrangorientierung vorliegt, kann diese direkt als Matrize für die Translation viraler Proteine dienen und ist *per se* infektiös. Am 5'-Ende des RNA-Moleküls befindet sich eine 341 Nukleotide große, nichttranslatierte Region (NTR), welche unter den verschiedenen Genotypen hochkonserviert ist (~92 %) (Han, Shyamala *et al.* 1991; Kato 2001). Dies spricht für eine essenzielle Funktion der 5'-NTR. In der Tat konnte gezeigt werden, dass die 5'-NTR eine interne Ribosomenbindungsstelle (IRES) trägt (Tsukiyama-Kohara, Iizuka *et al.* 1992), die eine RNA-Modifikations- („Capping“)-unabhängige Translation der RNA ermöglicht (Wang, Sarnow *et al.* 1993; Rijnbrand, Bredenbeek *et al.* 1995). Zudem führt eine Bindung der IRES-Sequenz an die Ribosomen zu einer Konformationsänderung der ribosomalen 40S-Untereinheit und behindert so wahrscheinlich die Translation zellulärer mRNA (Spahn, Kieft *et al.* 2001). Die hohe Konservierung der 5'-NTR macht man sich bei der quantitativen Analyse der Viruslast durch die Nukleinsäure-Amplifikationstechnik (PCR) zu Nutze, indem man gegen diese Sequenz gerichtete Oligonukleotide verwendet (Kaneko, Murakami *et al.* 1992).

Am 3'-Ende des HCV-Genoms befindet sich ebenfalls eine nichtcodierende RNA-Sequenz (3'-NTR), die, abhängig vom Genotyp, aus etwa 40 variablen Nukleotiden, gefolgt von einem Poly-(U)/Polypyrimidintrakt und einer hochkonservierten, 98 Nukleotide umfassenden RNA-Sequenz besteht (Kolykhalov, Feinstone *et al.* 1996; Tanaka, Kato *et al.* 1996). Der 3'-NTR wird eine wichtige Rolle bei der Initiation der viralen Genomreplikation zugeschrieben (Shi und Lai 2001). Auf Grund seiner Struktur und der Genomorganisation wurde das Hepatitis C Virus als separates Genus (*Hepacivirus*) innerhalb der Familie der *Flaviviridae* klassifiziert.

### 1.1.2.2 Das HCV-Polyprotein

Unmittelbar an das nicht codierende 5'-Ende schließt sich ein einziger, großer offener Leserahmen an, der, je nach Genotyp, für die Synthese eines etwa 3000 Aminosäuren großen Vorläuferproteins codiert. Dieses Vorläuferprotein wird co- und posttranslational von zellulären und viralen Proteasen in zehn verschiedene Proteinprodukte prozessiert (siehe *Abbildung 5, S. 14*), wobei sich die HCV-Strukturproteine im aminoterminalen Drittel, die Nichtstrukturproteine (Enzyme) im carboxyterminalen Rest befinden (*Bartenschlager und Lohmann 2000*).



**Abbildung 5: Genomorganisation und Polyproteinprozessierung des Hepatitis C Virus.** Dargestellt ist die Struktur des HCV-RNA-Genoms und die aus dem Polyprotein stammenden Struktur- und Nichtstrukturproteine mit deren bekannten Funktionen. Angegeben sind die Schnittstellen zellulärer Proteasen (\*), der NS3/NS4A-Protease (▼) und die Stelle der autoproteolytischen NS2-NS3-Spaltung (▽).

### 1.1.2.2.1 HCV-Strukturproteine

#### 1.1.2.2.1.1 Core

Das Core-Protein ist das unter den verschiedenen HCV-Genotypen am höchsten konservierte Protein (Bukh, Purcell et al. 1994; Tokita, Kaufmann et al. 2000). Es befindet sich am aminoterminalen Ende des Vorläufer-Polypeptids und ist durch eine interne Signalsequenz vom E1 Protein abgegrenzt. Diese Signalsequenz vermittelt die Verlagerung des Polypeptids an die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER), wo das Core-Protein durch eine zelluläre Signalpeptidase am Übergang zum E1 Protein aus dem Vorläufer-Polypeptid herausgeschnitten wird. Dadurch entsteht die unreife Form des Core-Proteins (191 AS, p23), die noch die E1-Signalsequenz an seinem carboxyterminalen Ende trägt und damit in der Membran des ER verankert ist. Nach Abspaltung der Signalsequenz durch eine weitere, in der ER-Membran ansässige, zelluläre Signalpeptidase, wird die nun reife Form des Core-Proteins (179 AS, p21) von der Membran frei gesetzt (McLauchlan, Lemberg et al. 2002). Obwohl der Großteil von HCV-Core an die ER-Membran oder an Lipidtröpfchen im Zytoplasma infizierter Zellen gebunden ist, konnte die reife Form des Proteins (p21) auch im Nucleus nachgewiesen werden (Barba, Harper et al. 1997; Yasui, Wakita et al. 1998; Hope und McLauchlan 2000).

Dem Core-Protein werden verschiedenste Funktionen zugeschrieben, die in der Literatur aber kontrovers diskutiert werden und wahrscheinlich vom Virus-Genotyp und den jeweiligen untersuchten Zellen abhängig sind (Kato 2001). So soll das HCV-core Protein onkogenes Potenzial besitzen (Ray, Lagging et al. 1996; Chang, Yang et al. 1998; Moriya, Fujie et al. 1998), zelluläre und virale Gentranskription beeinflussen, sowie Apoptose verhindern und auf verschiedene Zellsignalwege einwirken können (Marusawa, Hijikata et al. 1999; Lai und Ware 2000; McLauchlan 2000).

Als gesichert gilt jedoch, dass das Core-Protein für die Ausbildung des Viruskapsids verantwortlich ist (siehe Abbildung 4, S. 13). Das stark basische Protein kann an das hochkonservierte 5'-Ende des viralen RNA-Genoms binden (Fan, Yang et al. 1999; Tanaka, Shimoike et al. 2000), sich zu homologen Multimeren komplexieren und so virusähnliche Partikel („virus like particles“, VLP) ausbilden (Matsumoto, Hwang et al. 1996; Majeau, Gagne et al. 2004). Zudem konnte eine Interaktion von HCV-core mit dem HCV-Hüllprotein E1 gezeigt werden (Lo, Selby et al. 1996).

Neuesten Erkenntnissen zufolge kann es bei der Translation des Core-Proteins *in vitro* zu einem Verschieben des Leserasters kommen („frameshift“), das, abhängig vom HCV-Genotyp, zur Synthese von alternativen „frameshifted“ Core-Proteinen (ARFP, „alternative

reading frame protein“) führt (Xu, Choi et al. 2001; Varaklioti, Vassilaki et al. 2002; Boulant, Becchi et al. 2003). Für den HCV-Genotyp 1 wurde ein alternatives Core-Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 16-17 kDa beschrieben, welches als ARFP, F, oder Core+1 bezeichnet wird (Vassilaki und Mavromara 2003). Da im Serum von HCV-infizierten Patienten Antikörper gegen ARFP gefunden wurden, scheint die Produktion von alternativen Core-Proteinen auch *in vivo* stattzufinden (Penin, Dubuisson et al. 2004). Die Struktur und Funktion dieser alternativen Proteine sind allerdings noch ungeklärt.

#### 1.1.2.2.1.2 E1+E2

Die HCV-Hüllproteine E1 und E2 (192 bzw. 363 AS bei HCV-1b) sind unter den HCV-Genotypen die variabelsten Proteine (bis zu 80 % Sequenzunterschiede) und werden ebenfalls durch eine in der ER-Membran lokalisierte zelluläre Signalpeptidase aus dem HCV-Polyprotein herausgeschnitten (Dubuisson, Penin et al. 2002). Es handelt sich dabei um (Typ I-)Transmembranproteine, die während der HCV-Replikation mit ihren hydrophoben, carboxyterminalen Transmembrandomänen in der ER-Membran verankert sind. Ihre großen aminoterminalen Ektodomänen werden im ER-Lumen stark glykosyliert (Op De Beeck, Cocquerel et al. 2001; Goffard und Dubuisson 2003).

E1 und E2 können durch Interaktion mit ihren Transmembrandomänen Heterodimere bilden, die durch nichtkovalente Bindungen stabilisiert werden (Op De Beeck, Montserret et al. 2000). Heterodimere E1E2-Aggregate, die sich durch Disulfidbindungen stabilisieren, stellen vermutlich fehlgefaltete Aggregate dar, die in der Wirtszelle degradiert werden (Choukhi, Ung et al. 1998; Op De Beeck, Cocquerel et al. 2001).

Die nichtkovalenten E1E2-Heterodimere, welche die Hülle des Hepatitis C Viruspartikels bilden (siehe Abbildung 4, S. 13), sind vermutlich für das Eindringen von HCV in Zielzellen verantwortlich (Bartosch, Dubuisson et al. 2003; Hsu, Zhang et al. 2003). Der HCV-Infektionszyklus ist noch in weiten Teilen unerforscht, allerdings wurden bereits einige zelluläre Oberflächenmoleküle, wie z.B. CD81 oder der LDL-Rezeptor identifiziert, welche mit E1 oder E2 interagieren können und sich so als potenzielle HCV-Rezeptoren bzw. Rezeptorbestandteile eignen (Pileri, Uematsu et al. 1998; Agnello, Abel et al. 1999; Monazahian, Bohme et al. 1999; Cocquerel, Kuo et al. 2003; Cormier, Tsamis et al. 2004; Zhang, Randall et al. 2004).

Dem E2-Protein wird zudem eine repressive Wirkung auf die durch dsRNA aktivierte Proteinkinase R (PKR) zugeschrieben und zeigt sich somit womöglich für die Interferon-Resistenz des Hepatitis C Virus mitverantwortlich (Taylor, Shi et al. 1999).

### 1.1.2.2.1.3 p7

Das aus 63 Aminosäuren (HCV-1b) bestehende Polypeptid p7 ist stark hydrophob und im HCV-Polyprotein zwischen E2 und NS2 lokalisiert. Obwohl die Prozessierung des Polyproteins zum Großteil noch während der Translation abgeschlossen wird, erfolgt die Spaltung am E2/p7- und p7/NS2-Übergang durch die im endoplasmatischen Retikulum lokalisierte Signalpeptidase erst mit deutlicher Verzögerung (*Lin, Lindenbach et al. 1994; Mizushima, Hijikata et al. 1994*). Da die Spaltung am E2/p7-Übergang zudem sehr ineffizient ist, kommt es neben den vollständig gespaltenen E2 und p7 Proteinen zu einer Anhäufung des E2-p7-Fusionsproteins, dessen Funktion bislang ungeklärt ist.

Das p7-Protein besitzt zwei Transmembrandomänen, die durch eine zytoplasmatische Schleife miteinander verbunden sind. Das amino- und carboxyterminale Ende zeigt dabei ins Innere des ER-Lumens (*Carrere-Kremer, Montpellier-Pala et al. 2002*). Es konnte gezeigt werden, dass sich das p7-Protein zu hexameren Komplexen assoziiert und so in Membranen zur Ausbildung eines Ionenkanals führt (*Griffin, Beales et al. 2003; Pavlovic, Neville et al. 2003*). Diese Eigenschaften deuten darauf hin, dass das p7-Protein zu den Viroporinen zählt, welche bei vielen RNA-Viren gefunden wurden und die beim Zusammenbau und Zellaustritt des Viruspartikels eine wichtige Rolle spielen (*Carrasco 1995; Harada, Tautz et al. 2000*).

## 1.1.2.2.2 HCV-Nichtstrukturproteine

### 1.1.2.2.2.1 NS2

Zwischen p7 und NS3 ist im HCV-Polyprotein das NS2-Protein lokalisiert, welches reich an hydrophoben Aminosäuren ist. Der größte Teil der 217 Aminosäuren (HCV-1b) umfassenden NS2-Sequenz trägt zusammen mit dem aminoterminalen Teil des NS3-Proteins zur Bildung der Zink-abhängigen NS2-NS3-Proteinase bei, deren einzig bekannte Funktion die autoproteolytische Spaltung am NS2-NS3-Übergang ist (*Penin, Dubuisson et al. 2004*).

### 1.1.2.2.2.2 NS3

Das NS3-Protein (631 AS bei HCV-1b) ist ein multifunktionales Enzym, welches in seinem aminoterminalen Drittel die Aktivität einer Serin-Protease (*Bartenschlager, Ahlborn-Laake et al. 1993*) und im carboxyterminalen Rest die Aktivität einer Helikase/NTPase beherbergt (*Suzich, Tamura et al. 1993; Kim, Gwack et al. 1995*).

Nach der autoproteolytischen Spaltung am NS2-NS3-Übergang (*siehe 1.1.2.2.1, S. 17*) wird die Serin-Protease-Domäne durch Assoziation mit NS4A stabilisiert. Dadurch wird die weitere proteolytische Prozessierung des HCV-Polyproteins an den Übergängen der Proteine NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/5A und NS5A/5B ermöglicht.

Der NS3-Helikase/NTPase-Domäne werden mehrere Funktionen zugeschrieben. Dazu gehören die durch RNA induzierte Nukleosidtriphosphatase-Aktivität, die RNA-Bindung und die Auflösung von RNA-Bereichen mit komplexen Sekundärstrukturen. Die dafür benötigte Energie bezieht das Enzym aus der Hydrolyse von ATP. Trotz umfangreicher röntgenkristallographischer Untersuchungen ist der genaue Funktionsmechanismus der NS3-Helikase weiter unklar. Interessanterweise scheint die NS3-Protease-Domäne auch ein Teil der RNA-Bindungsstelle der NS3-Helikase zu sein (*Kumar, Machida et al. 1997; Urvil, Kakiuchi et al. 1997*).

Neben diesen enzymatischen Aktivitäten wurden für das NS3-Protein vielfältige Interaktionen mit zellulären Elementen wie dem Tumorrepressorprotein p53 (*Ishido und Hotta 1998*), verschiedenen Proteinkinasen (*Borowski, Oehlmann et al. 1997; Borowski, Heiland et al. 1999*) und den Histonen H2B und H4 beschrieben (*Borowski, Kuhl et al. 1999*).

Durch seine vielfältigen Funktionen nimmt das NS3-Protein eine zentrale Rolle im HCV-Replikationszyklus ein. Die hohe Konservierung des NS3-Proteins unter den HCV-Genotypen ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass sich Mutationen in der NS3-Sequenz mit großer Wahrscheinlichkeit negativ auf seine enzymatischen Funktionen auswirken würden. Aus diesem Grund stellt das NS3-Protein ein attraktives Ziel für die Impfstoffentwicklung dar.

#### **1.1.2.2.3 NS4A**

Das nur 54 Aminosäuren (HCV-1b) große NS4A-Protein stabilisiert die NS3-Proteinase und ist somit ein essenzieller Cofaktor für deren Aktivität (*Kim, Morgenstern et al. 1996*). Das hydrophobe, aminoternale Ende des NS4A-Proteins scheint zudem ein Transmembransegment zu beinhalten, welches die Bindung von NS3 an die ER-Membran vermittelt (*Wolk, Sansonno et al. 2000*). Dadurch wird sichergestellt, dass die weitere Spaltung des HCV-Polyproteins (*siehe Abbildung 5, S. 14*) durch die NS3-NS4A-Proteinase zuverlässig erfolgen kann.

#### **1.1.2.2.4 NS4B**

Das 261 Aminosäuren (HCV-1b) umfassende, hydrophobe Protein NS4B ist ein integrales Membranprotein, welches cotranslational in die ER-Membran eingelagert wird (*Hugle,*



*Fehrmann et al. 2001*). Die Funktion von NS4B ist noch weitgehend unklar. Allerdings wurde beobachtet, dass sich durch NS4B-Expression im Zytosol der Zelle die Ausbildung von netzartigen Membranstrukturen induzieren lässt (*Egger, Wolk et al. 2002*). Diese bestehen vermutlich aus Bestandteilen des endoplasmatischen Retikulums (ER) und beinhalten sowohl alle viralen Struktur- und Nichtstrukturproteine, als auch virale RNA (*Gosert, Egger et al. 2003*). Aus diesem Grund wird für NS4B eine wichtige Rolle bei der HCV-Virionenbildung angenommen.

#### **1.1.2.2.2.5 NS5A**

Die Funktion des aus 447 Aminosäuren (HCV-1b) bestehenden NS5A-Proteins ist nach wie vor unklar. Trotz seiner funktionalen Kernlokalisationssequenz kommt NS5A hauptsächlich membranassoziiert im Zytoplasma vor (*Ide, Zhang et al. 1996; Song, Nagano-Fujii et al. 2000*). NS5A ist ein Phosphoprotein, welches in einer wenig phosphorylierten (~56 kDa) und einer hyperphosphorylierten Form (~58 kDa) vorliegen kann (*Kaneko, Tanji et al. 1994; Tanji, Kaneko et al. 1995*). Für die Entstehung der hyperphosphorylierten Form scheint die Gegenwart von NS3, NS4A und NS4B erforderlich zu sein (*Koch und Bartenschlager 1999; Neddermann, Clementi et al. 1999*). Ein dem HCV-NS5A entsprechendes Protein konnte auch bei anderen *Flaviviridae*, wie dem Gelbfiebervirus oder BVDV (Virus der bovinen Virusdiarrhoe) nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung dieser Proteine erfolgt durch eine bislang unbekannte Serin/Threonin-Kinase. Da diese Eigenschaften genusübergreifend (*Flavivirus, Pestivirus, Hepacivirus*) konserviert sind, wird dem NS5A-Protein eine vom Phosphorylierungsstatus abhängige, wichtige Funktion im HCV-Replikationszyklus zugeschrieben (*Reed, Gorbalenya et al. 1998*).

Es wurde beobachtet, dass NS5A die antivirale Wirkung von Interferon- $\alpha$  inhibieren kann. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass sich NS5A an die katalytische Domäne der durch dsRNA aktivierten Proteinkinase R (PKR) anlagern kann und diese somit hemmt (*Gale, Korth et al. 1997; Gale, Blakely et al. 1998*). Die Aktivierung der PKR würde zu einer Phosphorylierung des eukaryontischen Initiationsfaktors für die Proteinsynthese eIF2 $\alpha$  führen, wodurch die Proteinbiosynthese und somit auch die Virusreplikation blockiert werden würde. Anderen Studien zufolge wird die durch NS5A vermittelte Interferonresistenz durch PKR-unabhängige Mechanismen induziert (*Francois, Duverlie et al. 2000; Podelvin, Sabile et al. 2001*). So wurde für NS5A eine Interaktion mit der 2',5'-Oligoadenylatsynthetase (2',5'-OAS) beschrieben, welche sich für den Interferon-induzierten Abbau viraler RNA verantwortlich zeigt (*Taguchi, Nagano-Fujii et al. 2004*).

#### 1.1.2.2.2.6 NS5B

Relativ gut charakterisiert ist das 591 Aminosäuren (HCV-1b) umfassende NS5B-Protein, welches das carboxyterminale Ende des HCV-Polyproteins und die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase darstellt (RaRP). NS5B wird posttranslational mit seinem hydrophoben, carboxyterminalen Ende in der Membran des endoplasmatischen Retikulums verankert. Dabei ist die enzymatisch funktionale Domäne ins Zytosol gerichtet (*Schmidt-Mende, Bieck et al. 2001*).

Da das HCV-Genom als positivsträngige RNA vorliegt, erfolgt die Replikation des HCV-Genoms über ein intermediäres, negativsträngiges RNA-Molekül, welches als Matrize dient. Die RNA-Replikation erfolgt durch eine von Primerstrukturen unabhängige Initiation durch *de novo* Synthese (*Butcher, Grimes et al. 2001; Bressanelli, Tomei et al. 2002*). Die RNA-abhängige RNA-Polymerase besitzt keine korrekturlesende Aktivität, wodurch sich im HCV-Genom bis zu  $\sim 1,5 \times 10^3$  Basensubstituierungen pro Position und Jahr manifestieren (*Okamoto, Kojima et al. 1992; Major, Mihalik et al. 1999*). Ob die neusynthetisierten RNA-Stränge in gepaarter Form mit der Matrize als dsRNA freigesetzt werden, oder ob die RNA als Einzelstrang-Molekül von der RaRP freigesetzt wird ist noch ungeklärt.

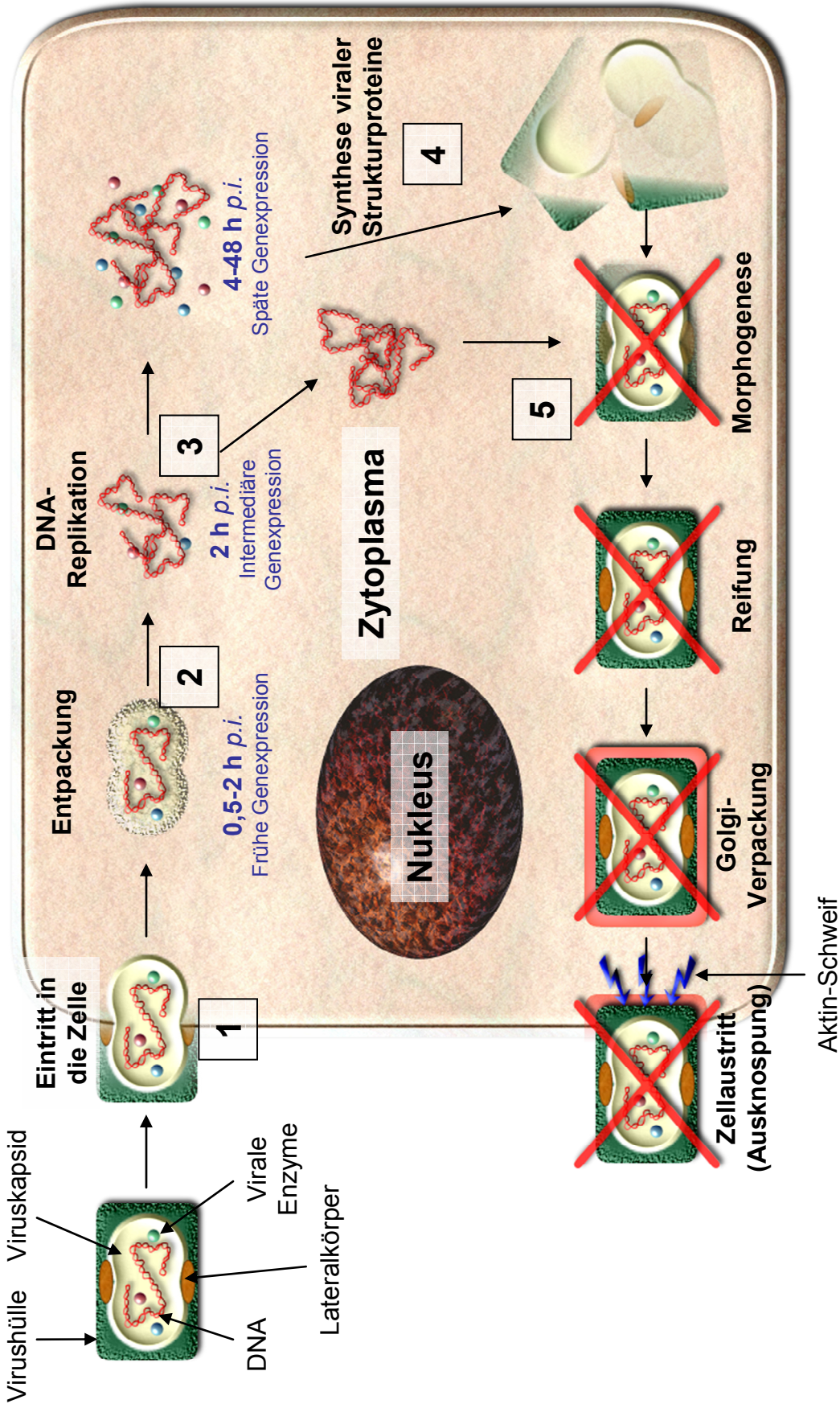
## 1.2 Das modifizierte Vakziniavirus Ankara (MVA) als Impfvektor

Durch den Einsatz von Impfstoffen kann in immunisierten Personen ein präventiver Schutz aufgebaut werden, der diese bei Kontakt mit dem jeweiligen Erreger vor einer Infektion schützt. Als besonders erfolgreich im Aufbau einer protektiven Immunität haben sich so genannte Lebendimpfstoffe erwiesen. Dabei handelt es sich meist um replikationsfähige, aber in ihrer Virulenz stark abgeschwächte (attenuierte) Viren, die in der Lage sind, bestimmte Zellen zu infizieren und dort die Synthese viraler Proteine zu induzieren. Dadurch wird der Verlauf einer natürlichen Infektion mit verminderter Pathogenität simuliert und zelluläre (T-Zell)-Immunantworten werden induziert. Der Erfolg dieser Impfmethode spiegelt sich unter anderem auch darin wieder, dass Pocken als erste Viruserkrankung durch den Einsatz von attenuierten Vakziniaviren (u.a. MVA) weltweit ausgerottet werden konnten (*Fenner 1980*).

Eine viel diskutierte Variante der Lebendimpfung stellt der Einsatz rekombinanter Viren dar, mit denen die immunologische Reaktion auf ausgewählte Proteine des Erregers erweitert werden kann. Das hoch attenuierte und in seiner Vermehrungsfähigkeit extrem eingeschränkte

modifizierte Vakziniavirus Ankara (MVA) gehört zu den viel versprechendsten Kandidaten für die Entwicklung neuartiger rekombinanter Impfstoffe. Die in humanen Zellen replikationsdefizienten MVA-Viren erlauben eine effiziente Expression rekombinanter Gene, induzieren Antigen-spezifische Immunantworten (Antikörper- und zellvermittelte Immunität) nach Impfabplikation und bieten ein hohes Maß an biologischer Sicherheit, was auch im Hinblick auf den klinischen Einsatz relevant ist. Dabei lassen sich die Antigen-spezifischen Immunantworten durch kombinierte Applikation der MVA-Viren mit anderen Vektorvakzinen wie z.B. DNA (Amara, Villinger et al. 2001; Gherardi, Perez-Jimenez et al. 2004), oder Semliki-Forest-Viren (Nilsson, Makitalo et al. 2001; Hanke, Barnfield et al. 2003) weiter verstärken. Die protektive Wirkung von MVA als rekombinante Vakzine wurde schon in verschiedenen Tiermodellen für einige Viruserkrankungen gezeigt (Sutter, Wyatt et al. 1994; Bender, Rowe et al. 1996; Amara, Villinger et al. 2002).

Das zum Genus *Orthopoxviridae* gehörende MVA-Virus wurde nach über 516 seriellen Passagen auf Hühnerembryo-Fibroblasten („*chicken embryo fibroblasts*“, CEF) aus dem Ursprungsvirus „Chorioallantois Vakziniavirus Ankara“ (CVA) generiert (Mayr, Hochstein-Mintzel et al. 1975). Während dieser Passagen manifestierte sich ein stark attenuierter Phänotyp, der maßgeblich aus dem Verlust von etwa 15 % des ursprünglichen CVA-Genoms resultierte. Diese Deletionen traten hauptsächlich in sechs großen Regionen des Virusgenoms auf und betrafen vorwiegend Gene, die für die Regulation der Virus/Wirt-Interaktion verantwortlich sind (Meyer, Sutter et al. 1991; Wyatt, Carroll et al. 1998). Dadurch ergibt sich für MVA ein massiv eingeschränktes Wirtsspektrum, das sich auf Hühnerembryo-Fibroblasten und die Hamsternierenzelllinie BHK-21 beschränkt (Carroll und Moss 1997; Drexler, Heller et al. 1998). MVA besitzt zwar noch die Fähigkeit die meisten Säugerzellen zu infizieren, eine Infektion verläuft dann allerdings immer abortiv ohne die Produktion neuer Virionen (siehe Abbildung 6, S. 22). Diese *in vitro* beobachtete Replikationsdefizienz des MVA-Virus konnte auch *in vivo* gezeigt werden. So wurde die Avirulenz von MVA z.B. in adulten, neugeborenen oder bestrahlten Mäusen (Werner, Jentsch et al. 1980; Meyer, Sutter et al. 1991), sowie in immunsupprimierten Makaken (Stittelaar, Kuiken et al. 2001) und HIV-infizierten Personen (Cosma, Nagaraj et al. 2003) bestätigt. Da MVA trotz seiner enormen Replikationsdefizienz sowohl virale, als auch rekombinante Gene sehr effizient exprimieren kann, bietet sich MVA als attraktiver Impfvektor an (Sutter und Moss 1992).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des Replikationsdefektes von MVA in Säugerzellen.** Da Pockenviren im Zytoplasma ihrer Wirtszelle replizieren, enthalten MVA-Virionen neben ihrem doppelsträngigen DNA-Genom noch Transkriptionsfaktoren und Enzyme. Nach dem Eindringen (1) in die Wirtszelle wird der Inhalt der Virionen ins Zytoplasma entlassen (2). Dort können schon früh mRNAs transkribiert werden, welche der Synthese von frühen viralen Proteinen z.B. für die Transkriptionskontrolle und DNA-Replikation dienen (3). Im Verlauf der Infektion wird die virale DNA repliziert und MVA-Strukturproteine werden synthetisiert (4). In den nichtpermissiven Säugerzellen ist die Virus-Morphogenese blockiert und es können keine neuen Virionen gebildet werden (5). (Abgewandelte Darstellung aus Moss (2001))

## 2 Materialien

### 2.1 Chemikalien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Bezugsquelle</i>
<b>2-Mercaptoethanol</b>	Sigma ( <i>München</i> )
<b>Agarose</b>	Gibco/BRL ( <i>Eggenstein</i> )
<b>Ammoniumperoxodisulfat (APS)</b>	Merck ( <i>Darmstadt</i> )
<b>Bacto Agar</b>	Difco Laboratories ( <i>Detroit, USA</i> )
<b>Bromphenolblau</b>	Serva ( <i>Heidelberg</i> )
<b>Casein-Hydrolysat</b>	Gibco/BRL ( <i>Eggenstein</i> )
<b>Chloroform</b>	Merck ( <i>Darmstadt</i> )
<b>Coomassie-Blau G250</b>	Sigma ( <i>München</i> )
<b>D(+)-Glucose</b>	Merck ( <i>Darmstadt</i> )
<b>DMSO</b>	Merck ( <i>Darmstadt</i> )
<b>DTE</b>	Serva ( <i>Heidelberg</i> )
<b>DTT</b>	Serva ( <i>Heidelberg</i> )
<b>EDTA</b>	Sigma ( <i>München</i> )
<b>Ethidiumbromid</b>	Serva ( <i>Heidelberg</i> )
<b>Ethylenglykol</b>	Sigma ( <i>München</i> )
<b>Glyzerin</b>	Roth ( <i>Karlsruhe</i> )
<b>Harnstoff</b>	Roth ( <i>Karlsruhe</i> )
<b>Hydroxyharnstoff</b>	Merck ( <i>Darmstadt</i> )
<b>Isoamylalkohol</b>	Merck ( <i>Darmstadt</i> )
<b>Magermilchpulver</b>	Töpfer ( <i>Dietmannsried</i> )
<b>N,N'-Bisacrylamid</b>	Serva ( <i>Heidelberg</i> )
<b>NP-40</b>	Serva ( <i>Heidelberg</i> )
<b>o-Dianisidine</b>	Sigma ( <i>München</i> )
<b>Phenol</b>	Roth ( <i>Karlsruhe</i> )
<b>SDS</b>	Serva ( <i>Heidelberg</i> )
<b>TEMED</b>	Bio-Rad ( <i>München</i> )

<b>Tris</b>	Roth ( <i>Karlsruhe</i> )
<b>Triton X-100</b>	Sigma ( <i>München</i> )
<b>Trypanblau</b>	Biochrom KG ( <i>Berlin</i> )
<b>Tween 20</b>	Sigma ( <i>München</i> )
<b>Yeast Extract</b>	Gibco/BRL ( <i>Eggenstein</i> )

**Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquellen.**

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

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>3MM-Papier</b>	Whatman ( <i>Maidstone, USA</i> )
<b>Einwegpipetten „Cellstar“ (1 - 25 ml)</b>	Greiner ( <i>Nürtingen</i> )
<b>Elektrotransformationsküvetten</b>	Bio-Rad ( <i>München</i> )
<b>Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)</b>	BD Biosciences ( <i>Bedford, USA</i> )
<b>Injektionskanülen (Sterican Gr.20)</b>	Braun ( <i>Melsungen</i> )
<b>Injektionsspritzen (Omnifix-F 1 ml)</b>	Braun ( <i>Melsungen</i> )
<b>LumaPlate®-96 Szintillationsplatte</b>	Packard ( <i>Meriden, USA</i> )
<b>Nitrozellulosefilter</b>	Schleicher & Schuell ( <i>Dassel</i> )
<b>Nylonmembran</b>	Du Pont ( <i>Boston, USA</i> )
<b>Röntgenfilme (BioMax MR)</b>	Kodak ( <i>Cedex, Frankreich</i> )
<b>Sterilfilter (Minisart 0,2-0,45 µm)</b>	Sartorius AG ( <i>Göttingen</i> )
<b>Ultrazentrifugenröhrchen (UltraClear)</b>	Beckman ( <i>München</i> )
<b>Zellkulturplatten / -flaschen</b>	Greiner ( <i>Nürtingen</i> ), Corning Inc. ( <i>New York, USA</i> ) Nunc ( <i>Wiesbaden</i> )
<b>Zellsiebe (Falcon 100 µm)</b>	BD Biosciences ( <i>Bedford, USA</i> )

**Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien und deren Bezugsquellen.**

## 2.3 Kits

<i>Bezeichnung</i>	<i>Bezugsquelle</i>
<b>BD Cytotfix/Cytoperm</b>	BD Pharmingen ( <i>Hamburg</i> )
<b>EndoFree Plasmid Mega Kit</b>	QIAGEN ( <i>Hilden</i> )
<b>FuGENE 6® Transfektions-Reagenz</b>	Roche ( <i>Mannheim</i> )
<b>Lumi-Light® (Western-Blot Substrat)</b>	Roche ( <i>Mannheim</i> )
<b>PCR-Master-Mix</b>	Roche ( <i>Mannheim</i> )
<b>QIAGEN Plasmid Maxi Kit</b>	QIAGEN ( <i>Hilden</i> )
<b>QIAquick Gel Extraction Kit</b>	QIAGEN ( <i>Hilden</i> )

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Kits und deren Bezugsquellen.

## 2.4 Radiochemikalien

Radioaktives Di-Natriumchromat ( $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ ) wurde von der Firma *Hartmann-Analytic* (*Braunschweig*) bezogen und in PBS-Puffer auf 0,5 mCi/ml eingestellt.

## 2.5 Biochemikalien, Enzyme & Medien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Bezugsquelle</i>
<b><math>\beta_2</math>-Mikroglobulin (<i>human</i>)</b>	Sigma ( <i>München</i> )
<b>1 Kb DNA-Größenstandard</b>	NEB BioLabs ( <i>Schwalbach</i> )
<b>Alkalische Phosphatase</b>	Roche ( <i>Mannheim</i> )
<b>Alphamedium (<math>\alpha</math>MEM) (1x)</b>	Biochrom KG ( <i>Berlin</i> )
<b>Ampicillin</b>	Serva ( <i>Heidelberg</i> )
<b>BMS (<i>Basal Medium Supply</i>)</b>	Biochrom KG ( <i>Berlin</i> )
<b>Desoxy- und Ribonukleotide</b>	Roche ( <i>Mannheim</i> )
<b>Dextransulfat</b>	Sigma ( <i>München</i> )
<b>DMEM</b>	Cambrex, BioWhittaker ( <i>Verviers, Belgien</i> )
<b>EMEM</b>	Cambrex, BioWhittaker ( <i>Verviers, Belgien</i> )
<b>FBS (<i>Fetal Bovine Serum</i>)</b>	Biochrom KG ( <i>Berlin</i> )
<b>Geneticin</b>	Sigma ( <i>München</i> )
<b>Gentamycin</b>	Roche ( <i>Mannheim</i> )

<b>Klenow-Enzym</b>	Roche ( <i>Mannheim</i> )
<b>Laktalbumin</b>	Invitrogen GmbH ( <i>Karlsruhe</i> )
<b>L-Glutamin</b>	Serva ( <i>Heidelberg</i> )
<b>LPS (Lipopolysaccharid) [<i>Salmonella typhosa</i>]</b>	Sigma ( <i>München</i> )
<b>Pen-Strep (10000 u Penicillin/ml, 10 mg/ml Streptomycin)</b>	Cambrex, BioWhittaker ( <i>Verviers, Belgien</i> )
<b>Protein-Größenstandard „BroadRange“ (6-175 kDa)</b>	NEB BioLabs ( <i>Schwalbach</i> )
<b>Pwo-DNA-Polymerase</b>	Roche ( <i>Mannheim</i> )
<b>Restriktionsendonukleasen</b>	Roche ( <i>Mannheim</i> ), NEB BioLabs ( <i>Schwalbach</i> )
<b>Ribonuklease aus Rinderpankreas</b>	Roche ( <i>Mannheim</i> )
<b>Rinderserumalbumin (BSA)</b>	Sigma ( <i>München</i> )
<b>RPMI 1640 (1x)</b>	Biochrom KG ( <i>Berlin</i> )
<b>T4-DNA-Ligase</b>	Roche ( <i>Mannheim</i> )
<b>Trypsin-EDTA (1x)</b>	Invitrogen GmbH ( <i>Karlsruhe</i> )
<b>Ultraglutamin 1</b>	Cambrex, BioWhittaker ( <i>Verviers, Belgien</i> )

**Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Biochemikalien, Enzyme & Medien und deren Bezugsquellen.**

Alle nicht gesondert aufgeführten Biochemikalien, Enzyme und Medien wurden von Roche (*Mannheim*), NEB BioLabs (*Schwalbach*) oder Sigma (*München*) bezogen.

## 2.6 Plasmide

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

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>pcDNA I/Amp</b>	Invitrogen GmbH ( <i>Karlsruhe</i> )
<b>pIIIΔHR-P<sub>7.5</sub></b>	War in unserem Labor bereits vorhanden. (Staub, Lowel et al. 2003)

**Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Vektorplasmide und deren Bezugsquellen.**



## 2.7 Viren

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten MVA-Viren standen in unserem Labor bereits zur Verfügung. Von diesen wurden frische Viruspräparationen angefertigt (*siehe 3.4.1, S. 48*) und die jeweiligen Titer durch Immunfärbung bestimmt (*siehe 3.4.3, S. 49*).

<b>Bezeichnung</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Quelle</b>
<b>AdV-wt</b> <b>AdV-CE1</b> <b>AdV-NS3</b>	Adenovirus (Wildtyp) (rekombinant für HCV-core+E1) (rekombinant für HCV-NS3) ( <i>Bruna-Romero, Lasarte et al. 1997;</i> <i>Arribillaga, de Cerio et al. 2002</i> )	Drs. Juan José Lasarte, Juan Ruiz ( <i>Universidad de Navarra,</i> <i>Pamplona, Spanien</i> )
<b>MHV-68-wt</b> <b>MHV-68-core</b> <b>MHV-68-NS3</b>	Murines Gammaherpesvirus-68 (Wildtyp) (rekombinant für HCV-core) (rekombinant für HCV-NS3)	Susanne El-Gogo, Dr. Heiko Adler ( <i>GSF-München-Neuherberg</i> )
<b>MVA-P<sub>7.5</sub>-HCV-1-830</b> <b>(MVA-1-830)</b>	Rekombinantes MVA für die Strukturproteine des Hepatitis C 1b Virus (AS 1-830) unter Kontrolle des Vakzinia- viruspromotors P <sub>7.5</sub>	<i>War in unserem Labor</i> <i>bereits vorhanden.</i>
<b>MVA-P<sub>7.5</sub>-HCV-core</b> <b>(MVA-core)</b>	Rekombinantes MVA für das Kernprotein des Hepatitis C 1b Virus (AS 1-191) unter Kontrolle des Vakziniviruspromotors P <sub>7.5</sub>	<i>War in unserem Labor</i> <i>bereits vorhanden.</i>
<b>MVA-F6</b>	Wildtypvirus, Isolat F6 ( <i>Mayr und Munz 1964</i> )	<i>War in unserem Labor</i> <i>bereits vorhanden.</i>
<b>MVA-II<sub>new</sub></b> <b>(MVA-wt)</b>	Wildtypvirus basierend auf MVA-F6 ( <i>Staib, Lowel et al. 2003</i> )	<i>War in unserem Labor</i> <i>bereits vorhanden.</i>
<b>MVA-P<sub>7.5</sub>-HCV-NS3</b> <b>MVA-NS3</b>	Rekombinantes MVA für das Nichtstrukturprotein NS3 des Hepatitis C 1b Virus (AS 1028-1658) unter Kontrolle des Vakziniviruspromotors P <sub>7.5</sub>	<i>Siehe 4.1, S. 61</i>
<b>MVA-T7pol</b> <b>(MVA-T7)</b>	Rekombinantes MVA für die RNA- Polymerase des Bakteriophagen T7 ( <i>Sutter, Ohlmann et al. 1995</i> )	<i>War in unserem Labor</i> <i>bereits vorhanden.</i>
<b>SFV-wt</b> <b>SFV-core</b> <b>SFV-NS3</b>	Semliki-Forest-Virus (Wildtyp) (rekombinant für HCV-core) (rekombinant für HCV-NS3) ( <i>Vidalin, Fournillier et al. 2000; Brinster,</i> <i>Chen et al. 2002</i> )	Drs. Christina Barnfield, Peter Liljeström ( <i>Karolinska Institutet,</i> <i>Stockholm, Sweden</i> )

**Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Viren.**

## 2.8 Antikörper

<i>Antikörperspezifität</i>	<i>Konjugat</i>	<i>Isotyp</i>	<i>Einsatzzweck</i>	<i>Bezugsquelle</i>
<b>Anti-HCV</b>	-	Kaninchen polyklonal	Primärantikörper	Antigenix America Inc. (USA)
<b>Anti-Mouse CD16/CD32 (monoklonal)</b>	-	Rat IgG <sub>2b</sub>	F <sub>c</sub> -Block	BD Pharmingen (Hamburg)
<b>Anti-Mouse CD4 (monoklonal)</b>	PerCP	Rat IgG <sub>2a</sub> , κ	FACS-Färbung	BD Pharmingen (Hamburg)
<b>Anti-Mouse CD4 (monoklonal)</b>	FITC	Rat IgG <sub>2a</sub> , κ	FACS-Färbung	BD Pharmingen (Hamburg)
<b>Anti-Mouse CD62L (monoklonal)</b>	APC	Rat IgG <sub>2a</sub> , κ	FACS-Färbung	BD Pharmingen (Hamburg)
<b>Anti-Mouse CD8a (monoklonal)</b>	PE	Rat IgG <sub>2a</sub> , κ	FACS-Färbung	BD Pharmingen (Hamburg)
<b>Anti-Mouse IFN-γ (monoklonal)</b>	FITC	Rat IgG <sub>1</sub>	FACS-Färbung	BD Pharmingen (Hamburg)
<b>Anti-Rabbit IgG</b>	Peroxidase	Ziege polyklonal	Sekundärantikörper	Dianova (Hamburg)
<b>Anti-Rat IgG<sub>1</sub>, κ (monoklonal)</b>	FITC	Rat IgG <sub>1</sub> , κ	FACS-Färbung	BD Pharmingen (Hamburg)
<b>Anti-Vakziniavirus</b>	-	Kaninchen polyklonal	Primärantikörper	Quartett (Berlin)

**Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Antikörper, deren Einsatzzweck, sowie deren Bezugsquellen.**

## 2.9 Mäuse

<i>Mausstamm</i>	<i>MHC-Haplotyp</i>	<i>Bezugsquelle</i>
<b>BALB/c</b>	H-2K <sup>d</sup>	Charles River (Sulzfeld)
<b>C57BL/6N</b>	H-2K <sup>b</sup>	Charles River (Sulzfeld)
<b>HHD-I</b>	HLA-A*0201	GSF-Tierhaltung (Neuherberg) (Pascolo, Bervas et al. 1997)
<b>HHD-II</b>	HLA-A*0201	GSF-Tierhaltung (Neuherberg) (Firat, Tourdot et al. 2001)

**Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Mausstämmen, deren MHC-Haplotyp, sowie deren Bezugsquellen.**

## 2.10 Synthetische Oligonukleotide (Primer)

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

### Primer für die flankierenden Regionen der Deletion III in MVA:

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

III<sub>f</sub>-1B: 5' - CAC CAG CGT CTA CAT GAC GAG CTT CCG AGT TCC - 3'

### Primer zur Detektion der *KIL* Gensequenz:

*KIL*int-1: 5' - TGA TGA CAA GGG AAA CAC CGC - 3'

*KIL*int-2: 5' - GTC GAC GTC ATA TAG TCG AGC - 3'

### Primer zur Generierung von pIIIΔHR-P<sub>7.5</sub>-HCV-NS3 und zur Detektion der HCV-1b-NS3

#### Gensequenz:

P1-NS3: 5' - GGC CGT TTA AAC GCC ACC ATG CCT ATC ACG GCC TAT TCC - 3'

P2-NS3: 5' - GGC CGG CGC GCC TTA GCT AGT GAC GAC CTC CAG GTC - 3'

### Primer zur Generierung von pcDNA-HCV-core:

pcDNA-core-1: 5' - CCG GGA ATT CGC CAC CAT GAG CAC AAA TCC TAA ACC - 3'

pcDNA-core-2: 5' - CCG GGA ATT CTT AAG CGG AAG CTG GG - 3'

## 2.11 Synthetische Oligopeptide

Falls nicht anders angegeben, wurden die Oligopeptide von der Firma *Affina (Berlin)* bezogen.

Kurzbezeichnung	Aminosäureposition	Aminosäuresequenz	Ursprung
<b>DLM</b>	132-140	DLMGYIPLV	Kernprotein des Hepatitis C Virus
<b>Flu</b>	58-66	GILGFVFTL	Influenza Virus Matrix Protein M1
<b>VP35#1</b>	184-192 bei MVA-H3L	SLSAYIIRV	Hüllprotein VP35 der Orthopockenviren

**Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Peptide.**

Die HCV-NS3 Peptid-Bibliothek (15mere mit 7 AS Überhang) (*siehe 6.2, S. 105*) wurde über unsere Partner im HC Vacc-Cluster (*EU-Projektnummer: QLK2-1999-00356*) bezogen, bei *Clonestar Biotech (Brno, CZ)* synthetisiert und lyophilisiert geliefert.

## 2.12 Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
<b>Basismedium</b>	RPMI 1640 10 % FBS (bei 56 °C hitzeinaktiviert) 1 % Pen-Strep
<b>CEF-Medium</b>	EMEM 10 % BSA 5 % Laktalbumin (ohne Antibiotika)
<b>Einfriermedium</b>	90 % FBS (bei 56 °C hitzeinaktiviert) 10 % DMSO
<b>LPS-Medium</b>	Basismedium mit 50 µM 2-Mercaptoethanol 25 µg/ml LPS 7 µg/ml Dextransulfat
<b>MC3T3-Medium</b>	Alphamedium 20 % FBS 1 % Ultraglutamin 1 1 % Pen-Strep
<b>T-Zell-Medium</b>	Basismedium mit 50 µM 2-Mercaptoethanol

**Tabelle 10: Übersicht der Zusammensetzung der verwendeten Medien**

## 2.13 Zusammensetzung gebräuchlicher Lösungen

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

Bezeichnung	Zusammensetzung
<b>DNA-Probenpuffer (5x)</b>	50 % TE 50 % Glycerin 0,04 % Bromphenolblau
<b>Erythrozyten-Lysepuffer pH 7,2</b>	0,15 M NH <sub>4</sub> Cl 10 mM KHCO <sub>3</sub> 0,1 mM Na <sub>2</sub> EDTA
<b>FACS-Puffer</b>	PBS-Puffer pH 7,4 1 % FBS 0,02 % NaN <sub>3</sub>
<b>LB-Agar</b>	LB-Medium mit 1,5 % Agar
<b>LB-Medium</b>	1 % Caseinextrakt 0,5 % Yeast Extrakt 0,5 % NaCl 0,1 % Glukose pH 7,0
<b>PBS-Puffer pH 7,4</b>	0,14 M NaCl 2,7 mM KCl 3,2 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>Plasmidlösung 1</b>	100 µg/ml RNase A 10 mM EDTA 50 mM Tris/HCl pH 8,0
<b>Plasmidlösung 2</b>	0,2 M NaOH 1 % SDS (w/v)
<b>Plasmidlösung 3</b>	3 M Kaliumacetat 2 M Eisessig
<b>Proteinase K</b>	1 mg/ml Proteinase K 1,5 mM CaCl <sub>2</sub>
<b>Proteinaseinhibitoren (1000x)</b>	0,2 mg/ml Antipain 0,2 mg/ml Aprotinin 0,2 mg/ml Leupeptin
<b>SDS-PAGE-Ladungspuffer (2x)</b>	50 mM Tris pH 6,8 2 % SDS 0,04 % Bromphenolblau 84 mM 2-Mercaptoethanol 20 % Glycerin
<b>SDS-PAGE-Laufpuffer (10x) pH 8,3</b>	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS
<b>TAE-Puffer</b>	40 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA 20 mM Natriumacetat

<b>TEN-Puffer (10x) pH 7,4</b>	100 mM Tris 10 mM EDTA 1 M NaCl
<b>TE-Puffer (10/0,1)</b>	10 mM Tris/HCl 0,1 mM EDTA pH 8,0
<b>Trypsin-EDTA</b>	0,25 % Trypsin 0,02 % EDTA in PBS-Puffer pH 7,4
<b>WB-Ablöse-Puffer pH 6,8</b>	100 mM 2-Mercaptoethanol 2 % SDS 62,5 mM Tris/HCl
<b>WB-Transferpuffer pH 8,3</b>	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 20 % Methanol
<b>WB-Waschpuffer (5x) pH 7,5</b>	50 mM Tris-Base 150 mM NaCl 0,05 % Tween 20

Tabelle 11: Übersicht der verwendeten Lösungen und deren Zusammensetzung.

## 2.14 Geräteliste

<i>Gerätebezeichnung</i>	<i>Modell / Typ</i>	<i>Bezugsquelle</i>
<sup>137</sup> Cs-Strahlenquelle	OB 29/902-1	Buchler GmbH (Braunschweig)
Blockthermostat	BT 1302	HLC BioTech (Bovenden)
Elektrotransformator	E. coli Pulser	Bio-Rad (München)
Fluoreszenzdurchflusszytometer	FACScalibur	BD Biosciences (Heidelberg)
Gefrierschrank (-20 °C)	Comfort	Liebherr (Ochsenhausen)
Gefrierschrank (-80 °C)	Ult 2090	Revco (Asheville, USA)
Gel-Analysegerät	Gel Doc 2000	Bio-Rad (München)
Hämatocytozometer	Neubauer Zählkammer	Karl Hecht KG (Sondheim)
Inkubationsschüttler	Innova 4430	New Brunswick Scientific (Nürtingen)
Kühlschrank (4 °C)	UT6-K	Bauknecht (Stuttgart)
Magnetrührer	Ikamag Reo	IKA Werke (Staufen)
Mehrkanalpipetten	Transferpette-12 (20-200) Calibra 852	Brand (Wertheim) Socorex (Ecublens, Schweiz)
Mikropipetten	Pipetman P10-1000	Gilson (Middleton, USA)

<b>Mikroskope</b>	Optech Biostar B5	Binder Labortechnik (Herbertshausen)
	Axiovert 25	Carl Zeiss (Oberkochen)
<b>Mikrowellenherd</b>	900W	Siemens (München)
<b>Netzgeräte</b>	Model 200 / 2.0	Bio-Rad (München)
	PowerPac 300	Bio-Rad (München)
<b>PCR-Gerät</b>	GeneAmp 2400	Perkin Elmer (Rodgau)
<b>pH-Meter</b>	InoLab pH Level 1	WTW GmbH (Weilheim)
<b>Pipettierhilfe</b>	Pipetus-akku	Hirschmann (Eberstadt)
<b>Spektralphotometer</b>	Cary 50 Bio	Varian (Darmstadt)
<b>Sterilbank</b>	HERAsafe HS 12	Heraeus (Hanau)
<b>Szintillationszähler</b>	TopCount NXT	Packard (Meriden, USA)
<b>Thermoschüttler</b>	Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
<b>Ultraschallgerät</b>	Sonopuls HD200 Schallspitzen: TS73, UW200	Bandelin (Berlin)
<b>Vortex-Schüttler</b>	VF2	IKA Werke (Staufen)
<b>Waage</b>	SPO 51	Scaltec, Denver Instruments (Göttingen)
<b>Wärmeschrank</b>	FUNCTIONline BB 16 CU	Heraeus (Hanau)
<b>Zentrifuge</b>	Avanti J-25	Beckman (München)
<b>Zentrifuge</b>	Megafuge 1.0R	Heraeus (Hanau)
<b>Zentrifuge</b>	Biofuge fresco	Heraeus (Hanau)
<b>Zentrifuge</b>	Optima LE-80K	Beckman (München)

Tabelle 12: Übersicht der verwendeten Laborgeräte und deren Hersteller.

## 3 Methoden

### 3.1 Bakteriologische Methoden

#### 3.1.1 Herstellung elektrokompetenter Bakterienzellen

Die Herstellung elektrokompetenter Bakterienzellen erfolgte unter sterilen Bedingungen ausschließlich unter Verwendung autoklavierter Gegenstände und Lösungen.

Von einer Glyzerinkultur des *E. coli*-Stammes DH10B wurden zirka 100 µl auf einer LB-Agar-Platte (Amp<sup>r</sup>) ausgestrichen. Nach Wachstum über Nacht bei 37 °C im Brutschrank, wurde eine einzelne Kolonie gepickt und damit 5 ml LB-Medium (Amp<sup>r</sup>) als Vorkultur angeimpft, die wiederum über Nacht bei 37 °C geschüttelt wurde.

Als Hauptkultur wurden 500 ml LB-Medium (Amp<sup>r</sup>) mit 1-2 ml der Vorkultur angeimpft und solange geschüttelt, bis die Bakterien die exponentielle Wachstumsphase erreicht hatten. Dies ist der Fall, wenn die Bakteriensuspension eine optische Dichte von ~0,6 bei einer Wellenlänge von 578 nm (OD<sub>578</sub>) erreicht hat.

Die Suspension wurde dann in einem Eisbad 15 min abgekühlt. Um die folgenden Schritte bei annähernd 0 °C ausführen zu können, wurden alle Gegenstände und Lösungen vorgekühlt.

Die Bakterien wurden zunächst für 15 min bei 5000 Upm abzentrifugiert (*Zentrifuge Avanti J-25, Rotor JA-10, Beckman*), drei mal in 500 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen und in 10 ml 10 % Glyzerin-Lösung resuspendiert. Nach einer Zentrifugation von 12 min bei 5000 Upm wurde das Bakteriensediment in 1,5 ml 10 % Glyzerin-Lösung aufgenommen und in Aliquots von 50 µl in 0,5 ml-Eppendorf-Gefäßen eingefroren. Die Bakterien konnten dann ohne signifikanten Kompetenzverlust bei -80 °C mehrere Monate aufbewahrt werden.

#### 3.1.2 Elektrotransformation von Bakterienzellen

Die bei -80 °C aufbewahrten elektrokompetenten Bakterienzellen wurden 10 min auf Eis aufgetaut und 1 min mit 1-5 ng (~1 µl) des jeweiligen Ligationsansatzes inkubiert. Die Zellsuspension wurde in einer Elektrotransformationsküvette (Ø 2 mm) bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF (*E. coli Pulser, Bio-Rad*) transformiert.

Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium (Amp<sup>r</sup>) wurden die Bakterien 1 h bei 37 °C mit 120 Upm geschüttelt. Nach dieser Zeit wurde 10 % bzw. 90 % der Bakterien nach Zentrifugation und Suspension in wenig LB-Medium, auf ampicillinhaltigen LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.



Ein Teil der Kolonien wurde in analytischem Maßstab gezüchtet und die nach 3.2.1.1 (S. 36) isolierte Plasmid-DNA durch Restriktionsspaltung und anschließender Gelelektrophorese analysiert.

### 3.1.3 Bestimmung der Transformationsrate kompetenter Zellen

Um die Transformation mit rekombinanter DNA möglichst effizient zu gestalten, wurden kompetente Bakterien mit einer Transformationsrate von mindestens  $7 \times 10^5$  verwendet. Zur Bestimmung dieser Größe wurden 50  $\mu\text{l}$  der kompetenten Zellen mit 10 ng pUC 18 transformiert (siehe 3.1.2, S. 34), auf LB-Agar-Platten ( $\text{Amp}^+$ ) ausgestrichen, über Nacht bei 37 °C inkubiert und die gewachsenen Kolonien ausgezählt. Die Transformationsrate wurde anhand folgender Formel bestimmt:

$$\text{Transformationsrate} = \frac{\text{Kolonienzahl} \times \mu\text{l Gesamtansatz}}{\mu\text{g eingesetzte DNA} \times \text{ausplattierte } \mu\text{l}}$$

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Plasmid-DNA-Isolierung

Die Isolierung von Plasmid-DNA für analytische Untersuchungen erfolgte nach der Methode von *Birnboim und Doly (1979)*, die auf dem Prinzip der alkalischen Lyse in Gegenwart des Detergens SDS basiert. Durch rasche Neutralisierung des alkalischen Lysepuffers (Plasmidlösung 2) werden Proteine denaturiert gehalten, während Plasmide auf Grund ihrer geringen Größe renaturieren können. Bei der nachfolgenden Zentrifugation geht die chromosomale DNA durch Assoziation mit der Bakterienzellwand ebenfalls im Sediment verloren.

#### 3.2.1.1 Plasmid-DNA-Isolierung im analytischen Maßstab (Mini-Präp)

Es wurden 5 ml ampicillinhaltiges LB-Medium ( $\text{Amp}^+$ ) mit Bakterien von einer LB-Agar-Platte oder einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht in einem Inkubationsschüttler (*Innova 4430, New Brunswick Scientific*) bei  $37^\circ\text{C}$  und 120 Upm geschüttelt. 3 ml dieser Kultur wurden kurz bei 4000 Upm abzentrifugiert (*Biofuge A, Heraeus*), das Zellsediment in 100  $\mu\text{l}$  Plasmidlösung 1 resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Lyse der Bakterien wurde die Suspension mit 200  $\mu\text{l}$  Plasmidlösung 2 versetzt und 5 min auf Eis gestellt. Durch Zugabe von 150  $\mu\text{l}$  eiskalter Plasmidlösung 3 wurden die chromosomale DNA und die bakteriellen Proteine gefällt und das Präzipitat für 10 min bei 13000 Upm (*Biofuge A, Heraeus*) abzentrifugiert.

Aus dem Überstand konnte die Plasmid-DNA durch Phenolextraktion von den restlichen Proteinen gereinigt und durch Zugabe von 2,5 Vol. Ethanol gefällt werden. Die präzipitierte DNA wurde 10 min bei 13000 Upm abzentrifugiert und mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das DNA-Sediment in 18  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  und 2  $\mu\text{l}$  RNase-A-Lösung (10 mg/ml) aufgenommen. Die so erhaltene Plasmid-DNA wurde direkt für Restriktionsenzymspaltungen oder PCR-Analysen eingesetzt.

#### 3.2.1.2 Plasmid-DNA-Isolierung im präparativen Maßstab (Maxi-Präp)

Für enzymatische Reaktionen und Transfektionen eukaryontischer Zellen wurden große Mengen an Plasmid-DNA benötigt. Dafür wurden 500 ml LB-Medium mit 2 ml einer Bakterien ÜN-Kultur angeimpft und so lange inkubiert, bis die Bakteriensuspension eine

$OD_{600} = 0,8$  erreicht hatte. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit dem *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* nach den Herstellerangaben.

### 3.2.1.3 Endotoxinfreie Plasmid-DNA-Isolierung (Mega-Präp)

Endotoxine (Lipopolysaccharide, LPS) sind Membranbestandteil gramnegativer Bakterien und können bei Tieren und Menschen Fieber, das endotoxische Schocksyndrom und die Aktivierung der Komplement-Kaskade verursachen (*Vukajlovich, Hoffman et al. 1987*). Aus diesem Grund wurde zur Gewinnung endotoxinfreier Plasmid-DNA für Immunisierungsexperimente das *EndoFree Plasmid Megakit (Qiagen)* verwendet. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte analog 3.2.1.2 nach den Angaben des Herstellers.

### 3.2.2 Reinigung von Plasmid-DNA durch Phenolextraktion und Ethanolfällung

Zur Entfernung von Proteinen aus wässrigen DNA-Lösungen wurden diese mit 1 Vol. einer 70%igen Phenollösung (w/v in TE-Puffer) und 1 Vol. eines Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (24:1) versetzt und gut gemischt. Die Phasentrennung wurde durch eine kurze Zentrifugation beschleunigt (*Biofuge A, Heraeus*). Aus der oberen wässrigen Phase wurde durch zweimaliges Ausschütteln mit je 1 Vol. des Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches die restliche Phenollösung entfernt. Durch Zugabe von 0,1 Vol. einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) und 2,5 Vol. Ethanol wurde die DNA 10-15 min bei  $-20\text{ °C}$  gefällt. Zur Präzipitation kleiner DNA-Fragmente wurde zusätzlich 0,01 Vol. einer 1 M  $MgCl_2$ -Lösung zugegeben. Die Fällung erfolgte hier über Nacht bei  $-20\text{ °C}$ . Das durch Zentrifugation erhaltene DNA-Sediment wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in dem erforderlichen Volumen TE-Puffer (10/0,1) aufgenommen.

### 3.2.3 Analyse von DNA in Agarosegelen

Entsprechend der jeweiligen Größe des zu analysierenden DNA-Fragmentes fanden 0,4 - 2%ige Agarosegele Verwendung. Für ein 1%iges Agarosegel wurden 0,5 g Agarose in 50 ml TAE-Puffer aufgekocht, auf zirka  $60\text{ °C}$  abgekühlt, mit 5  $\mu$ l Ethidiumbromidlösung (5 mg/ml) versetzt und anschließend in eine horizontale Gelapparatur gegossen. Als Elektrophoresepuffer wurde ebenfalls TAE-Puffer verwendet. Die in DNA-Probenpuffer aufgenommene DNA wurde bei 80-100 mA elektrophoretisiert. Nach der Elektrophorese

konnte die DNA unter UV-Licht bei 312 nm analysiert (*Gel Doc 2000, Bio-Rad*) und fotografisch dokumentiert werden (*Video copy processor P68E, Mitsubishi*).

### **3.2.4 Herstellung und Aufarbeitung von DNA-Fragmenten**

#### **3.2.4.1 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen**

Die Konzentration von nukleinsäurehaltigen Lösungen wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm (*Ultraspec Plus 4054, Pharmacia*) gegen eine H<sub>2</sub>O-Referenzprobe ermittelt. Eine OD<sub>260</sub> von 1 entspricht dabei einer Nukleinsäure-Konzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA, 40 µg/ml für RNA sowie 37 µg/ml für Oligonukleotide.

#### **3.2.4.2 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen**

Die Spaltung von DNA in wässrigen Lösungen mithilfe von Restriktionsendonukleasen, wurde jeweils in den vom Hersteller angegebenen Pufferlösungen durchgeführt. Die Reaktion verlief 1-2 h bei 37 °C. Es wurden in der Regel 1-2 U des Enzyms pro µg DNA eingesetzt. Durch Phenolextraktion (*siehe 3.2.2, S. 37*) oder durch Zugabe von 0,2 Vol. 5x DNA-Probenpuffer (bei anschließender Gelelektrophorese) wurden die Reaktionen abgestoppt.

#### **3.2.4.3 Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Im Jahr 1983 entwickelte Kary B. Mullis die Methode der Polymerase-Kettenreaktion, die es ermöglicht, spezifische DNA-Sequenzen *in vitro* aus geringen Mengen DNA in hoher Ausbeute zu amplifizieren (*Mullis, Faloona et al. 1986*).

Die PCR durchläuft mehrere Zyklen, bestehend aus Denaturierung von dsDNA in zwei komplementäre Einzelstränge, Anlagerung (Hybridisierung) spezifischer Oligonukleotide (Primer) und deren Verlängerung (Elongation) durch eine hitzestabile DNA-Polymerase (*Saiki, Gelfand et al. 1988*), z.B. die Taq DNA-Polymerase aus dem Archaeobakterium *Thermophilus aquaticus*.

Die beiden Primer flankieren dabei die Zielsequenz und hybridisieren jeweils mit den gegenüberliegenden DNA-Strängen. Das so spezifisch amplifizierte DNA-Fragment dient in den Folgezyklen erneut als Matrize.

Durch Verwendung speziell entworfener Primer können auch Punktmutationen im Bindungsbereich der Primer eingeführt werden, z.B. Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen.

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

PCR-Ansatz:

1 µl DNA ( $10^5$ - $10^6$  Kopien)

5 µl Primer 1 [5 pmol/µl]

5 µl Primer 2 [5 pmol/µl]

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

ad 50 µl ddH<sub>2</sub>O

	Temperatur	Zeit	Zyklen
<b>Initial-Denaturierung</b>	94 °C	2 min	1 x
<b>Denaturierung</b>	94 °C	30 s	} 30 x
<b>Hybridisierung</b>	55 °C <sup>*)</sup>	40 s	
<b>Elongation</b>	72 °C	3 min	
<b>Finale Elongation</b>	72 °C	7 min	1 x

**Tabelle 13: Standardprogramm für die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente.**

<sup>\*)</sup> Die Hybridisierungstemperatur wurde für jedes Primerpaar separat ermittelt.

Die optimale Hybridisierungstemperatur ergibt sich aus der Basenzusammensetzung der Primer und musste für jedes Primerpaar separat ermittelt werden. Dabei gilt die Formel:

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

Da die Taq-DNA-Polymerase keinen Mechanismus zur Fehlerkorrektur besitzt, wurde für präparative PCRs die Pwo-DNA-Polymerase (*Roche*) mit 3'→5' Exonukleaseaktivität eingesetzt und die PCR analog *Tabelle 13 (S. 39)* nach den Herstellerangaben durchgeführt.

### 3.2.4.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Verdäuen mit Restriktionsendonukleasen (*siehe 3.2.4.2, S. 38*) oder präparativen PCRs (*siehe 3.2.4.3, S. 38*) erfolgten mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)*.

Dafür wurden die zu isolierenden Reaktionsansätze auf einem Agarosegel aufgetrennt (*siehe 3.2.3, S. 37*), die DNA-Fragment-Banden der gewünschten Größe unter UV-Licht (312 nm) mit einem Skalpell aus dem Gel entnommen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Die DNA-Fragmente wurden anschließend nach den Herstellerangaben isoliert.

### 3.2.5 Klonierung rekombinanter DNA-Moleküle

#### 3.2.5.1 Herstellung von glatten Enden an dsDNA-Molekülen

Für die Ligation von DNA-Molekülen (*siehe 3.2.5.2, S. 40*) mit inkompatiblen Enden ist die Herstellung von glatten DNA-Enden erforderlich. Hierfür können überhängende Enden entfernt, oder mit Desoxynucleosid-5'-triphosphaten aufgefüllt werden.

Um überhängende 5'-Enden aufzufüllen, wurde das Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I eingesetzt. Dieses beherbergt eine 5'→3'-Polymerase-, sowie eine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität. In Gegenwart von dNTPs katalysiert die Klenow-Polymerase das Auffüllen der 5'-Enden. Ein 50 µl Reaktionsansatz enthielt 0,5-5 µg DNA-Fragment, 5 µl 10x NT-Puffer, 0,05 mM dNTPs, 1U Klenow-Enzym sowie H<sub>2</sub>O ad 50µl. Der Ansatz wurde 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion durch eine zehnminütige Inkubation bei 65 °C beendet. Das DNA-Fragment wurde durch Phenolextraktion und Ethanol-fällung gereinigt (*siehe 3.2.2, S. 37*).

Überhängende 3'-Enden wurden durch die T4-DNA-Polymerase entfernt, die in Abwesenheit von dNTPs eine sehr starke 3'→5'-Exonuklease-Aktivität besitzt. Für 50 µl Reaktionsansatz in Mg<sup>2+</sup>-haltigem Reaktionspuffer wurden 0,5-5 µg DNA-Fragment mit 1 U T4-DNA-Polymerase eingesetzt. Die Reaktion wurde nach dreißigminütiger Inkubation bei Raumtemperatur durch kurze Inkubation bei 65 °C beendet.

#### 3.2.5.2 Ligation von DNA-Fragmenten in vektorielle DNA

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten katalysiert die DNA-Ligase die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-Hydroxylgruppe am Ende einer DNA-Kette und der

5'-Phosphatgruppe am Ende einer anderen Kette. Dieses Verfahren ermöglicht eine kovalente Verknüpfung verschiedener DNA-Fragmente zu einem DNA-Molekül.

Um eine Religation des durch Restriktionsspaltung linearisierten DNA-Vektors zu verhindern, wurden die 5'-Enden mit alkalischer Phosphatase (*Calf intestinal phosphatase*, CIP) dephosphoryliert. Dazu wurden 1-3 µg Vektor-DNA mit 1-2 µl CIP [1 U/µl] und 2 µl 10x Dephosphorylierungspuffer in 20 µl Volumen für 45 min bei 37 °C inkubiert. Nach Hitzeinaktivierung der CIP bei 65 °C wurde die Vektor-DNA durch Phenolextraktion und anschließender Ethanol-fällung wieder gereinigt (*siehe 3.2.2, S. 37*).

Für die Ligationsreaktion wurden 50-200 ng dephosphorylierte Vektor-DNA mit der 3-5-fachen molaren Menge des zu inserierenden DNA-Fragments eingesetzt und mit 1-2 µl T4-DNA-Ligase [1 U/µl] und 2 µl 10x Ligationspuffer in 20 µl ddH<sub>2</sub>O für 12 Stunden bei RT inkubiert.

Ein Teil des Ligationsansatzes wurde direkt zur Elektrotransformation von *E. coli* (*siehe 3.1.2, S. 34*) eingesetzt.

### **3.2.6 Analyse von Proteinen in denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen**

Zur Auftrennung von Proteinen wurden 16 x 14 x 0,1 cm große Polyacrylamidgele verwendet. Sie bestanden aus einem unteren 10%igen Polyacrylamid-Trenngel und einem oberen 5%igen Sammelgel. Da bei niedrigen pH-Werten die Gefahr der Hydrolyse von Peptidbindungen besteht, wurden die Gellösungen auf einen pH-Wert von 8,8 eingestellt. Zudem liegen bei diesem pH-Wert fast alle Proteine in negativ geladener Form vor.

Die Lösung für das 10%ige Trenngel setzte sich aus 8,3 ml einer Acrylamid-Lösung (29 % Acrylamid, 1 % Bisacrylamid), 6,3 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 9,9 ml H<sub>2</sub>O und 250 µl 10 % SDS zusammen. Nach kurzem Entgasen wurden 250 µl einer 10%igen Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS) und 10 µl TEMED zugesetzt.

Das Trenngel wurde bis auf eine Höhe von zirka zwei Zentimetern unterhalb des Taschenformers gegossen. Zur Ausbildung einer planen Oberfläche wurde die Gellösung sofort mit H<sub>2</sub>O überschichtet.

Die 5%ige Polyacrylamidlösung für das Sammelgel setzte sich aus 1,3 ml einer Acrylamid-Lösung (29 % Acrylamid, 1 % Bisacrylamid), 1 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8, 5,5 ml H<sub>2</sub>O, 80 µl 10 % SDS, 80 µl 10 % Ammoniumperoxodisulfat-Lösung und 8 µl TEMED zusammen.

Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser abgegossen, das Trenngel mit der Sammelgel-Lösung überschichtet und der Taschenformer eingesetzt. Die Proben wurden vor dem Auftrag in SDS-PAGE-Ladungspuffer aufgenommen und 5 min bei 95 - 100 °C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 100 Volt innerhalb des Sammelgels und bei 150 Volt innerhalb des Trenngels.

### **3.2.7 Immunochemischer Nachweis von Proteinen durch Western-Blot (Semi-Dry-Transfer)**

Nach SDS-PAGE der Proteinproben fand ein Transfer der Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran nach der Semi-Dry-Transfer-Methode von *Kyhse-Andersen (1984)* statt. Für den Transfer wurde eine Graphit-Blotapparatur der Firma *Bio-Rad* verwendet. Nach der elektrophoretischen Trennung der Proteine wurde das Gel abgemessen und acht Whatman-Filterpapiere (*Whatman, Maidstone (USA)*) und eine Nitrozellulosemembran wurden auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten.

Die Whatman-Filter, die Nitrozellulosemembran und das SDS-Gel wurden kurz in WB-Transferpuffer getränkt und die Blotapparatur zusammengebaut. Dabei wurde die Nitrozellulosemembran direkt auf die Anodenseite des Gels gelegt und von jeweils vier Whatman-Filterpapieren umschlossen.

Der elektrophoretische Transfer erfolgte bei RT für 1 h. Die angelegte Stromstärke war von der Fläche des Gels abhängig und betrug  $0,8 \text{ mA/cm}^2$ .

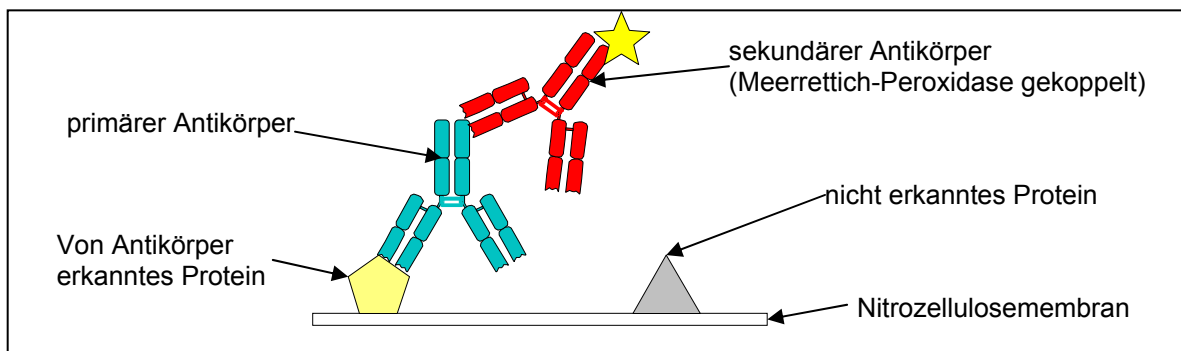
Der Transfer wurde mit einer Anfärbung des Gels mit Coomassie-Blau G250 überprüft.

### **3.2.8 Immunochemischer Nachweis von immobilisierten Proteinen**

Nach dem Transfer der Proteine wurde die Nitrozellulosemembran mit einer 5%igen Magermilch/PBS-Lösung mindestens 2 h lang bei 4 °C abgesättigt. Überschüssige Magermilch wurde durch dreimaliges Waschen mit WB-Waschpuffer für je 5 min bei RT entfernt. Anschließend wurde der gegen das gesuchte Protein gerichtete primäre Antikörper zugegeben. Der primäre Antikörper wurde nach Bedarf in Verdünnungen von 1:1000 bis 1:10000 eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei RT für mindestens 1 h.

Der Primäantikörper wurde durch 3 x 5-minütiges waschen der Nitrozellulosemembran bei Raumtemperatur entfernt. Der sekundäre Antikörper war mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt und gegen den F<sub>c</sub>-Teil des primären Antikörpers gerichtet (*siehe Abbildung 7, S. 43*).





**Abbildung 7: Immunochemischer Nachweis von immobilisierten Proteinen.**

Dieser Antikörper wurde in der vom Hersteller angegebenen Verdünnung in PBS-Puffer für 1 h bei RT inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen mit WB-Waschpuffer für je 10 min bei RT. Zur Detektion wurde das *Lumi-Light*<sup>®</sup> Kit der Firma Roche angewendet. Hierfür wurden 50  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  der *Lumi-Light*<sup>®</sup>-Lösungen 1 und 2 im Verhältnis 1:1 zusammengegeben und die Nitrozellulosemembran für 5 min darin geschwenkt. Anschließend wurde die Membran 1 s bis 2 min auf einem Röntgenfilm exponiert. Zur Größenbestimmung diente ein vorgefärbter Proteingrößenmarker der Firma NEB BioLabs (*Broad Range 6-175 kDa*).

Eine Wiederholung der Immundetektion mit demselben Antikörper war nach Waschen der Membran in PBS und Blocken in 5%iger Magermilchlösung in PBS möglich.

### 3.2.9 Ablösen von Antikörpern von Nitrozellulosemembranen

Um die Detektion mehrerer Proteine, die nicht von demselben Antikörper erkannt wurden, zu ermöglichen, wurde die Membran durch Inkubation für 30 min bei 50 °C in 10 ml „WB-Ablöse-Puffer“ (siehe S. 32) von sämtlichen gebundenen Antikörpern befreit und anschließend zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Die so behandelte Membran stand für eine erneute Immundetektion zur Verfügung.

### 3.3 Zellkultur-Techniken

#### 3.3.1 Kultivierung von eukaryontischen Zelllinien

Alle Arbeiten mit eukaryontischen Zelllinien wurden ausschließlich unter Verwendung steriler Lösungen, Medien und Verbrauchsmaterialien durchgeführt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in T185-Zellkulturflaschen (185 cm<sup>2</sup>) (*Nunc*) in 25 ml Medium bei 37 °C und ~95 % Luftfeuchtigkeit in einem mit 5 % CO<sub>2</sub> begasten Wärmeschrank. Nach etwa 2-3 Tagen etablierte sich in den Zellkulturflaschen eine semikonfluente Zellschicht und die Zellen wurden im Verhältnis 1:5 bis 1:10 subkultiviert. Das Ablösen der Zellen von der Flaschenwand erfolgte durch leichtes Klopfen nach Dekantieren des Mediums, Waschen mit PBS-Puffer und Zugabe von 2 ml Trypsin-EDTA (2-5 min Inkubation). Für Transfektionen oder zur Analyse der Genexpression wurden 6-12-Loch-Platten (*Corning Inc.*) verwendet, die 1-2 Tage vor Benutzung ebenfalls im Verhältnis 1:5 bis 1:10 eingesät wurden (12 ml Medium pro Platte).

Zelllinie	Medium	Beschreibung	Bezugsnummer
<b>B16-F1</b>	Basismedium	Murine Melanomzellen (C57BL/6)	ATCC CRL-6323
<b>BHK-21</b>	Basismedium mit 8 % FBS	Hamsternieren-Fibroblasten (1 Tag alt)	ATCC CCL-10
<b>CEF</b>	CEF-Medium	Primäre Hühnerembryo-Fibroblasten	-
<b>Cos-7</b>	Basismedium	Affennieren-Fibroblasten	ATCC CRL-1651
<b>HeLa</b>	Basismedium	Epithelzellen aus humanem, karzinogenem Gebärmutterhalsgewebe	ATCC CCL-2
<b>MA-104</b>	Basismedium	Epithelzellen aus Affennieren	ATCC CRL-2378.1
<b>MC3T3-E1</b>	MC3T3-Medium	Fibroblasten aus dem Schädeldach muriner Embryos/Föten (C57BL/6)	DSMZ ACC 210
<b>P815</b>	T-Zell-Medium	Murine Mastozytomzellen	ATCC TIB-64
<b>RK13</b>	Basismedium	Kaninchennierenzellen	ATCC CCL-37
<b>T2-A2K<sup>b</sup></b>	T-Zell-Medium mit Geneticin [1 mg/ml]	Humaner B-T-Zell-Hybrid Ist defekt in der Präsentation endogener Antigene und trägt hauptsächlich leere HLA-A*0201 Moleküle.	( <i>Salter und Cresswell 1986</i> )
<b>T-Lymphozyten</b>	T-Zell-Medium	Primäre murine Lymphozyten	-

**Tabelle 14: Übersicht der verwendeten eukaryontischen Zelllinien unter Angabe des Standardkulturmediums.**

### 3.3.2 Transiente Transfektion von eukaryontischen Zellen

Um eukaryontische Zellen transient mit Plasmid-DNA zu transformieren, wurde das *FuGENE 6<sup>®</sup> Transfektions-Reagenz (Roche)* nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Dabei wurden nur Plasmidpräparationen verwendet, die einen hohen Reinheitsgrad aufwiesen ( $OD_{260/280} > 1,6$ ).

6  $\mu$ l *FuGENE 6<sup>®</sup>* wurden 5 min in serumfreiem Medium inkubiert und zu 1-3  $\mu$ g DNA [1  $\mu$ g/ $\mu$ l] geträufelt. Nach 15 min wurde das Gemisch vorsichtig auf den subkonfluenten Zellrasen einer 6-Loch-Platte geträufelt und 24-48 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Ein auswechseln des Kulturmediums war nicht erforderlich.

### 3.3.3 Kryokonservierung eukaryontischer Zellen

Zum Einfrieren wurden nur Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase verwendet. Die Zellen einer T185-Zellkulturflasche (185 cm<sup>2</sup>) wurden durch Trypsinierung geerntet und durch 5-minütige Zentrifugation bei 1400 Upm (*Megafuge 1.0R, Heraeus*) sedimentiert.

Das Zellsediment wurde in kaltem Einfriermedium (*siehe 2.12, S. 30*) durch vorsichtiges Pipettieren resuspendiert und in 1 ml Aliquots steril in Kryoröhrchen (*Nunc*) überführt. Die Zellen wurden dann zunächst 1 h auf -20 °C gekühlt, bevor sie über Nacht auf -80 °C eingefroren wurden. Am darauf folgenden Tag wurden sie in flüssigen Stickstoff (-196 °C) transferiert und dort gelagert.

### 3.3.4 Auftauen kryokonservierter eukaryontischer Zellen

Um eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurde die Zellsuspension in einem 37 °C Wasserbad so weit erwärmt, dass sie durch Schütten in ein mit 10 ml vorgewärmtem Medium gefülltes *Falcon*-Röhrchen transferiert werden konnte. Um das DMSO des Einfriermediums aus der Zellsuspension zu entfernen, wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 1400 Upm (*Megafuge 1.0R, Heraeus*) sedimentiert, in 10 ml vorgewärmtem Medium aufgenommen und in T85-Zellkulturflaschen (85 cm<sup>2</sup>) ausgesät. Nach 2 Tagen konnten die Zellen in T185-Zellkulturflaschen (185 cm<sup>2</sup>) weiterkultiviert werden.

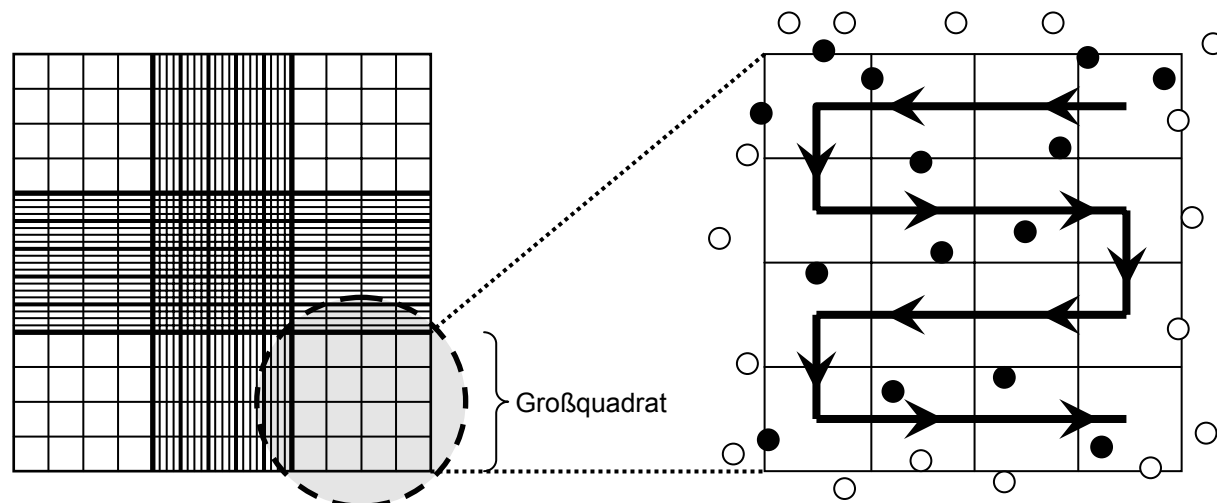
### 3.3.5 Bestimmung der Zellzahl in einer Zellsuspension

Zur Bestimmung der Zellzahl in einer Zellsuspension wurde ein Neubauer-Hämatocytozometer verwendet. Die Neubauer-Zählkammer besteht aus neun großen Quadraten (*Abbildung 8, links*) mit einer Fläche von je  $1 \text{ mm}^2$ . Durch die Höhe der Zählkammer von  $0,1 \text{ mm}$  ergibt sich somit ein definiertes Volumen von  $0,1 \text{ mm}^3$  ( $0,1 \mu\text{l}$ ) je Großquadrat.

Von der zu quantifizierenden Zellsuspension wurden  $50 \mu\text{l}$  mit  $100 \mu\text{l}$  4 % Essigsäure/PBS und  $50 \mu\text{l}$  0,5 % Trypanblau versetzt und so eine 1:4 Verdünnung hergestellt. Der Azofarbstoff Trypanblau färbt dabei nur tote Zellen an, indem er durch defekte Zellmembranen eindringen und intrazelluläre Proteine anfärben kann.

Das Auszählen der lebenden, ungefärbten Zellen erfolgte unter einem Lichtmikroskop (*Biostar B5, Optech*) bei 100-400facher Vergrößerung. Es wurden 1-2 Großquadrate ausgezählt und der Mittelwert errechnet. Die ermittelte Zellzahl wurde mit dem Verdünnungsfaktor (4) und dem Kammerfaktor ( $10^4$ ) multipliziert und ergab so die Zellzahl pro Milliliter der Zellsuspension.

Damit Zellen, die auf den Linien liegen, nicht doppelt erfasst werden, wurden nur die Zellen mitgezählt, die auf den Linien oben und links liegen, nicht aber die Zellen auf den Linien unten und rechts (*Abbildung 8, rechts*).



**Abbildung 8: Auszählen der Zellen in einem Großquadrat der Zählkammer (Kreis).**  
Zellen, die die linke, oder die obere Linie berühren, werden mitgezählt (schwarze Punkte).

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

Da das modifizierte Vakziniavirus Ankara (MVA) durch serielle Passagierung des Wildtyp-Vakziniavirus Ankara (CVA) auf primären Hühnerembryo-Fibroblasten (CEF) entstanden ist, sind diese Zellen das Mittel der Wahl bei der Generierung und Kultivierung von MVA-Viren.

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

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

Je 50 ml Zellsuspension wurden in eine T225-Zellkulturflasche ausgesät (ca.  $5 \times 10^5$  Zellen/ml) und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre im Wärmeschrank kultiviert.

Nach 36-48 h erreichten die Primärkulturen Konfluenz und wurden nach einmaligem Waschen mit PBS mit Trypsin-EDTA abgelöst und im Verhältnis 1:2-1:3 in Sekundärkulturen geteilt. Alternativ konnten die Primärkulturen bis zur Teilung für 5-7 Tage bei 27 °C gelagert werden.

### 3.4 Virologische Methoden

#### 3.4.1 Virusamplifikation

Für MVA-Viruspräparationen in großem Maßstab wurden primäre CEF-Zellen in 10-40 T225-Zellkulturflaschen sekundärkultiviert. Nach 2-3 Tagen wurde das Medium aus den Flaschen entfernt und die semikonfluenten Zellrasen bei 37 °C mit MVA in einer Dosis von 0,1-1,0 IE/Zelle in je 5 ml CEF-Medium (2 % FBS) pro Flasche infiziert. Um ein Austrocknen des Zellrasens zu verhindern, wurden die Flaschen während der 90-minütigen Inkubationszeit in regelmäßigen Abständen geschwenkt. Nach Zugabe von 25 ml CEF-Medium wurden die Flaschen für weitere 2-3 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert, bis sich ein zytopathischer Effekt zeigte.

Die Ernte der Zellen erfolgte durch Einfrieren der Flaschen bei -20 °C und erneutes Auftauen. Während des Tautvorgangs wurden die Flaschen regelmäßig geschüttelt, um den Zellrasen mit den entstandenen Eisstücken vollständig abzuschaben. Die geerntete Zellsuspension wurde in 250 ml Ultrazentrifugenbecher überführt und 90 min bei 17000 Upm sedimentiert (*Optima LE 80K, Rotor: Typ 19, Beckman*). Das Zellsediment wurde dreimal gefriergetaut (Trockeneis und 37 °C Wasserbad) und in 10 mM Tris-Lösung pH 9,0 (~1 ml pro Flasche) aufgenommen.

Das Virusmaterial konnte anschließend bei -80 °C als Rohpräparation gelagert, oder weiter aufgereinigt werden (*siehe 3.4.2*).

#### 3.4.2 Aufreinigung von Viren

MVA-Viruspräparationen konnten von Zelltrümmern und rekombinantem Protein gereinigt werden, indem die Rohpräparationen durch ein Saccharose-Kissen ultrazentrifugiert wurden. Um die Zellen zu zertrümmern und Viruspartikel von den Zellwänden abzutrennen, wurde das nach 3.4.1 präparierte Virusmaterial auf Eis mit einer Ultraschallnadel (*TS73, Sonopuls HD200, Bandelin*) dreimal für je 20 s (90 % Stärke) beschallt. Die Zelltrümmer wurden durch 5-minütige Zentrifugation bei 2500 Upm (*Megafuge 1.0R, Heraeus*) und 4 °C sedimentiert und der virushaltige Überstand gesammelt.

Ultrazentrifugenröhrchen (*Beckman*) wurden zur Hälfte mit steriler 36 % Saccharose-Lösung befüllt, mit dem gleichen Volumen an Virussuspension überschichtet und 80 min bei 13500 Upm und 4 °C zentrifugiert (*Optima LE 80K, Rotor: SW28, Beckman*).

Der Überstand wurde verworfen und das sedimentierte Virus in 1 mM Tris-Lösung pH 9,0 aufgenommen (~0,5-1 ml pro 10 Zellkulturflaschen). Nach Bestimmung des Virustiters (*siehe 3.4.3*) wurde die Virussuspension aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

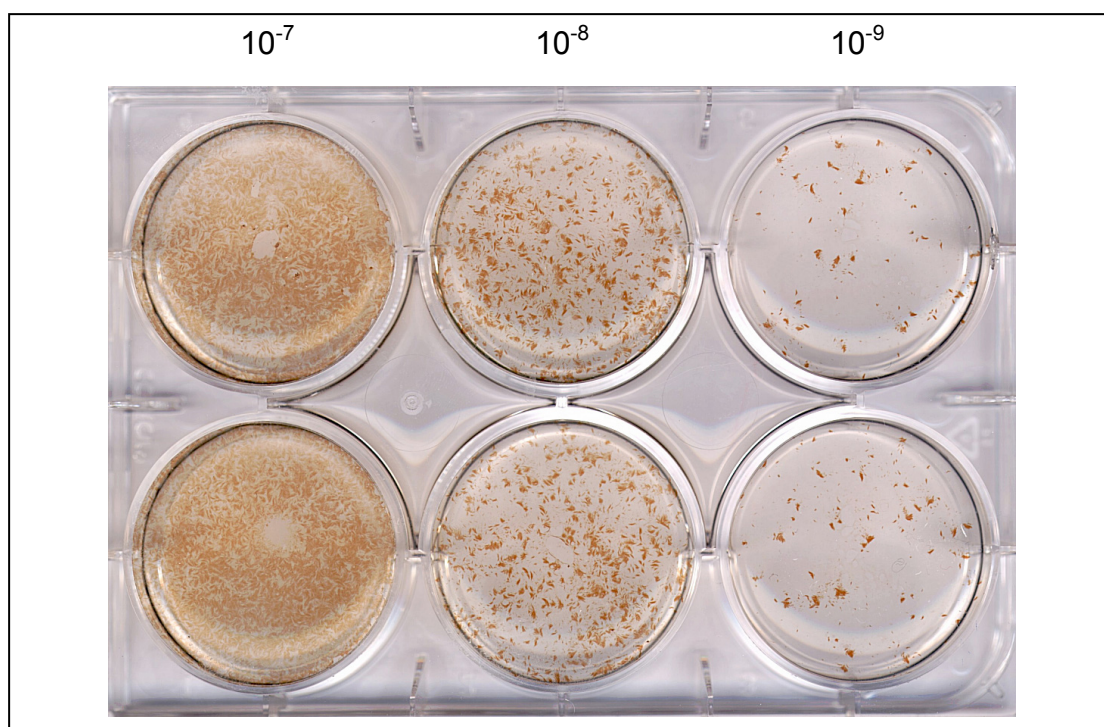
### 3.4.3 Virustitration durch Immunfärbung

Die Bestimmung der Infektiosität einer MVA-Virussuspension erfolgte durch Immunfärbung MVA-infizierter CEF-Zellen. Das Virusmaterial wurde in einem mit Eiswasser (50 % Eis) gefüllten Ultraschallbad (*Sonopuls HD200, Bandelin*) bei maximaler Stärke für 3 x 1 min beschallt. Anschließend wurden in CEF-Medium Verdünnungen in  $10^{-1}$ -Schritten von  $10^{-1}$  bis  $10^{-9}$  hergestellt.

Von semikonfluenten CEF-Zellen in 6-Loch-Platten wurde das Medium entfernt und im Doppelansatz durch die verschiedenen Verdünnungen (1 ml/Loch) substituiert. Die Infektion wurde 48 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre durchgeführt. Danach wurde das Medium entfernt und die Zellen 2 min mit 1 ml/Loch eines 1:1 Aceton/Methanol-Gemisches fixiert. Nach Entfernen der Fixierlösung wurden die Platten luftgetrocknet.

In jedes Loch wurde 1 ml einer 1:1000 mit PBS-Puffer / 3 % FBS verdünnten Anti-Vakziniavirus Antikörper-Lösung (*Quartett, Berlin*) gegeben und unter stetigem Schwenken 1 h bei RT inkubiert. Die Platten wurden zur Entfernung von ungebundenem Antikörper 3 x 5 min mit PBS-Puffer gewaschen. Gebundener Antikörper wurde mithilfe eines Peroxidase gekoppelten Anti-Kaninchen Sekundärantikörpers (*Dianova, Hamburg*) detektiert. Dazu wurde in jedes Loch 1 ml einer 1:1000 mit PBS-Puffer / 3 % FBS verdünnten Lösung des Sekundärantikörpers gegeben und ebenfalls 1 h unter stetigem Schwenken bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Platten erneut 3 x 5 min mit PBS-Puffer gewaschen.

Zur Vorbereitung des Substrats wurde mit abs. Ethanol eine gesättigte o-Dianisidinlösung (*Sigma, München*) hergestellt und kurz abzentrifugiert. Davon wurden 240 µl in 12 ml PBS-Puffer gegeben und die Lösung sterilfiltriert. Nach Zugabe von 12 µl einer 30%igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung konnte das Substrat auf die Platten verteilt werden (1 ml/Loch). Während der 15-30minütigen Inkubationszeit färbten sich die Virus-infizierten Zell-Foci rot-braun (*siehe Abbildung 9, S. 50*). Zur Bestimmung des Virustiters wurden die gefärbten Foci im Doppelansatz einer geeigneten Verdünnungsstufe (~20-100 Foci/Loch) gezählt und daraus der Mittelwert gebildet. Um den Titer in IE/ml auszudrücken, wurde der Mittelwert durch die jeweilige Verdünnungsstufe (z.B.  $10^{-9}$ ) dividiert.

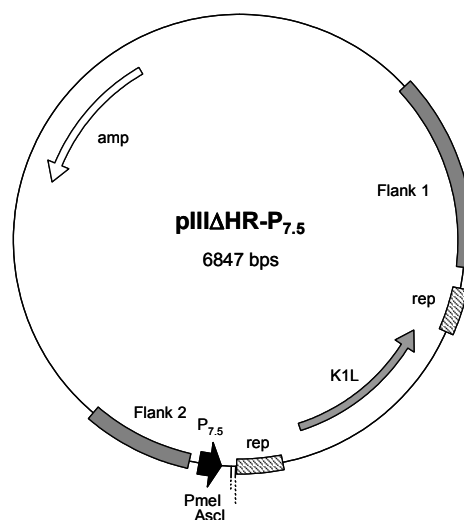


**Abbildung 9: Immungefärbte Zell-Foci Virus-infizierter CEF-Zellen dienen zur Bestimmung des Titers von MVA-Viruspräparationen.**



### 3.4.4 Herstellung rekombinanter Vakziniaviren MVA

Um rekombinante MVA-Viren herstellen zu können, müssen die jeweiligen rekombinanten Gene in MVA-Transferplasmide subkloniert werden. Für die Inserierung dieser Fremdgene in den Bereich der Deletion III des MVA-Vektors, wurde das Vektorplasmid pIII $\Delta$ HR-P<sub>7.5</sub> (Staub, Lowel et al. 2003) verwendet (siehe Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Das MVA-Transferplasmid pIII $\Delta$ HR-P<sub>7.5</sub> mit den MVA Gensequenzen Flank 1 und Flank 2, dem Vakziniaviruspromotor P<sub>7.5</sub> und dem Vakziniavirus-Wirtsspezifitätsgen K1L, welches MVA das Wachstum auf der Kaninchennierenzelllinie RK13 ermöglicht. Das K1L-Gen wird von zwei homologen Sequenzen (rep) aus dem LacZ-Gen flankiert.

Dieses beinhaltet zwei 522-947 bp große MVA Gensequenzen, *Flank 1* und *Flank 2*, die den benachbarten Sequenzen der Deletion III entsprechen. Durch intergenomische homologe Rekombination können die zwischen den Flanken liegenden Gensequenzen präzise an der Stelle der Deletion III stabil ins MVA-Genom integriert werden (siehe Abbildung 18 A, S. 66). Da die Transkription der Pockenvirusgene im Zytoplasma einer infizierten Zelle durch die virale Transkriptions-Maschinerie erfolgt, müssen rekombinante Gene unter die Kontrolle eines Vakziniaviruspromotors gesetzt werden. Dafür beinhaltet das Vektorplasmid pIII $\Delta$ HR-P<sub>7.5</sub> den für frühe und späte Genexpression geeigneten Vakziniaviruspromotor P<sub>7.5</sub> (Sutter und Moss 1992; Wyatt, Shors et al. 1996).

Um anschließend rekombinante MVA-Viren selektionieren zu können, beinhaltet die Insertionskassette das Vakziniavirus-Gen *K1L*, welches die Wirtsspezifität der rekombinanten MVA-Viren transient auf die Kaninchennierenzelllinie RK13 (siehe Tabelle 14, S. 44) erweitert (Sutter, Ramsey-Ewing et al. 1994). Da sich MVA auf dieser Zelllinie

normalerweise nicht produktiv vermehren kann, können nur solche Viren wachsen, welche das *KIL*-Gen und damit die komplette Insertionskassette integriert haben.

Um das „Markergen“ *KIL* wieder aus dem entstandenen rekombinanten Virus entfernen zu können, wird das *KIL*-Gen von zwei homologen, 216 bp großen Sequenzen aus dem *LacZ*-Gen flankiert (Staub, Lowel et al. 2003). Unter Wegfall des Selektionsdrucks durch serielles Passagieren auf den für MVA permissiven BHK-21- oder CEF-Zellen (Drexler, Heller et al. 1998), kann das *KIL*-Gen durch intragenomische homologe Rekombination effektiv wieder aus dem Virusgenom deletiert werden (siehe Abbildung 18 B, S. 66). Im rekombinanten Virus verbleiben das Zielgen und eine einzelne *LacZ*-Sequenz.

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

#### ***3.4.4.1.1 Transiente Transfektion zur Analyse der Genexpression***

Da das Zielgen in einem MVA-Transferplasmid unter der Kontrolle eines Vakziniaviruspromotors steht, wurde die korrekte Genexpression nach Transfektion des Plasmids in MVA-infizierte Zellen überprüft.

Dazu wurden die Zellrasen subkonfluenten Zellen in 6-Loch-Platten mit 10 IE MVA-II<sub>new</sub> pro Zelle in 1 ml Medium infiziert. Nach 90 min Infektion bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre wurden die Zellen mit Medium gewaschen und mit 1 ml frischem Medium überschichtet. Die Transfektion von 1 µg des Vektorplasmids in die Zellen wurde wie unter 3.3.2 (S. 45) beschrieben durchgeführt. Nach 24 h wurde das Medium entfernt, der Zellrasen mit einem Zellschaber geerntet und 2 min bei 2000 Upm in einer Tischzentrifuge (*Biofuge fresco*, Heraeus) sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 80-200 µl SDS-PAGE-Ladungspuffer aufgenommen, in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 3.2.6, S. 41), und nach einem Western-Blot-Transfer durch Immundetektion rekombinanter Proteine analysiert (siehe 3.2.7, S. 42).

#### ***3.4.4.1.2 Stabile Transfektion zur Herstellung rekombinanter MVA-Viren***

Die Herstellung rekombinanter MVA-Viren erfolgte durch Transfektion eines MVA-Transferplasmids in MVA-II<sub>new</sub>-infizierte BHK-21 oder CEF-Zellen. In 6-Loch-Zellkulturplatten wurden BHK-21 oder CEF-Zellen bis zu 80%iger Konfluenz herangezogen. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen mit 0,01 IE MVA-II<sub>new</sub> pro Zelle in 1 ml Medium pro Loch infiziert. Die Infektion erfolgte für 90 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-

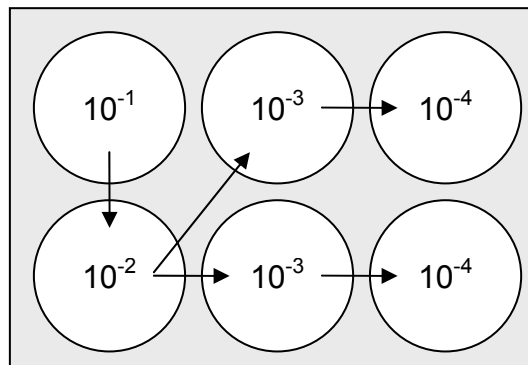
Atmosphäre. 1 µg des linearisierten Transferplasmids wurde, wie unter 3.3.2 (S. 45) beschrieben, in die Zellen transfiziert. Nach 48 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre wurde der Zellrasen mit einem Zellschaber im Medium geerntet, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C gelagert.

### 3.4.5 Isolation rekombinanter MVA-Viren

Die Isolation rekombinanter MVA-Viren wird durch das Vakziniavirus-Wirtsspezifitätsgen *KIL* der Insertionskassette ermöglicht. Es können nur die rekombinanten MVA-Viren auf der Kaninchennierenzelllinie RK13 wachsen, die die Insertionskassette und somit das *KIL*-nebst Zielgen ins Genom integriert haben. MVA-Viren ohne integrierter Insertionskassette können sich auf RK13-Zellen nicht produktiv vermehren.

Der geerntete Transfektionsansatz (siehe 3.4.4.1.2) wurde dreimal gefriergetaut (Trockeneis und 37 °C Wasserbad) und in einem mit Eiswasser (50 % Eis) gefüllten Ultraschallbad (*Sonopuls HD200, Bandelin*) bei maximaler Stärke für 3 x 1 min beschallt.

200 µl des Ansatzes wurden mit Basismedium auf ein Volumen von 2 ml aufgefüllt (10<sup>-1</sup>-Verdünnung) und es wurden Verdünnungen bis 10<sup>-4</sup> hergestellt. Diese wurden nach Entfernen des Mediums nach folgendem Schema auf konfluente RK13-Zellen in 6-Loch-Platten ausgesät:



**Abbildung 11: Schematische Verteilung der Virusverdünnungen auf RK13-Zellen in 6-Loch-Platten.** Die 10<sup>-3</sup> und 10<sup>-4</sup>-Verdünnungen wurden im Doppelansatz verteilt.

Nach 48-72 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bildeten sich auf dem Zellrasen Zellaggregate (Plaques), die durch Virus-infizierte Zellen verursacht wurden.

Aus möglichst hohen Verdünnungsstufen wurden die Plaques unter einem Mikroskop auf der Unterseite der 6-Loch-Platte markiert und anschließend unter sterilen Bedingungen isoliert. Dazu wurde der Plaque mit einer 20 µl-Pipettenspitze vorsichtig kratzend abgesaugt und in

ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 500 µl Basismedium überführt. Pro Passage wurden 5-15 Plaques isoliert. Das Virusisolat wurde dreimal gefriergetaut und erneut im Ultraschallbad für 3 x 1 min beschallt. Um möglichst reines, von Wildtyp-Virus befreites, Virusmaterial zu erhalten, wurden mit den Plaueisolaten weitere 2-4 RK13-Passagen durchgeführt. Durch PCR-Analyse mit spezifischen Primern für die Deletion III (*siehe 2.10, S. 29*) konnte die Reinheit des rekombinanten Virus überprüft werden.

Reine Isolate rekombinanter MVA-Viren konnten durch serielle Passagen, wie in 3.4.5 (*S. 53*) beschrieben, auf den für MVA permissiven Zellen BHK-21 oder CEF von dem Selektionsmarkergen *KIL* befreit werden. Da auf diesen Zellen die Funktion des *KIL*-Gens nicht essenziell ist, führte die homologe Rekombination der identischen *LacZ*-Sequenzen, die das eingeführte *KIL*-Gen flankieren (*siehe Abbildung 10, S. 51*), zu einer effektiven Entfernung des *KIL*-Gens. Die Reinheit der rekombinanten Viren wurde durch PCR-Analyse überprüft.

### 3.4.6 Extraktion viraler DNA

Um virale DNA einer PCR-Analyse unterziehen zu können, muss diese in ausreichender Menge isoliert werden. Dazu wurden subkonfluente Zellen in 6-Loch-Platten mit einer MOI von 1-10 infiziert und nach 24stündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre infiziert. Die Zellen wurden im Medium mit einem Zellschaber geerntet und mit einer Tischzentrifuge (*Biofuge fresco, Heraeus*) für 2 min bei 2000 Upm sedimentiert. Das Medium wurde auf 400 µl reduziert und das Sediment darin resuspendiert. Nach Zugabe von 50 µl TEN-Puffer (10x), 50 µl Proteinase K-Lösung und 23 µl 20 % SDS wurde die Suspension gut gemischt und 2-4 h bei 56 °C inkubiert. Die DNA konnte anschließend durch Phenolextraktion (*siehe 3.2.2, S. 37*) isoliert werden und stand für PCR-Analysen zur Verfügung.

### 3.5 Immunbiologische Methoden

#### 3.5.1 Immunisierung von Versuchstieren

Es wurden männliche und weibliche Mäuse im Alter von 6 bis 12 Wochen verwendet, die im institutseigenen Tierstall unter pathogenfreien Bedingungen gehalten, bzw. von der Firma Charles River (*Sulzfeld*) bezogen wurden.

Die Impfstoffe wurden anhand verschiedener Immunisierungsschemas gemäß folgender Tabelle verabreicht:

<i>Impfstoff</i>	<i>Route</i>	<i>Dosis</i>	<i>Pufferlösung</i>
<b>Adenoviren (AdV)</b>	<i>intraperitoneal (i.p.)</i>	$1 \times 10^9$ IU	250 $\mu$ l PBS-Puffer [pH 7,4]
<b>Plasmid-DNA (endotoxinfrei)</b>	<i>intramuskulär (i.m.) in tibialis anterior</i>	2 x 50 $\mu$ g	50 $\mu$ l PBS-Puffer [pH 7,4]
<b>Semliki-Forest-Viren (SFV)</b>	<i>subkutan (s.c.)</i>	$1 \times 10^7$ IU	100 $\mu$ l PBS-Puffer [pH 7,4]
<b>Vakziniaviren (MVA)</b>	<i>intraperitoneal (i.p.)</i>	$1 \times 10^8$ IU	250 $\mu$ l PBS-Puffer [pH 7,4]

**Tabelle 15: Übersicht der applizierten Impfstoffe, die verwendete Route und die Impfdosis.**

#### 3.5.2 Isolierung von murinen Lymphozyten

Die Herstellung muriner Lymphozyten-Kulturen erfolgte ausschließlich unter Verwendung steriler Materialien und Lösungen.

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation (Genickbruch) getötet und mit 80%igem Ethanol desinfiziert. Das Fell wurde am unteren, linken Rippenbogen durch einen etwa 3-4 cm langen Schnitt eröffnet und die Dermis erneut mit 80%igem Ethanol von Fellresten gereinigt. Nach Eröffnung des Peritoneums wurde die Milz mit einer Pinzette entnommen, von Fett und Bindegewebe befreit und sofort in 5 ml eiskaltes T-Zell-Medium überführt.

Zur Vereinzelung der Zellen wurde die Milz in einer Petrischale ( $\varnothing = 6$  cm) mit dem Stempel einer 10 ml Spritze in 5 ml T-Zell-Medium durch ein Metallsieb zerrieben und die Einzelzell-Suspension 5 min bei 4 °C und 1500 Upm (*Megafuge 1.0R, Heraeus*) sedimentiert. Zur Entfernung der Erythrozyten durch hypotonische Lyse wurde das Zellsediment für 2 min mit 2 ml Erythrozyten-Lysepuffer (*siehe S. 31*) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden mit 10 ml Medium gewaschen, durch ein Zellsieb filtriert und in frischem Medium resuspendiert.

Die Gesamtzellzahl wurde mit einem Neubauer-Hämatocyztometer (*siehe 3.3.5, S. 46*) bestimmt. Abhängig vom Mäusestamm und Alter der Mäuse konnten durchschnittlich zwischen 80-120 Mio. Lymphozyten pro Milz isoliert werden.

### **3.5.3 Herstellung von Lipopolysaccharid-Blasten (LPS-Blasten)**

Die Lymphoblastenkulturen wurden 3 Tage vor dem Anlegen einer Primärkultur (*siehe 3.5.4, S. 56*) angesetzt.

Für die Herstellung von B-Zell-Blasten wurden Einzelzellsuspensionen aus den Milzen naïver Mäuse präpariert (*siehe 3.5.2, S.55*) und auf  $10^6$  Zellen/ml mit LPS-Medium (*siehe S. 30*) eingestellt. Je 40 ml Zellsuspension wurde in T85-Zellkulturflaschen 3 Tage lang aufrecht stehend bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre in einem Wärmeschrank (*FUNCTIONline BB 16 CU, Heraeus*) kultiviert.

### **3.5.4 Anlegen einer Peptid-spezifischen T-Lymphozyten-Primärkultur**

Für das Anlegen einer Peptid-spezifischen T-Lymphozyten-Primärkultur wurden LPS-Blasten benötigt (*siehe 3.5.3*), die als Antigen präsentierende Zellen eingesetzt wurden und costimulatorische Lymphokine zur Verfügung stellen. Aus diesem Grund mussten die LPS-Blasten aus demselben Mausstamm angefertigt werden, wie die zu kultivierenden Effektor-Lymphozyten.

Aus Milzen immunisierter Mäuse wurden Einzelzellsuspensionen präpariert (*siehe 3.5.2, S. 55*) und auf  $7 \times 10^6$  Zellen/ml T-Zell-Medium eingestellt. Die 3 Tage zuvor präparierten LPS-Blasten wurden geerntet und mit 30 Gy (3000 rad) durch eine <sup>137</sup>Cs-Strahlenquelle gammabestrahlt. Anschließend wurden die B-Zell-Blasten zweimal mit RPMI 1640 ohne FBS und Pen-Strep gewaschen und für 5 min bei 4 °C und 1500 Upm (*Megafuge 1.0R, Heraeus*) zentrifugiert.

Um die MHC-Moleküle der Blasten mit Peptid zu beladen, wurde das Zellsediment in 1 ml RPMI 1640 ohne FBS und Pen-Strep resuspendiert und mit 10 µl β<sub>2</sub>-Mikroglobulin [1 mg/ml], sowie 5 µl des entsprechenden Stimulatorpeptids [1 mg/ml] inkubiert. Nach 40-45 min Inkubation bei 37 °C wurden die Peptid beladenen Blasten gewaschen und auf  $3 \times 10^6$  Zellen/ml T-Zell-Medium eingestellt.

Je 1 ml der Effektor-Lymphozyten und der LPS-Blasten wurden in 24-Loch-Platten überführt und dort je nach Einsatzzweck 5-7 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre in einem Wärmeschrank (*FUNCTIONline BB 16 CU, Heraeus*) cokultiviert

### 3.5.5 Anlegen einer T-Lymphozyten-Primärkultur mit MHV-68-infizierten Lymphozyten

Um Antigen-spezifische T-Lymphozyten unabhängig eines definierten T-Zell-Epitops in einer Primärkultur anreichern zu können, wurde die Stimulation mit dem kompletten Antigen durchgeführt. Dazu wurden Lymphozyten naïver Mäuse mit 0,1 infektiösen Partikeln pro Zelle (MOI = 0,1) eines für das Antigen rekombinanten murinen  $\gamma$ -Herpesvirus MHV-68 (*bereitgestellt von Susanne El-Gogo und Dr. Heiko Adler*) infiziert. Nach 1,5 h Infektion bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre wurden die Lymphozyten mit Medium gewaschen und mit 30 Gy (3000 rad) bestrahlt. Die Stimulatorzellen wurden erneut mit Medium gewaschen und auf  $6 \times 10^6$  Zellen/ml T-Zell-Medium eingestellt.

Die Effektor-Lymphozyten wurden präpariert wie unter 3.5.2 (S. 55) beschrieben und auf  $6 \times 10^6$  Zellen/ml T-Zell-Medium eingestellt. Je 1 ml der Effektor-Lymphozyten wurde mit 1 ml der Stimulatorzellen in 24-Loch-Platten kokultiviert. Die Inkubationszeit betrug dort je nach Einsatzzweck 5-7 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre.

### 3.5.6 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Für die intrazelluläre Zytokinfärbung wurden ausschließlich Antikörper (*siehe Tabelle 7, S. 28*) und das *Cytofix/Cytoperm Kit* der Firma *BD Pharmingen (Hamburg)* verwendet.

Je 15-20 Mio. frisch präparierte Lymphozyten (*siehe 3.5.2, S. 55*) oder T-Lymphozyten aus Primärkulturen (3.5.5, 3.5.6) wurden in 2 ml T-Zell-Medium in 24-Loch-Platten ausgesät. Die Stimulation erfolgte mit 1  $\mu$ g/ml des Stimulatorpeptids, bzw. mit  $1,5 \times 10^6$  MC3T3-E1 Zellen, die am Tag zuvor mit entsprechenden rekombinanten MHV-68 infiziert wurden (MOI = 1). Die Inkubation erfolgte für 5 h bei Peptidstimulation, bzw. 10 h bei Stimulation mit infizierten MC3T3-E1-Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre.

Als Negativkontrolle diente die Zugabe eines irrelevanten Peptids (*z.B. Flu, siehe Tabelle 9, S. 30*), bzw. die Zugabe von MC3T3-E1-Zellen, die mit Wildtyp MHV-68 infiziert wurden.

Nach 2 h Inkubationszeit wurde 1  $\mu$ l/ml Brefeldin A (*BD GolgiPlug*) zugegeben und die Zellen gut resuspendiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen entweder sofort in 15 ml *Falcon*-Röhrchen geerntet, oder über Nacht bei 4 °C belassen.

Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Weiterbehandlung der Zellen ausschließlich auf Eis unter Verwendung von gekühlten Lösungen und einer auf 4 °C gekühlten Zentrifuge (*Megafuge 1.0R, Heraeus*).

Die geernteten Zellen wurden 5 min bei 1500 Upm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Sediment im Dunkeln für 20 min in je 240 µl FACS-Puffer (*siehe S. 31*), 1 µg/ml Ethidium Monoazid Bromid (EMA) und 5 µg/ml anti-CD16/CD32 (*F<sub>c</sub>-Block*) inkubiert. Da Antikörper nicht nur mit dem Antigen, sondern auch mit den F<sub>c</sub>-Rezeptoren vieler Zellen (z.B. B-Lymphozyten, NK-Zellen, Makrophagen) interagieren können, werden diese Rezeptoren durch den F<sub>c</sub>-Block abgesättigt.

Die Zellen wurden im Doppelansatz auf 96-Loch-Spitzboden-Platten überführt und 10 min mit sichtbarem Licht beleuchtet. EMA verbindet sich unter Lichteinfluss photochemisch mit Nukleinsäuren und färbt so selektiv tote Zellen an (*Riedy, Muirhead et al. 1991*).

Die Zellen wurden 2 min bei 1400 Upm sedimentiert und zelluläre Oberflächenproteine in 50 µl FACS-Puffer mit PE-anti-CD8a [1:100], APC-anti-CD62L [1:200] und bei Bedarf mit PerCP-anti-CD4 [1:200] Antikörpern für 20 min markiert. Nach dreimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen 15 min in 100 µl *BD Cytofix/Cytoperm* permeabilisiert.

Die Markierung intrazellulärer Proteine erfolgte nach zweimaligem Waschen mit *BD Perm/Wash*. Ein Teil des Doppelansatzes wurde im Dunkeln für 30 min in 50 µl *BD Perm/Wash* durch einen FITC-anti-IFN-γ [1:500] Antikörper markiert. Der andere Teil des Doppelansatzes wurde mit einem Antikörper gleichen Isotyps, aber irrelevanter Spezifität (FITC-anti-Ratte-IgG1 [1:500]) inkubiert, um unspezifische Färbungen z.B. über F<sub>c</sub>-Rezeptoren nachweisen zu können.

Die Zellen wurden dreimal mit *BD Perm/Wash* gewaschen und jeweils in 250 µl PBS / 1 % Paraformaldehyd (PFA) aufgenommen. PFA kreuzvernetzt zelluläre Proteine und erhält dabei weitgehend die morphologischen Strukturen der Zelle. So konserviert konnten die Zellen bis zur Messung am Fluoreszenzdurchflusszytometer bis zu 3 Tage bei 4 °C unter Lichtabschluss gelagert werden.

### **3.5.7 Fluoreszenzdurchflusszytometrie (FACS-Analyse)**

In einem Fluoreszenzdurchflusszytometer (FACS-Gerät) können Zellen anhand von Größe, Granularität und Oberflächenbeschaffenheit untersucht werden. Dabei werden die fluoreszenzmarkierten Zellen in einer Trägerflüssigkeit durch eine Kapillare gedrückt. Hierbei wird der Flüssigkeitsstrahl so verfeinert, dass die darin enthaltenen Zellen einzeln den Lichtstrahl eines Argon-Lasers (488 nm) passieren können. Die Zellen verursachen dabei eine Streuung des Lichts und die Fluoreszenzfarbstoffe werden angeregt.

Das Vorwärtsstreulicht (FSC, forward scatter) des Lasers ist proportional zur Größe der Zelle, während das Seitwärtsstreulicht (SSC, sideward scatter) ein Maß für die Granularität der



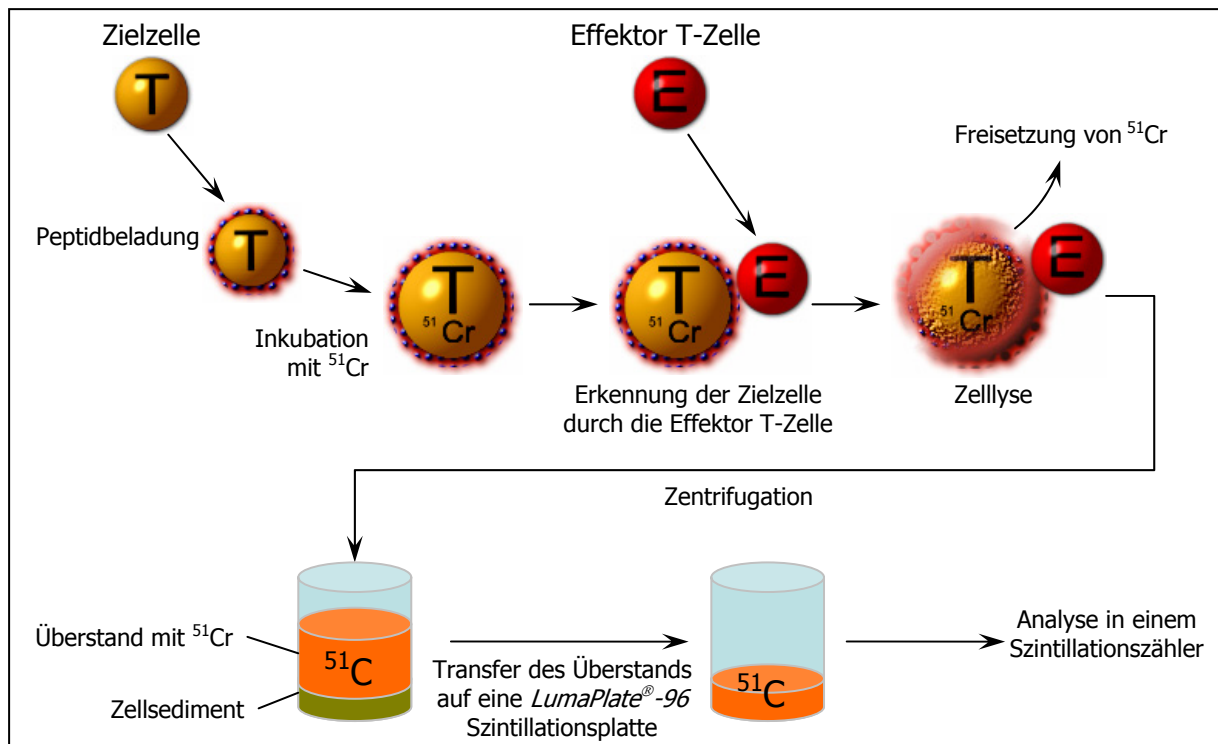
Zellen ist. Dies ermöglichte eine erste morphologische Unterscheidung der verschiedenen Zellpopulationen (z.B. Lymphozyten, Makrophagen, Granulozyten). Zudem konnten so Zelltrümmer, tote Zellen und Zellaggregate von der zu analysierenden Zellpopulation ausgegrenzt werden. Auf Grund der unterschiedlichen Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe, können die Signale durch ein komplexes System von Filtern und Prismen gleichzeitig analysiert werden. Da sich die emittierten Wellenlängen dabei zu einem gewissen Grad überschneiden, ist eine Kompensation der Signale erforderlich.

Die vom FACS-Gerät (*FACScalibur*, *BD Biosciences*) aufgezeichneten Signale wurden direkt mit der Software *CellQuest Pro 4.02* (*BD Biosciences, Heidelberg*) analysiert und ausgewertet.

### 3.5.8 Chrom-Freisetzungsversuch

Die zytotoxische Aktivität CD8-positiver T-Lymphozyten wurde in einem Chrom-Freisetzungsversuch ermittelt (*siehe Abbildung 12*). Abhängig vom T-Zellrezeptor der jeweiligen Effektorzellen wurden verschiedene Zielzellen verwendet (P815 bei BALB/c, T2-A2K<sup>b</sup> bei HHD und MC3T3-E1 bei C57BL/6N Mäusen), die mit dem Zielpeptid beladen, oder mit MHV-68 infiziert wurden. Die Zielzellen wurden mit radioaktivem Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> inkubiert und so intern radioaktiv markiert. Die zu testenden Effektor-T-Zellen der immunisierten Mäuse wurden in unterschiedlichem Effektor-/Zielzellen-Verhältnis zusammen inkubiert.

Erkennen die Effektorzellen den Komplex aus Antigen und MHC-Molekül auf den Zielzellen, werden diese lysiert und <sup>51</sup>Cr wird freigesetzt. Dieses konnte anschließend mit einem Szintillationszähler (*TopCount NXT, Packard*) gemessen und mit den Spontan- und Maximallysen in Relation gesetzt werden.



**Abbildung 12: Das Prinzip des Chrom-Freisetzungsvorgangs.** (Abgewandelte Darstellung aus: *Instruction Manual of MicroBeta* (Wallac Oy))

### Durchführung:

Zielzellen wurden gezählt und entweder für 1,5 h mit MHV-68 (MOI = 10) infiziert, oder während der 1,5 h Chromierung in 150 µl Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> / PBS / 10 % FBS [50-75 µCi] mit 10<sup>-6</sup> M Peptid bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit T-Zell-Medium von nicht internalisiertem <sup>51</sup>Cr gewaschen und auf 96-Loch-Rundbodenplatten verteilt (1 x 10<sup>4</sup> pro Loch). Zytotoxische T-Zellen (ZTL) aus einer 5 Tage alten Primärkultur (*siehe* 3.5.4, S. 56; 3.5.5, S. 57) wurden in verschiedenen Effektor:Zielzellen-verhältnissen (1:100 / 1:30 / 1:10 / 1:3 / 1:1) im Doppelansatz zu den Zielzellen gegeben. Zur Ermittlung der Spontanlyse wurde im 4fach-Ansatz anstatt der Effektorzellen nur Medium, für die Maximallyse 2 %iges NP40-Medium zugegeben. Die Inkubation erfolgte 4-6 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Nach 9 min Zentrifugation bei 1300 Upm (*Megafuge 1.0R, Heraeus*) wurden je 30 µl der Überstände mit einer Mehrkanalpipette auf eine *LumaPlate®-96*-Scintillationsplatte transferiert und über Nacht eingetrocknet. Die Messung der Platten erfolgte dann in einem Szintillationszähler (*TopCount NXT, Packard*) und die spezifische Lyse wurde anhand folgender Formel ermittelt:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{\text{Freigesetztes } ^{51}\text{Cr der Probe} - \text{Spontanlyse}}{\text{Maximallyse} - \text{Spontanlyse}} \times 100 \%$$

## 4 Ergebnisse

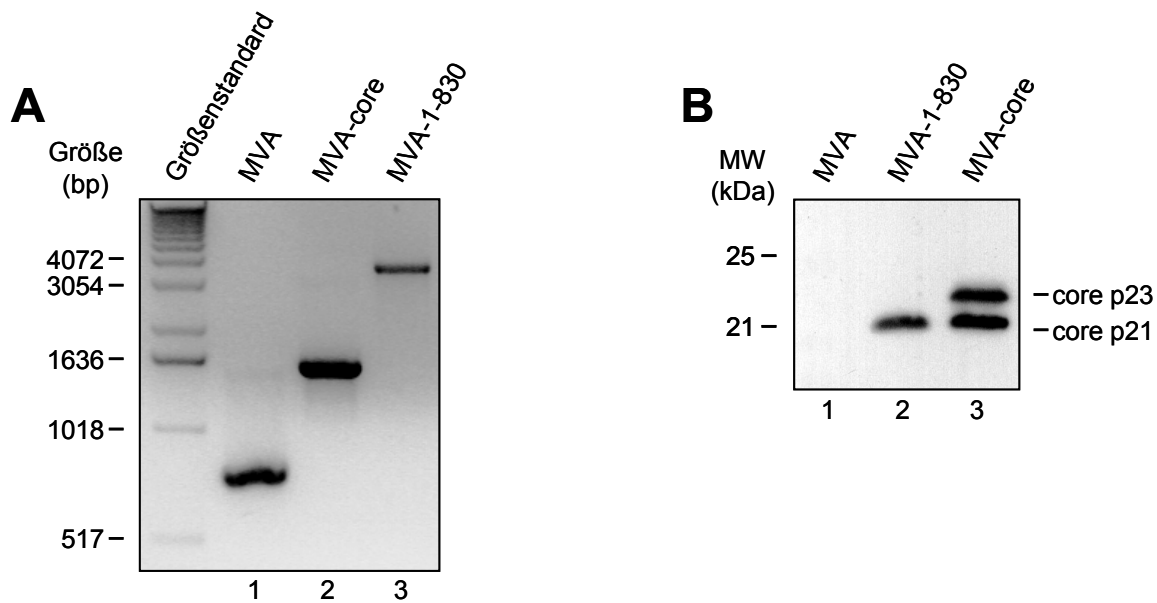
### 4.1 Präparation der Viren MVA-P<sub>7.5</sub>-HCV-core und MVA-P<sub>7.5</sub>-HCV-1-830

Das Nukleokapsidprotein des Hepatitis C Virus ist unter den HCV-Viruspezies hochkonserviert und stellt daher ein attraktives Ziel für die Entwicklung eines Impfstoffs dar. In unserem Labor standen bereits rekombinante MVA zur Verfügung, die die Gensequenzen für HCV-Strukturproteine beinhalten, MVA-P<sub>7.5</sub>-HCV-core (MVA-core) und MVA-P<sub>7.5</sub>-HCV-1-830 (MVA-1-830). Das MVA-core Virus codiert für das HCV-Nukleokapsidprotein (Core) (Aminosäuren 1-191 des HCV-Polyproteins) und MVA-1-830 für die gesamten HCV-Strukturproteine (Core, Hüllproteine (E1, E2), Hydrophobes Protein p7; Aminosäuren 1-830 des HCV-Polyproteins). Die HCV-Transgene wurden mithilfe eines Transferplasmids durch homologe Rekombination an die Stelle der Deletion III ins MVA-Genom (Isolat F6) inseriert (Staub, Drexler et al. 2000).

Um die Viren auf korrekte Insertion der HCV-Transgene zu überprüfen, wurden BHK-21-Zellen infiziert (MOI = 1, 24 h) und anschließend die virale DNA isoliert (siehe 0, S. 54). Die PCR-Analyse des Bereichs der Deletion III mit den spezifischen Primern NIH-GS83 und IIIf-1B (siehe 2.10, S. 29) ergab PCR-Produkte mit den Größen von ~760 bp für die leere Deletion III beim Wildtyp-Virus, ~1560 bp bei MVA-core und ~3580 bp bei MVA-1-830 (siehe Abbildung 13 A, S. 62).

Zum Nachweis der rekombinanten Genexpression wurden BHK-21-Zellen mit MVA, MVA-core und MVA-1-830 infiziert (MOI = 10, 24 h). In einer Western-Blot-Analyse der Zelllysate mit einem Anti-HCV-Antikörper (*Antigenix*) (1:10000) konnte bei den mit MVA-core und MVA-1-830 infizierten Zellen ein Signal bei 21 kDa detektiert werden, was dem Molekulargewicht des HCV-core Proteins entspricht. Mit MVA-core infizierte Zellen zeigten ein zusätzliches Signal bei 23 kDa (siehe Abbildung 13 B, S. 62).

Nach erfolgreicher Überprüfung der rekombinanten Viren wurden Lager- und Impfviruspräparationen hergestellt (siehe 3.4.1, S. 48) und anschließend bei -80 °C gelagert.



**Abbildung 13: Charakterisierung der Viren MVA-core und MVA-1-830 in einer PCR-Analyse (A) und Nachweis des HCV-core Proteins durch Western-Blot-Analyse (B).** (A) PCR-Analyse viraler DNA mit Primern für die Deletion III (NIH-GS83 / IIIf-1B). (Spur 1) MVA, (Spur 2) MVA-core, (Spur 3) MVA-1-830. Die PCR-Produkte wurden in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt; als Größenstandard diente eine 1 kb-DNA-Leiter. (B) BHK-21-Zellen wurden 24 h mit den Viren MVA (Spur 1), MVA-core (Spur 2) und MVA-1-830 (Spur 3) infiziert (MOI = 10). Die Zellysate wurden in einem 15 % Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem Anti-HCV-Antikörper (1:10000) inkubiert. Die Detektion des HCV-core-Proteins erfolgte durch Chemilumineszenz (Lumi-Light®, Roche) auf einem Röntgenfilm.

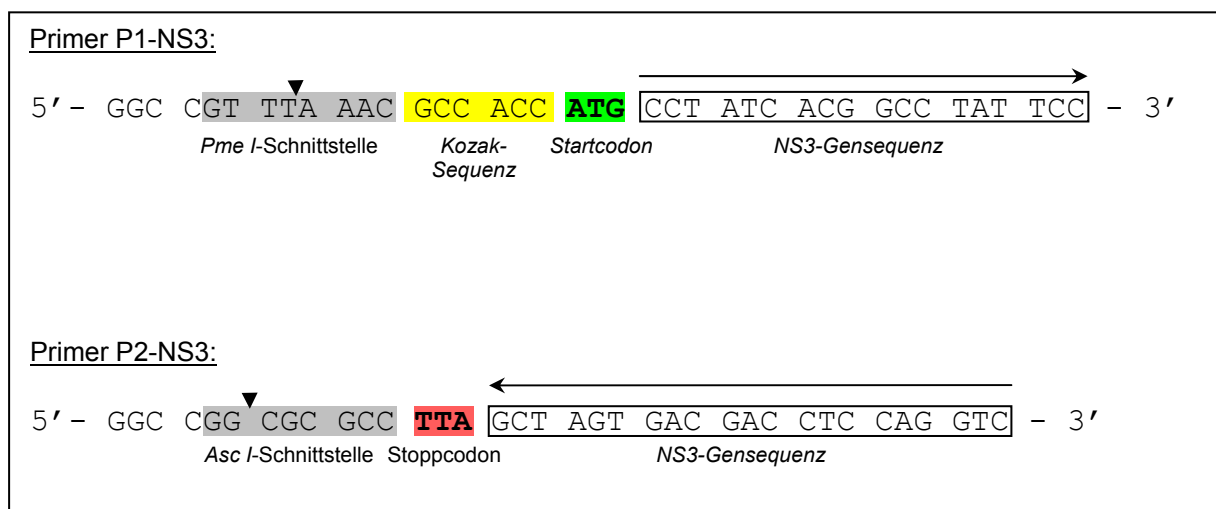
#### 4.2 Konstruktion von rekombinantem MVA-P<sub>7,5</sub>-HCV-NS3

Einen weiteren Ansatz zur Bekämpfung des Hepatitis C Virus beruht auf der Verwendung des Nichtstrukturproteins NS3 als Impfstoff. Neben einer RNA-Helikase-Funktion besitzt das NS3-Protein die enzymatische Aktivität einer Serin-Protease und ist für die Spaltung des HCV-Polyproteins in die einzelnen, funktionellen Untereinheiten verantwortlich (Tomei, Failla et al. 1993; Gallinari, Brennan et al. 1998). Da das NS3-Protein diese essenzielle und zentrale Rolle im Replikationszyklus des Hepatitis C Virus spielt, ist es auch unter den HCV-Viruspezies hochkonserviert. Neuesten Studien zufolge mit HCV-infizierten Patienten, korreliert eine Verringerung der Viruslast bis hin zur Spontanheilung der HCV-Infektion mit einer gegen NS3 gerichteten, zellulären Immunantwort (Wertheimer, Miner et al. 2003). Dies macht HCV-NS3 zu einem attraktiven Zielantigen für Impfstoff-induzierte Immunantworten.

### 4.2.1 Klonierung des Vektorplasmids pIIIΔHR-P<sub>7.5</sub>-HCV-NS3

Zur Herstellung rekombinanter MVA wird ein Transferplasmid benötigt, welches die Integration der Zielgene in das MVA-Genom durch Rekombination homologer Nukleotidsequenzen vermittelt (siehe 3.4.4, S. 51). Die Insertion des NS3-Gens an die Stelle der Deletion III im MVA-Virus wurde durch Subklonierung der NS3-Gensequenz in das Vektorplasmid pIIIΔHR-P<sub>7.5</sub> (siehe Abbildung 10, S. 51) ermöglicht. Die dafür verwendete NS3-Gensequenz stammt aus der cDNA eines Hepatitis C (Genotyp 1b) Isolats (Shimotohno HCV-1b-Isolat) (Kato, Hijikata et al. 1990).

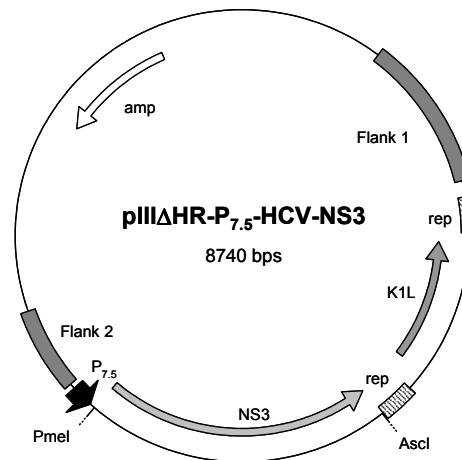
Da das HCV-Genom nur für ein großes Polyprotein codiert, war die Einführung eines Startcodons (ATG) am 5'-Ende und eines Stoppcodons (TAA) am 3'-Ende der NS3-Gensequenz erforderlich. Dies konnte durch entsprechendes Primer-Design erreicht werden (siehe Abbildung 14). Zur Optimierung der Genexpression in eukaryontischen Zellen diente die Insertion einer Kozak-Sequenz (GCCACC) vor das Startcodon, die die Bindung der mRNA an die kleine 40 S-Untereinheit der Ribosomen erleichtert (Kozak 1987). Damit das NS3-Gen in das Vektorplasmid pIIIΔHR-P<sub>7.5</sub> inseriert werden konnte, enthielten die PCR-Oligonukleotide Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *Pme I* und *Asc I*.



**Abbildung 14:** In die PCR-Oligonukleotide für die Amplifikation der HCV-NS3-Gensequenz wurden eine *Pme I*- bzw. *Asc I*-Schnittstelle, eine Kozak-Sequenz und ein Start- bzw. Stoppsignal eingefügt.

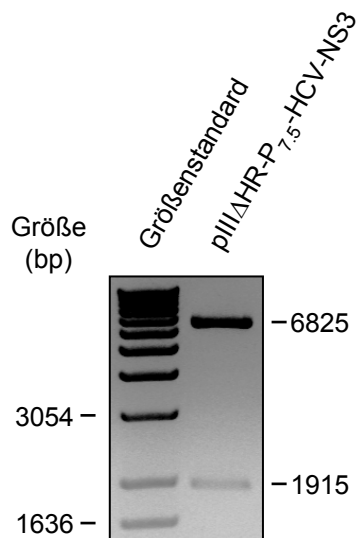
Die Amplifikation der NS3-Gensequenz aus der HCV-1b-cDNA erfolgte durch eine präparative PCR-Reaktion, unter Verwendung der Korrektur lesenden Pwo-DNA-Polymerase (Roche) (siehe 3.2.4.3, S. 38). Die Ligation der mit den Restriktionsendonukleasen *Pme I* und *Asc I* geschnittenen NS3-Gensequenz in den ebenfalls mit *Pme I* und *Asc I* behandelten,

dephosphorylierten Vektor, führte zur Generierung des Plasmids pIII $\Delta$ HR-P<sub>7.5</sub>-HCV-NS3 (siehe Abbildung 15).



**Abbildung 15:** Im Vektorplasmid pIII $\Delta$ HR-P<sub>7.5</sub>-HCV-NS3 steht das HCV-NS3 Gen unter der Kontrolle des Vakziniaviruspromotors P<sub>7.5</sub>.

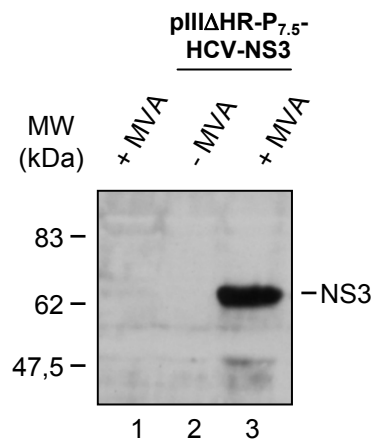
Eine Analyse des mit den Restriktionsendonukleasen *Pme I* und *Asc I* geschnittenen Transferplasmids pIII $\Delta$ HR-P<sub>7.5</sub>-HCV-NS3 in einem 1 % Agarosegel resultierte in zwei Banden mit den Größen von 1915 bp und 6825 bp (siehe Abbildung 17). Dies entspricht den erwarteten Größen bei der Exzision der NS3-Gensequenz aus dem Vektor.



**Abbildung 16:** Charakterisierung des Vektorplasmids pIII $\Delta$ HR-P<sub>7.5</sub>-HCV-NS3 durch Restriktionsverdau. Eine Restriktionsspaltung des Plasmids mit *Pme I*/*Asc I* ermöglichte die Exzision der NS3-Gensequenz. Die DNA-Fragmente wurden in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt; als Größenstandard diente eine 1 kb-DNA-Leiter.

#### 4.2.2 Nachweis der Synthese des NS3-Proteins durch pIII $\Delta$ HR-P<sub>7.5</sub>-HCV-NS3

Da das NS3-Gen im Plasmid unter der transkriptionellen Kontrolle des Vakziniaviruspromotors P<sub>7.5</sub> steht, wurde das Vektorplasmid in MVA-infizierte (MOI = 10) BHK-21-Zellen transfiziert, um die korrekte Genexpression zu überprüfen. Als Kontrolle dienten MVA-infizierte BHK-21-Zellen und die Transfektion des Plasmids in BHK-21-Zellen ohne MVA-Coinfektion. Eine Western-Blot-Analyse der Zelllysate mit einem Anti-HCV-Antikörper (1:1000) ergab ein spezifisches Signal bei den mit MVA coinfizierten Zellen (siehe *Abbildung 17*). Die Größe des detektierten Polypeptids entspricht mit ~70 kDa dem apparenten Molekulargewicht des NS3-Proteins in einem SDS-Polyacrylamidgel.



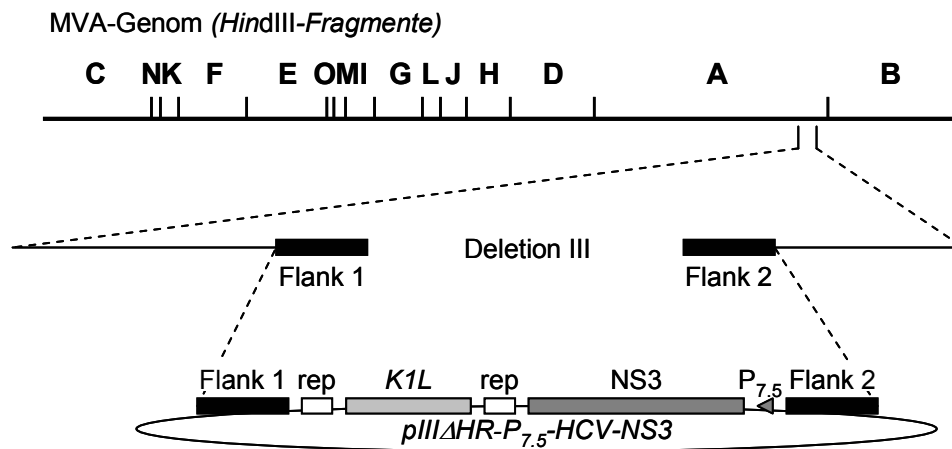
**Abbildung 17: Nachweis der NS3-Genexpression durch Western-Blot-Analyse.** Lysate von MVA-infizierten BHK-21-Zellen (Spur 1), sowie von mit pIII $\Delta$ HR-P<sub>7.5</sub>-HCV-NS3 transfizierten BHK-21-Zellen ohne (Spur 2) und mit MVA Coinfektion (Spur 3), wurden in einem 10 % Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem Anti-HCV-Antikörper (1:1000) inkubiert. Die Detektion des HCV-NS3-Proteins erfolgte durch Chemilumineszenz (Lumi-Light<sup>®</sup>, Roche) auf einem Röntgenfilm.

#### 4.2.3 Generierung von MVA-P<sub>7.5</sub>-HCV-NS3

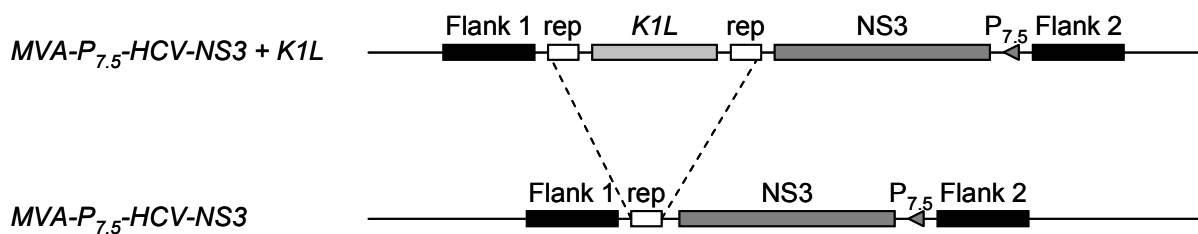
Nach genetischer und funktioneller Analyse des MVA-Transferplasmids pIII $\Delta$ HR-P<sub>7.5</sub>-HCV-NS3 konnte mit der Konstruktion des rekombinanten MVA-P<sub>7.5</sub>-HCV-NS3 (MVA-NS3) begonnen werden. Die Transfektion des Transferplasmids pIII $\Delta$ HR-P<sub>7.5</sub>-HCV-NS3 in mit MVA-II<sub>new</sub> infizierte CEF-Zellen (siehe 3.4.4.1.2, S. 52) ermöglichte die Integration der im Transferplasmid enthaltenen Gene für HCV-NS3 und *KIL* ins MVA-Genom. Dies konnte durch homologe Rekombination der im Transferplasmid enthaltenen MVA-Sequenzen

(Flank 1 und Flank 2) mit den an die Deletion III im MVA-Genom angrenzenden Nukleotidsequenzen erreicht werden (siehe Abbildung 18 A, S. 66).

**A**



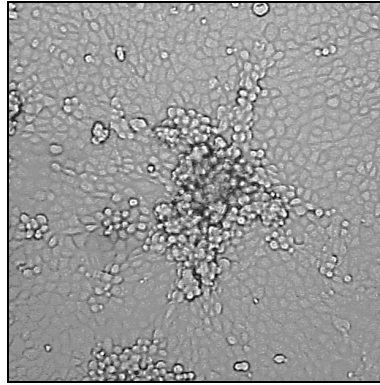
**B**



**Abbildung 18: Konstruktion eines rekombinanten MVA-Virus am Beispiel des MVA-P<sub>7.5</sub>-HCV-NS3.** (A) Durch homologe Rekombination der Flanken können die im Transferplasmid *pIIIΔHR-P7.5-HCV-NS3* zwischen Flank 1 und Flank 2 liegenden Gensequenzen stabil ins MVA-Genom inseriert werden. Das resultierende Virus enthält noch das Wirtsspezifitätsgen *K1L*. (B) Nach Entfernen des Selektionsdrucks durch Viruspassagen auf für MVA permissiven BHK-21-Zellen kann das *K1L*-Gen durch homologe Rekombination der benachbarten *LacZ*-Sequenzen (*rep*) effektiv aus dem MVA-Genom entfernt werden. Das Resultat ist ein rekombinantes Virus, welches nur das inserierte Gen und eine einzelne *LacZ*-Sequenz (*rep*) trägt.

Der nach 48 h geerntete und dreimal gefriergetaute Transfektionsansatz wurde zur Infektion von RK13-Zellen verwendet, in denen das Wachstum von MVA nicht möglich ist. Die Funktion des inserierten *K1L*-Gens ermöglicht jedoch das Wachstum rekombinanter Viren. Dies führt zur Bildung von Infektionsherden, die sehr gut lokalisiert werden können und die Selektion rekombinanter Viren erlauben (siehe Abbildung 19, S. 67).





**Abbildung 19:** Die Expression des *K1L*-Gens ermöglichte den rekombinanten MVA-Viren das Wachstum auf RK13-Zellen. Die Sichtung von Aggregaten Virus-infizierter Zellen ermöglichte eine Isolierung rekombinanter Viren (400fache Vergrößerung).

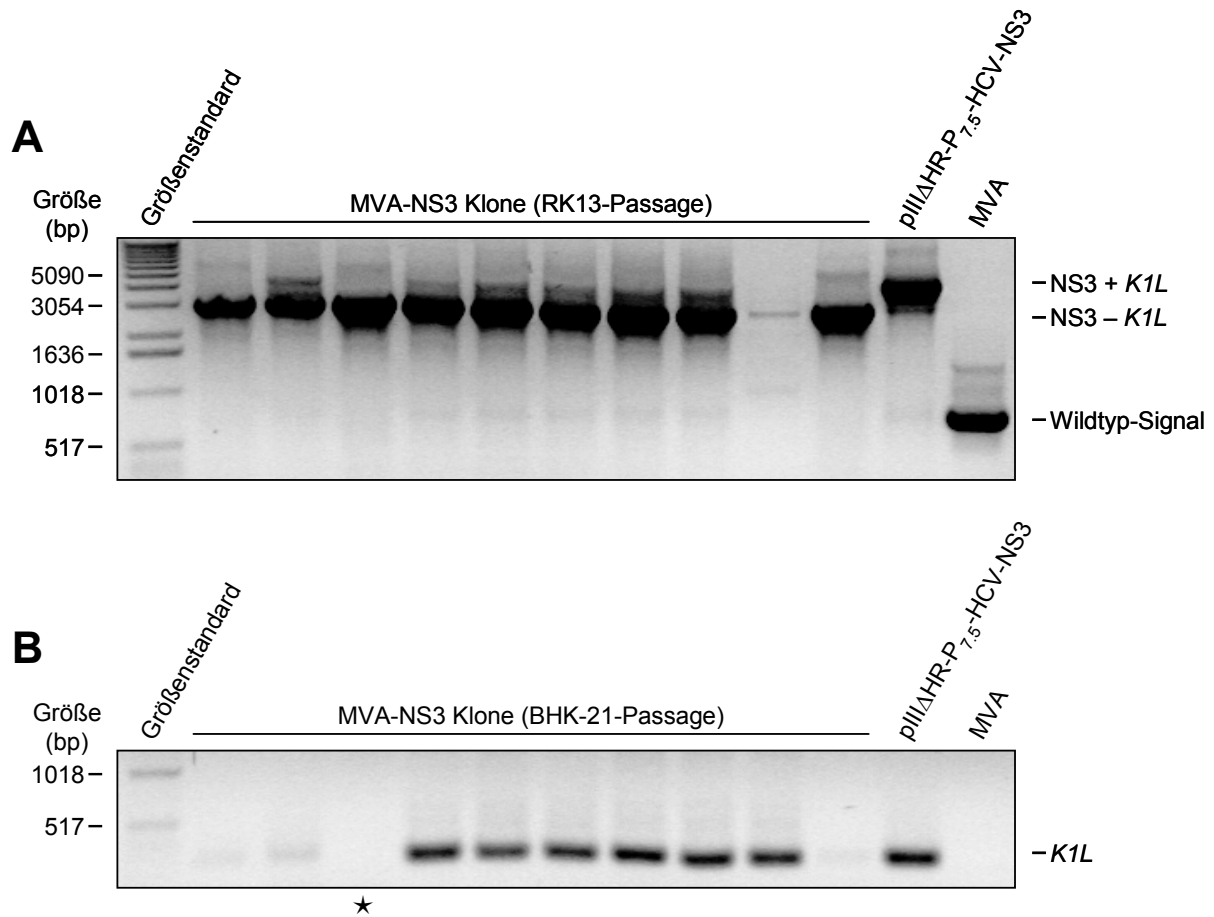
Die genomische DNA rekombinanter Virusisolate wurde mithilfe einer PCR-Analyse auf korrekte Geninsertion überprüft. Dazu wurde das für die Deletion III spezifische Oligonukleotidpaar NIH-GS83 / IIIf-1B (siehe 2.10, S. 29) eingesetzt. Für die amplifizierten DNA-Fragmente wurden folgende Größen erwartet:

4464 bp bei korrekter Integration der Gensequenzen von NS3 und *K1L*

3197 bp bei Integration der NS3-Gensequenz und bereits deletiertem *K1L*

762 bp für den Bereich der „leeren“ Deletion III des Wildtyp-MVA

Wie aus *Abbildung 20 A* (S. 68) hervorgeht, kam es bei allen getesteten Virusisolaten zu einer Insertion der Fremdgene an die Stelle der Deletion III, zudem war bereits eine effiziente Deletierung des *K1L*-Gens feststellbar.



**Abbildung 20: PCR-Analyse viraler DNA einzelner MVA-NS3 Virusplaques.** Die spezifischen PCR-Produkte wurden in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt; als Größenstandard diente eine 1 kb-DNA-Leiter. **(A)** Virusisolate aus einer RK13-Passage. Mit spezifischen PCR-Oligonukleotiden für die Deletion III (NIH-GS83 / IIIf-1B) wurde die korrekte Integration des NS3-Gens ins MVA-Genom überprüft. Es wurden nur Virusklone weitergeführt, die möglichst kein Wildtyp-Signal zeigten. **(B)** Virusisolate aus einer BHK-21-Passage. Die erfolgreiche Entfernung des Markergens K1L konnte mit spezifischen Primern (K1Lint 1 / K1Lint 2) überprüft werden. Von dem K1L-freien Virusklon (\*) wurde eine primäre Viruspräparation hergestellt.

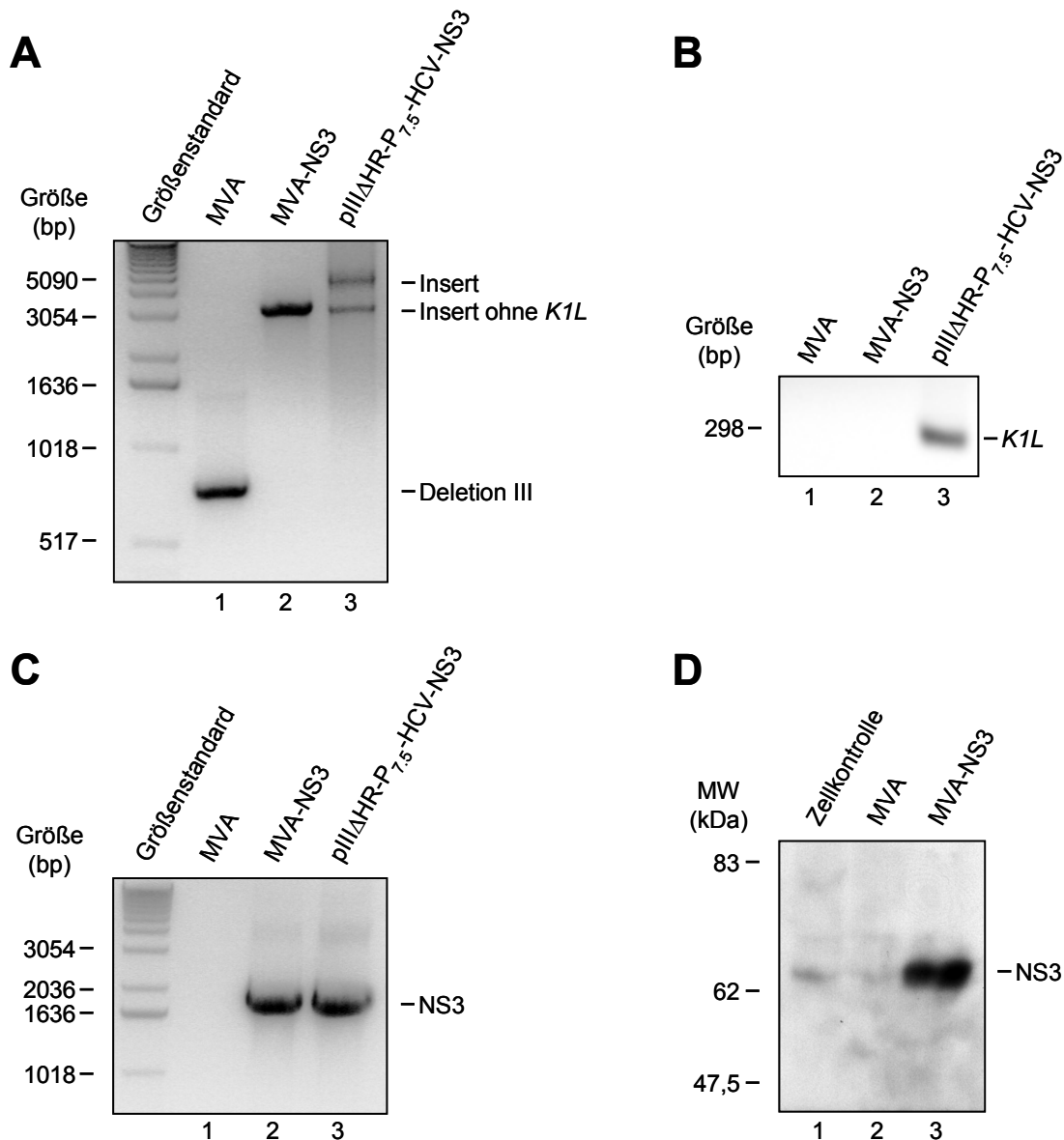
Nach der Isolation klonaler Populationen rekombinanter Viren, wurden die Klone auf für MVA permissiven BHK-21-Zellen weiteren Passagen unterzogen. Da die Funktion des Wirtsspezifitätsgens *KIL* für das MVA-Wachstum hier nicht essenziell ist, kann es durch homologe Rekombination der benachbarten *LacZ*-Sequenzen wieder effektiv entfernt werden (siehe Abbildung 18 B, S. 66). Nachdem durch PCR-Analyse der Virusgenome mit *KIL*-spezifischen Primern (*KIL*int-1 / *KIL*int-2) die Abwesenheit der *KIL*-Gensequenz bestätigt werden konnte (siehe Abbildung 20 B), wurde von dem rekombinanten MVA-NS3 in CEF-Zellen eine primäre Viruspräparation hergestellt (siehe 3.4.1, S. 48).

#### 4.2.4 *In vitro* Charakterisierung von MVA-NS3

Zur detaillierten Untersuchung des Genoms des rekombinanten Virus MVA-NS3 diente die PCR-Analyse viraler DNA mit dem spezifisch gegen die Deletion III gerichteten Oligonukleotidpaar NIH-GS83 / IIIf-1B. Für die PCR-Produkte wurden folgende Größen erwartet: ~760 bp für die leere Deletion III beim Wildtyp-Virus, ~4470 bp für die Integration des kompletten Inserts und ~3160 bp, wenn *KIL* und eine *LacZ*-Flanke deletiert wurden.

Die PCR-Analyse bestätigte die korrekte Integration des NS3-Gens an die Stelle der Deletion III im MVA-Genom (*siehe Abbildung 21 A, S. 70*). Das Wirtsspezifitätsgen *KIL* war bei der PCR-Untersuchung des rekombinanten Virusgenoms mit *KIL*-spezifischen Oligonukleotiden (*KILint-1 / KILint-2*) nicht mehr nachweisbar (*siehe Abbildung 21 B, S. 70*). Bei einer PCR-Analyse mit NS3-spezifischen Primern (P1-NS3 und P2-NS3) konnte die NS3-Gensequenz eindeutig im MVA-NS3-Genom nachgewiesen werden (*siehe Abbildung 21 C, S. 70*). Die erwartete Größe des PCR-Produkts betrug ~1930 bp.

Um die Produktion des NS3-Proteins durch MVA-NS3 zu überprüfen, wurde eine Western-Blot-Analyse mit Lysaten MVA-NS3-infizierter CEF-Zellen durchgeführt. Mit einem Anti-HCV-Antikörper (*Antigenix*) (1:1000) konnte das NS3-Genprodukt mit dem erwarteten Molekulargewicht von ~70 kDa nachgewiesen werden. (*siehe Abbildung 21 D, S. 70*).



**Abbildung 21: In vitro Charakterisierung von MVA-P<sub>7.5</sub>-HCV-NS3 mittels PCR- (A, B, C) und Western-Blot-Analyse (D).** (A, B, C) Die durch spezifische PCR gewonnenen DNA-Fragmente wurden in einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt; als Größenstandard diente eine 1 kb-DNA-Leiter. (A) PCR-Analyse mit Primern für die Deletion III (NIH-GS83 / IIIf-1B). (Spur 1) MVA, (Spur 2) MVA-NS3, (Spur 3) pIIIΔHR-P<sub>7.5</sub>-HCV-NS3. (B) PCR-Analyse mit K1L-spezifischen Primern (K1Lint-1 / K1Lint-2). (Spur 1) MVA, (Spur 2) MVA-NS3, (Spur 3) pIIIΔHR-P<sub>7.5</sub>-HCV-NS3. (C) PCR-Analyse mit NS3-spezifischen Primern (P1-NS3 / P2-NS3). (Spur 1) MVA, (Spur 2) MVA-NS3, (Spur 3) pIIIΔHR-P<sub>7.5</sub>-HCV-NS3. (D) Lysate von Virus-infizierten CEF-Zellen wurden in einem 10% Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem Anti-HCV-Antikörper (1:1000) inkubiert. Die Detektion des HCV-NS3-Proteins erfolgte durch Chemilumineszenz (Lumi-Light®, Roche) auf einem Röntgenfilm. (Spur 1) Zellkontrolle, (Spur 2) MVA-infizierte Zellen, (Spur 3) MVA-NS3-infizierte Zellen.

### **4.3 Untersuchung von HCV-spezifischen T-Zellantworten im Mausmodell**

Für die Ausheilung persistierender Virusinfektionen, wie sie bei der chronischen Hepatitis C Erkrankung vorgefunden wird, erscheint eine T-Zell-vermittelte Immunreaktion unerlässlich. Aus diesem Grund war nach erfolgreicher *in vitro* Charakterisierung der rekombinanten MVA-HCV die Untersuchung deren Fähigkeit, HCV-spezifische T-Zell-Antworten zu induzieren, von besonderem Interesse.

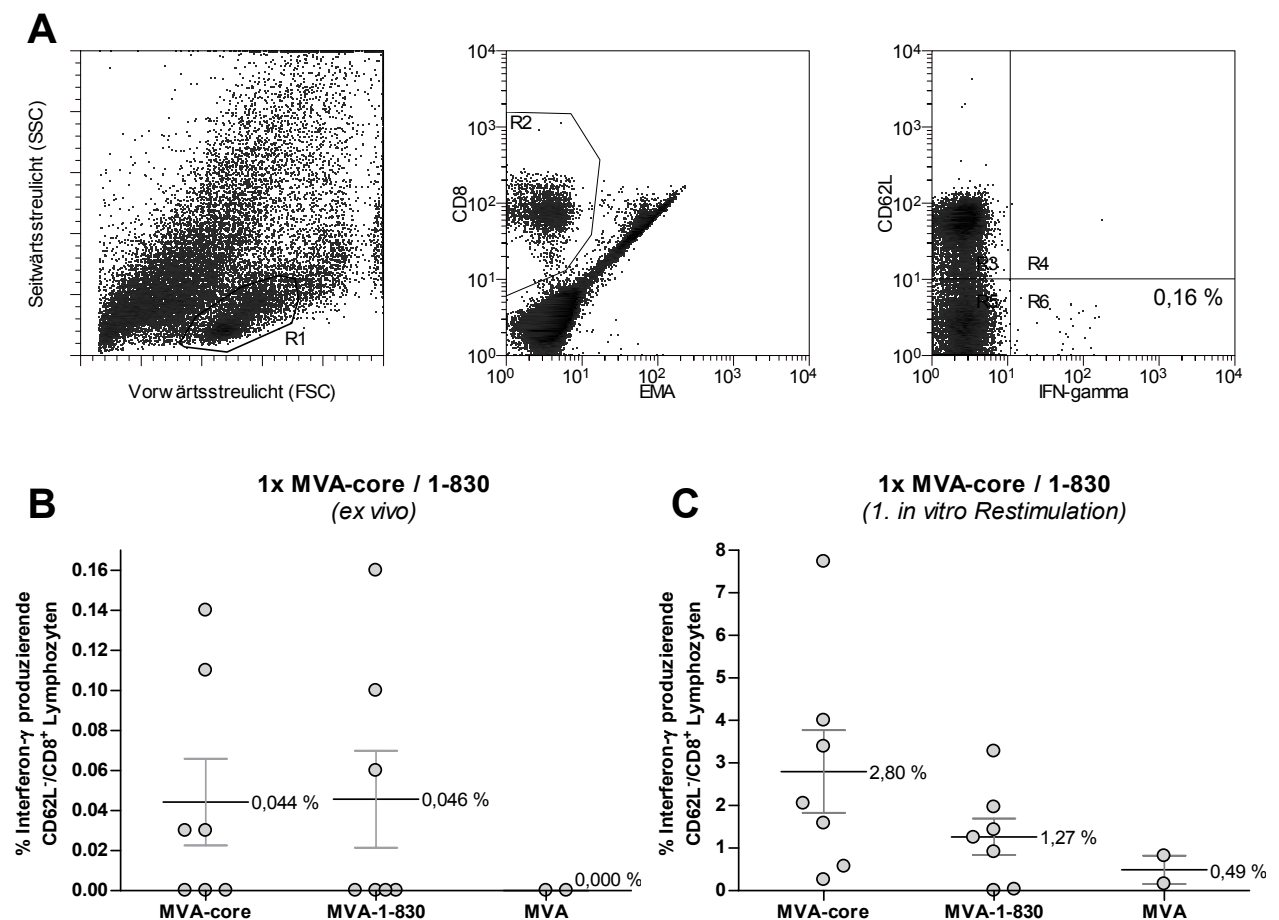
#### **4.3.1 Nachweis der Immunogenität der MVA-HCV-Vakzinen MVA-core und MVA-1-830 im Mausmodell**

Sowohl MVA-core, als auch MVA-1-830 sind in der Lage, ihre rekombinanten HCV-Gene *in vitro* zu exprimieren und deren Genprodukte zu synthetisieren. Deshalb wurde untersucht, ob die durch die MVA-HCV-Vakzinen produzierten HCV-Antigene *in vivo* spezifische Immunantworten induzieren können. Diese können z.B. durch intrazelluläre Zytokinfärbung gemessen werden. Dabei macht man sich zunutze, dass T-Zellen, die nach Erkennung ihres Antigens spezifisch aktiviert werden, Zytokine wie IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 oder TNF- $\alpha$  produzieren. Um die Reaktion von T-Lymphozyten auf verschiedene Antigene analysieren zu können, wurde die IFN- $\gamma$ -Produktion nach *in vitro* Stimulation mit dem Antigen in Gegenwart des Proteintransport-Inhibitors Brefeldin A gemessen. Brefeldin A inhibiert den Vesikel-Transport vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat und fixiert so das gebildete IFN- $\gamma$  in der Zelle (Misumi, Miki et al. 1986). Mithilfe eines Fluoreszenz gekoppelten, monoklonalen Antikörpers konnte dieses im Fluoreszenzdurchflusszytometer (FACScalibur, BD Biosciences) detektiert werden.

##### **4.3.1.1 Untersuchung der zellulären Immunantwort durch intrazelluläre Interferon- $\gamma$ -Färbung**

Um die beiden MVA-HCV-Vakzinen MVA-core und MVA-1-830 im Hinblick auf ihre Immunogenität vergleichen zu können, wurde die Induktion HCV-core-spezifischer CD8<sup>+</sup>-T-Zellantworten mithilfe eines HCV-core-spezifischen, HLA-A\*0201-restringierten Peptidpitops (DLMGYIPLV, DLM) direkt *ex vivo* in der akuten Phase der Immunantwort verfolgt. Hierfür wurden HLA-A\*0201-transgene Mäuse (HHD) mit einer Einzeldosis MVA-HCV (MVA-core bzw. MVA-1-830) oder MVA geimpft. Durch FACS-Analyse frisch

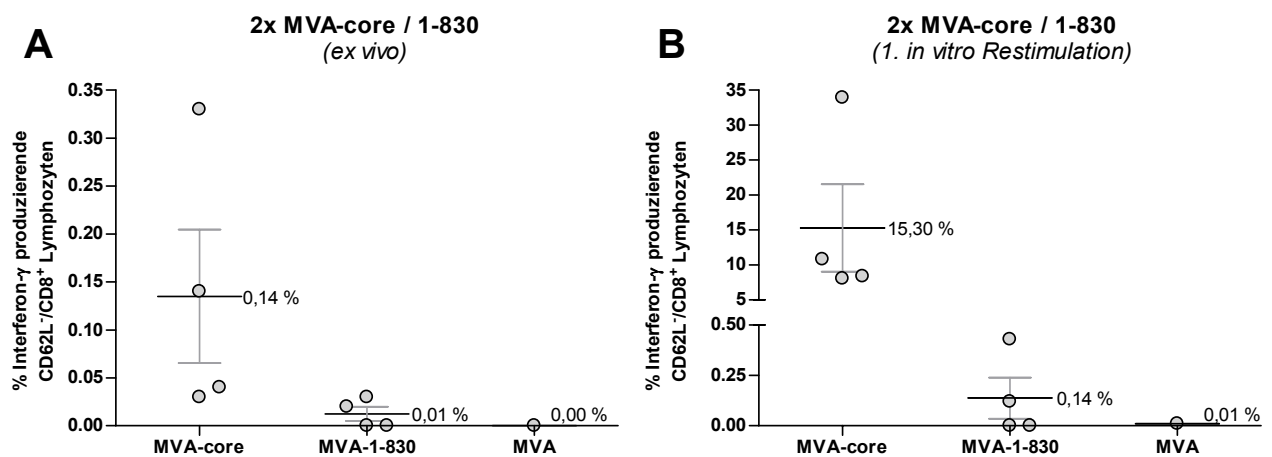
präparierter Milzzellen aus geimpften Tieren konnten im Mittel 0,044 % (max. 0,14 %) (MVA-core) bzw. 0,046 % (max. 0,16 %) (MVA-1-830) aktivierte Interferon- $\gamma$ -produzierende CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nachgewiesen werden, wohingegen eine Impfung mit MVA zu keiner spezifischen Aktivierung führte (siehe Abbildung 22 B, S. 72). Die Anzahl spezifischer CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ließ sich durch eine Peptid-spezifische *in vitro* Stimulation auf 2,80 % (max. 7,74 %) (MVA-core) bzw. 1,27 % (max. 3,28 %) (MVA-1-830) aller CD8<sup>+</sup>-Zellen expandieren (siehe Abbildung 22 C, S. 72).



**Abbildung 22: Induktion HCV-core-spezifischer CD8<sup>+</sup>-T-Zellantworten nach Impfung mit MVA-core, MVA-1-830 oder MVA.** Acht Tage nach der Impfung wurden Milzzellen der Tiere mit einem HCV-core-spezifischen Peptidepitop (DLM) stimuliert, mit EMA, PE-anti-CD8, APC-anti-CD62L und FITC-anti-IFN- $\gamma$  gefärbt. Zellen wurden im Durchflusszytometer auf Anwesenheit DLM-spezifischer, aktivierter (CD62L<sup>+</sup>) CD8<sup>+</sup>-T-Zellen analysiert. Die Höhe der induzierten T-Zellen ist als Prozentsatz Interferon- $\gamma$  sezernierender CD8<sup>+</sup>-T-Zellen innerhalb der lebenden (EMA<sup>+</sup>) CD8<sup>+</sup> Zellpopulation dargestellt. **(A)** Zellpopulationen im Streudiagramm; exemplarische Darstellung für 1 Tier (MVA-core geimpft). **(B)** Ergebnisse von Einzeltieren und Gruppenmittelwert mit Standardfehler nach ex vivo Analyse. **(C)** Ergebnisse von Einzeltieren und Gruppenmittelwert mit Standardfehler nach *in vitro* Stimulation.

Da die Anzahl HCV-spezifischer  $CD8^+$ -T-Lymphozyten nach einer einzigen MVA-Applikation relativ gering ausfiel (bis zu 0,16 %), wurde untersucht, ob sich die Immunantworten durch eine Auffrischungsimpfung verstärken lassen.

Hierfür wurden HHD-Mäuse in einem Intervall von 21 Tagen zweimal mit MVA-core, MVA-1-830 oder MVA immunisiert. Die *ex vivo* Analyse der Milzzellen immunisierter Tiere ergab einen Anteil von durchschnittlich 0,14 % (max. 0,33 %) (MVA-core) an aktivierten, Interferon- $\gamma$  produzierenden  $CD8^+$ -T-Zellen (siehe Abbildung 23 A). Eine Immunisierung mit MVA-1-830 oder MVA führte zu keiner *ex vivo* messbaren, spezifischen Aktivierung von  $CD8^+$ -T-Lymphozyten.



**Abbildung 23: Induktion HCV-core-spezifischer  $CD8^+$ -T-Zellantworten nach zwei Immunisierungen mit MVA-core, MVA-1-830 oder MVA.** Acht Tage nach der Folgeimpfung erfolgte eine FACS-Analyse der mit DLM-Peptid stimulierten Milzzellen. (A) Ergebnisse von Einzeltieren und Gruppenmittelwert mit Standardfehler nach *ex vivo* Analyse. (B) Ergebnisse von Einzeltieren und Gruppenmittelwert mit Standardfehler nach *in vitro* Stimulation.

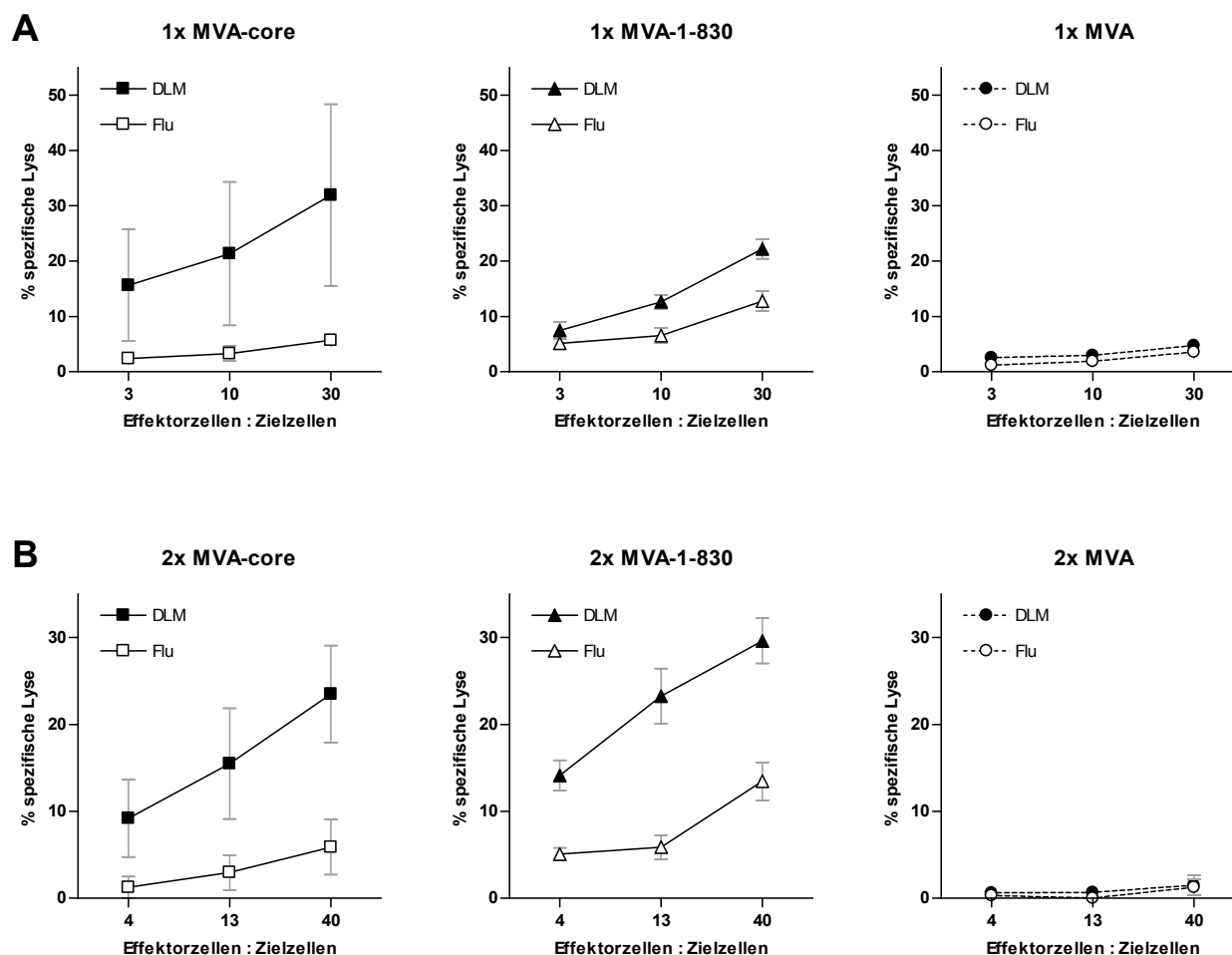
Die isolierten Milzzellen wurden ebenfalls für 1 Woche mit DLM-Peptid *in vitro* stimuliert, wodurch sich der Anteil Peptid-spezifischer  $CD8^+$ -T-Zellen auf durchschnittlich 15,30 % (max. 33,95 %) (MVA-core) bzw. 0,14 % (max. 0,43 %) (MVA-1-830) expandieren ließ (siehe Abbildung 23 B). Während bei den zweimal mit MVA-1-830 geimpften Tieren nur die Hälfte auf eine DLM-Peptidstimulation ansprach, war bei den zweimal mit MVA-core immunisierten Tieren im Vergleich zu den einmal geimpften Tieren eine Erhöhung des Anteils Epitop-spezifischer T-Zellen messbar. Dies spricht dafür, dass die Antigen-spezifische Immunantwort durch die Applikation einer Folgeimpfung erhöht werden kann.

#### 4.3.1.2 Nachweis HCV-core-spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten durch den Chrom-Freisetzungsversuch

Eine als besonders wichtig angesehene Eigenschaft von  $CD8^+$ -T-Lymphozyten ist deren zytotoxisches Potenzial, das sie befähigt, antigenpräsentierende Zielzellen aktiv zu zerstören. Da sich in mit MVA-core bzw. MVA-1-830 immunisierten Mäusen HCV-core-spezifische, Interferon- $\gamma$  produzierende  $CD8^+$ -T-Lymphozyten nachweisen ließen, war es von Interesse, ob diese T-Zellen auch in der Lage sind, HCV-core-spezifische Zielzellen zu erkennen und zu lysieren. Hierfür wurden HLA-A\*0201 transgene Mäuse (HHD) ein- oder zweimal mit MVA-HCV (MVA-core bzw. MVA-1-830) oder MVA immunisiert und die Milzzellen nach zwei DLM-spezifischen *in vitro* Stimulationen in einem Chrom-Freisetzungsversuch (*siehe* 3.5.8, S. 59) analysiert.

Sowohl die zytotoxischen T-Lymphozyten der einmal mit MVA-core immunisierten Mäuse, als auch die T-Zellen der zweimal immunisierten Tiere waren in der Lage, bis zu 30 % (Effektor:Zielzellen-Verhältnis (E:T) = 30:1) der mit DLM-Peptid beladenen T2-A2K<sup>b</sup>-Zellen spezifisch zu lysieren, während mit dem irrelevanten Flu-Kontrollpeptid beladene Zielzellen nicht lysiert wurden (*siehe* *Abbildung 24 A,B*, S. 75). Wie den Fehlerbalken in *Abbildung 24* zu entnehmen ist, konnte bei Milzzellen aus mit MVA-core geimpften Tieren bei einem E:T-Verhältnis von 30:1 auch spezifische Lyseraten von bis zu 48,36 % gemessen werden.





**Abbildung 24: Die spezifische Lyse Peptid beladener Zielzellen durch DLM stimulierte Milzzellen wurde in einem Chrom-Freisetzungsversuch ermittelt.** Mit DLM (■,▲,●) oder Flu (□,△,○) beladene Zielzellen (T2-A2K<sup>b</sup>-Zellen) wurden in unterschiedlichem Effektor:Zielzellen-Verhältnis mit Milzzellen immunisierter HHD-Mäuse inkubiert. Jede Kurve repräsentiert den Mittelwert mit Standardfehler aus bis zu 4 Einzelmäusen nach einer (A) oder zwei Immunisierungen (B).

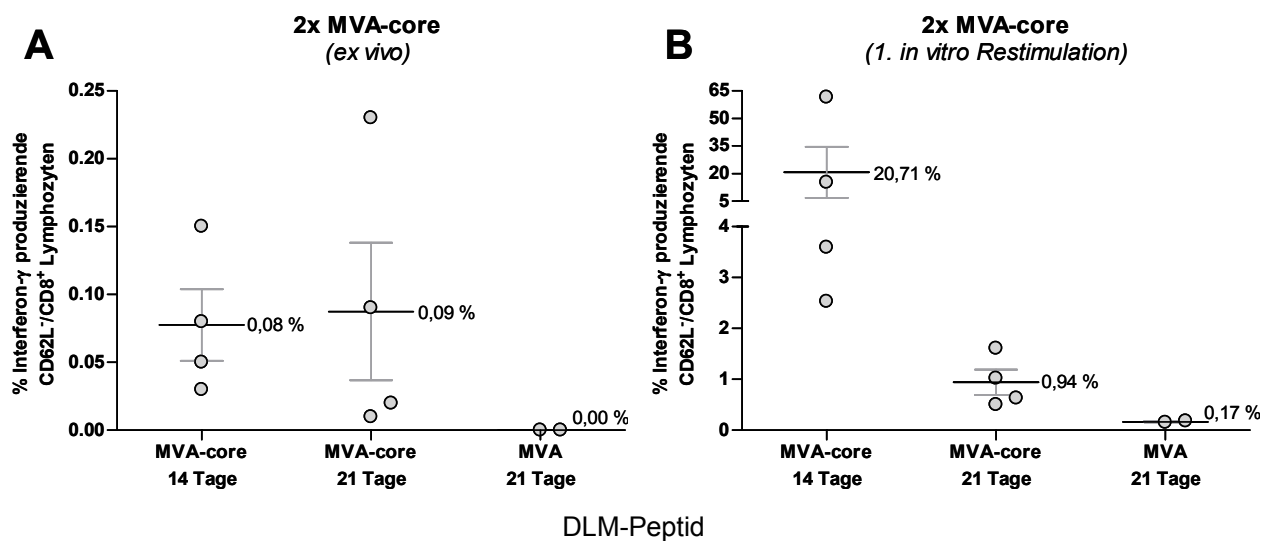
Auch bei den mit MVA-1-830 immunisierten Mäusen konnten spezifisch gegen das DLM-Peptid gerichtete zytotoxische T-Lymphozyten induziert werden, die in der Lage waren, bis zu 30 % der Zielzellen (E:T = 40:1) zu lysieren. Allerdings war hier auch eine geringe Lyse der mit Flu-Kontrollpeptid beladenen Zielzellen zu beobachten. Bei den mit Wildtyp-MVA immunisierten Mäusen waren keine ZTLs nachweisbar, die mit DLM- oder Flu-Peptid beladene T2-A2K<sup>b</sup>-Zellen zerstören konnten.

#### 4.3.2 Auswirkung unterschiedlicher Immunisierungsintervalle auf die zelluläre Immunantwort

Da für die wiederholte Verabreichung von MVA-Impfstoffen noch keine ausreichenden Informationen über den möglichen Einfluss des Impfintervalls vorliegen, war es von

besonderem Interesse, wie sich ein Impfintervall von 14 bzw. 21 Tagen auf die Ausprägung der zellulären Immunantwort auswirkt. Dazu wurden HHD-Mäuse mit MVA-core oder MVA immunisiert, und die Folgeimpfung nach 14 bzw. 21 Tagen appliziert. Die Analyse der CD8<sup>+</sup>-T-Zellantworten erfolgte direkt *ex vivo*, acht Tage nach der letzten Immunisierung durch intrazelluläre Interferon- $\gamma$ -Färbung von Einzelzellsuspensionen isolierter Milzen.

Mit dem HCV-core-spezifischen DLM-Peptid ließen sich in den mit MVA-core immunisierten Mäusen in einer FACS-Analyse im Mittel 0,08 % (max. 0,15 %) (14 Tage) bzw. 0,09 % (max. 0,23 %) (21 Tage) aktivierter, Interferon- $\gamma$  produzierende CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nachweisen (*siehe Abbildung 25 A*). Diese konnten durch DLM-spezifische *in vitro* Restimulation auf durchschnittlich 20,71 % (max. 61,47 %) (14 Tage) bzw. 0,94 % (max. 1,61 %) (21 Tage) amplifiziert werden (*siehe Abbildung 25 B*). CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten aus mit Wildtyp-MVA immunisierten Mäusen zeigten erwartungsgemäß keine Immunreaktion auf das HCV-core Peptid.



**Abbildung 25: Induktion HCV-core-spezifischer CD8<sup>+</sup>-T-Zellantworten nach zwei Immunisierungen mit MVA-core oder MVA.** Acht Tage nach der Folgeimpfung erfolgte eine FACS-Analyse der mit DLM-Peptid stimulierten Milzzellen. **(A)** Ergebnisse von Einzeltieren und Gruppenmittelwert mit Standardfehler nach *ex vivo* Analyse. **(B)** Ergebnisse von Einzeltieren und Gruppenmittelwert mit Standardfehler nach *in vitro* Stimulation.

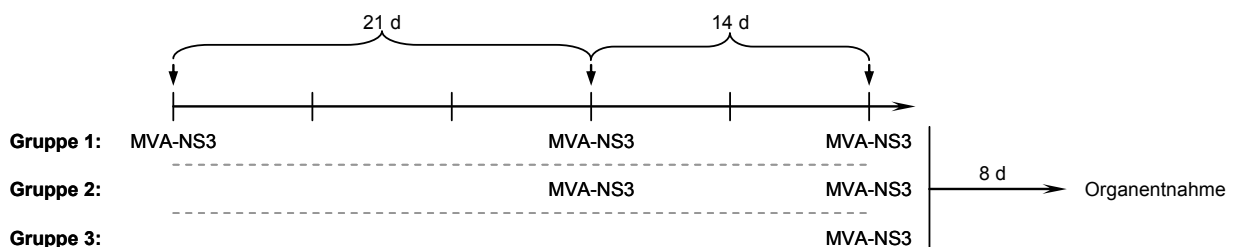
Bei der Evaluierung der Impfintervalle von 14 bzw. 21 Tagen konnte bei der *ex vivo* Analyse der Immunantworten kein Unterschied festgestellt werden. Da sich nach *in vitro* Restimulation der Milzzellen bei den nach 14 Tagen revakzinierten Tieren mehr DLM-Peptid-spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen amplifizieren ließen als bei den nach 21 Tagen reimmunisierten Tieren, wurden die weiteren Experimente mit einem Impfintervall von 14 Tagen durchgeführt.

### 4.3.3 Nachweis der Immunogenität von MVA-NS3 im Mausmodell

Die Verwendung von bisher für HCV-NS3 beschriebenen MHC-Klasse-I-restringierten Peptidepitopen war bei der Analyse der Immunantwort gegen HCV-NS3 erfolglos. Daher wurde ein Versuchsansatz gewählt, der eine Analyse der gegen HCV-NS3 gerichteten CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten ohne Kenntnis spezieller Epitope erlaubt. Dazu wurden C57BL/6-Mäuse mit MVA-NS3 immunisiert, die Stimulation der Milzzellen erfolgte anschließend mit syngenem MC-3T3-E1 Zellen, die mit einem für HCV-NS3 rekombinanten, murinen  $\gamma$ -Herpesvirus-68 (MHV-68-NS3) infiziert wurden.

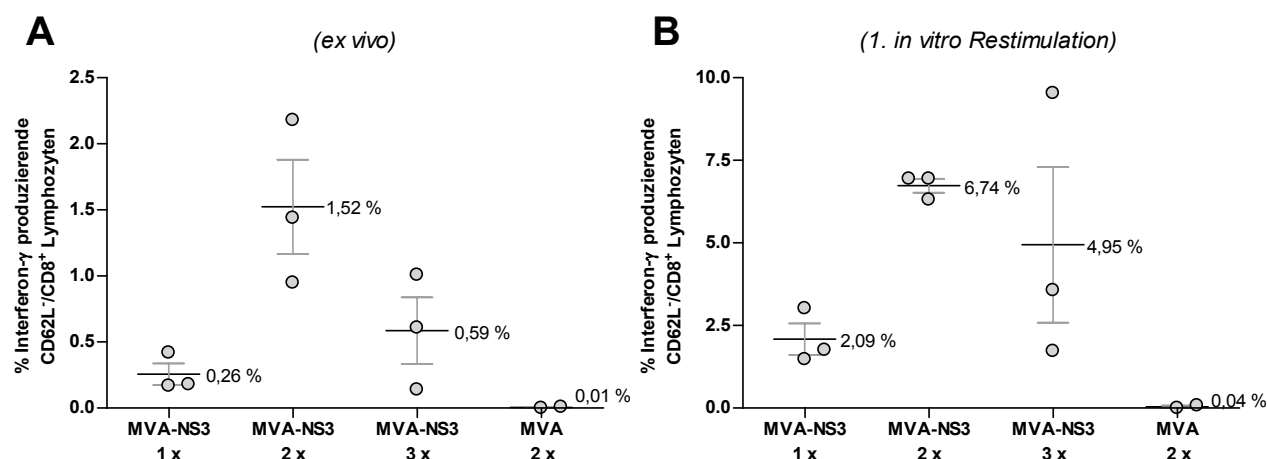
#### 4.3.3.1 Untersuchung der zellulären Immunantwort durch intrazelluläre Interferon- $\gamma$ -Färbung

In einem ersten Experiment sollte die Induktion HCV-NS3-spezifischer T-Zell-Antworten nach einer einzelnen MVA-NS3 Impfung im Vergleich zu Mehrfachimmunisierungen untersucht werden. Hierfür wurden C57BL/6-Mäuse in 3 Impfgruppen aufgeteilt und mit MVA-NS3 ( $10^8$  IE MVA-NS3 *i.p.*) nach folgendem Immunisierungsschema geimpft:



**Abbildung 26: Immunisierungsschema für die Applikation von MVA-NS3 in C57BL/6-Mäusen.**

Bei der *ex vivo* FACS-Analyse der Milzzellen einzelner Tiere konnten in allen Versuchsgruppen durchschnittlich bis zu 0,26 % (max. 0,42 %) (1x MVA-NS3), 1,52 % (max. 2,18 %) (2x MVA-NS3) oder 0,59 % (max. 1,01 %) (3x MVA-NS3) NS3-spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten nachgewiesen werden (*siehe Abbildung 27 A, S. 78*). Eine Impfung mit MVA führte zu keiner spezifischen T-Zell-Aktivierung. Durch die Applikation von zwei Impfdosen konnten mehr NS3-spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten induziert werden, als durch nur eine Applikation. Drei Impfdosen waren nicht in der Lage, diese Immunantwort weiter zu erhöhen.



**Abbildung 27: Induktion HCV-NS3-spezifischer CD8<sup>+</sup>-T-Zellantworten nach wiederholter Immunisierung (1x, 2x, 3x) mit MVA-NS3 oder MVA.** Acht Tage nach der letzten Immunisierung erfolgte eine FACS-Analyse der Milzzellen. **(A)** Ergebnisse von Einzeltieren und Gruppenmittelwert mit Standardfehler nach ex vivo Analyse. **(B)** Ergebnisse von Einzeltieren und Gruppenmittelwert mit Standardfehler nach in vitro Stimulation.

Durch NS3-spezifische *in vitro* Restimulation ließ sich die Anzahl der aktivierten Interferon- $\gamma$  produzierenden CD8<sup>+</sup>-T-Zellen auf im Mittel 2,09 % (max. 3,02 %) (1x MVA-NS3) bzw. 6,74 % (max. 6,95 %) (2x MVA-NS3) oder 4,95 % (max. 9,54 %) (3x MVA-NS3) erhöhen (siehe Abbildung 27 B, S. 78).

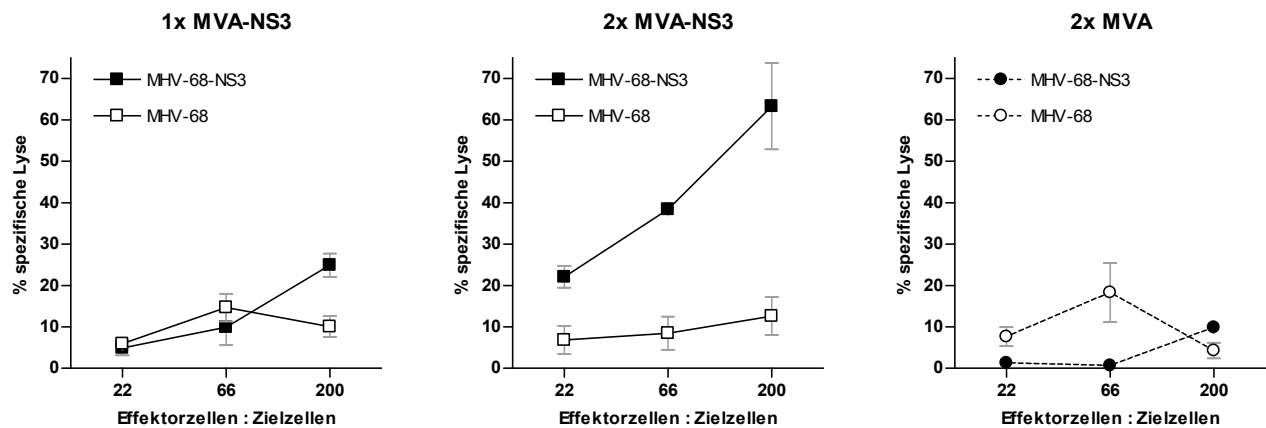
Da sich, bezogen auf die Mittelwerte, durch drei MVA-NS3-Impfapplikationen keine höheren Immunantworten induzieren ließen, als durch zwei Applikationen, wurde in Folgeversuchen die Immunisierung mit zwei MVA-Dosen favorisiert.

#### 4.3.3.2 Nachweis HCV-NS3-spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten durch den Chrom-Freisetzungsversuch

Da die Applikation von MVA-NS3 in Mäusen HCV-NS3-spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten induzieren kann, wurde untersucht, ob diese T-Zellen ebenfalls zytotoxische Effektorkapazitäten besitzen und mit MHV-68-NS3 infizierte MC-3T3-E1-Zellen spezifisch zerstören können.

Die Versuchsgruppen (je 3 Mäuse) erhielten 1 oder 2 Applikationen (14 Tage Intervall) MVA-NS3. Die Analyse der zytotoxischen T-Lymphozyten erfolgte mithilfe eines Chrom-Freisetzungsversuchs mit MHV-68-NS3 bzw. MHV-68 infizierten MC-3T3-E1-Zielzellen. Die Immunisierung mit MVA-NS3 induzierte in den geimpften Mäusen die Ausbildung HCV-NS3-spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten, die MHV-68-NS3-infizierte

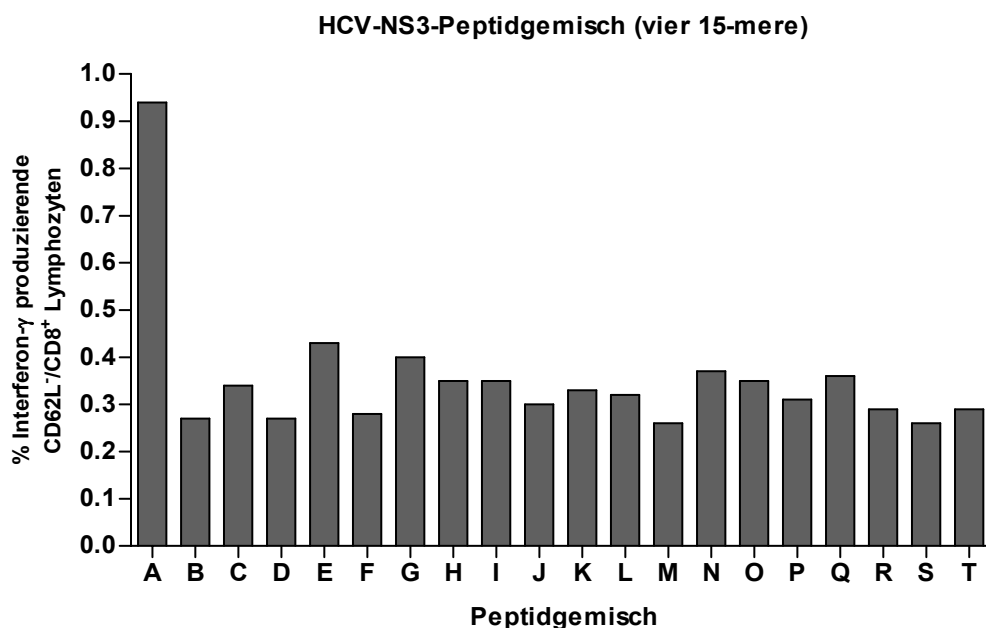
MC-3T3-E1-Zellen lysieren konnten (siehe Abbildung 28, S. 79). CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten aus zweimal mit MVA-NS3 vakzinierten Tieren waren in der Lage, höhere Lyseraten zu erzielen (63,3 % bei E:T = 200:1), als CD8<sup>+</sup>-T-Zellen aus nur einmal geimpften Mäusen (24,9 % bei E:T = 200:1). Zudem war ein geringeres Effektor:Zielzellen-Verhältnis erforderlich (38,4 % bei E:T = 200:1). Wie erwartet war bei den T-Zellkulturen aus mit MVA immunisierten Tieren keine spezifische Lyse der Zielzellen zu beobachten.



**Abbildung 28:** Die spezifische Lyse MHV-68-NS3-infizierter Zielzellen durch ZTLs von mit MVA-NS3 immunisierten Mäusen wurde in einem Chrom-Freisetzungsversuch ermittelt. Mit MHV-68-NS3 (■, ▲, ●) oder MHV-68 (□, △, ○) infizierte Zielzellen (MC-3T3-E1-Zellen) wurden in unterschiedlichem Effektor:Zielzellen-Verhältnis mit Milzzellen immunisierter C57BL/6-Mäuse inkubiert. Jede Kurve repräsentiert den Mittelwert mit Standardfehler aus bis zu drei Einzelmäusen nach einer oder zwei Immunisierungen.

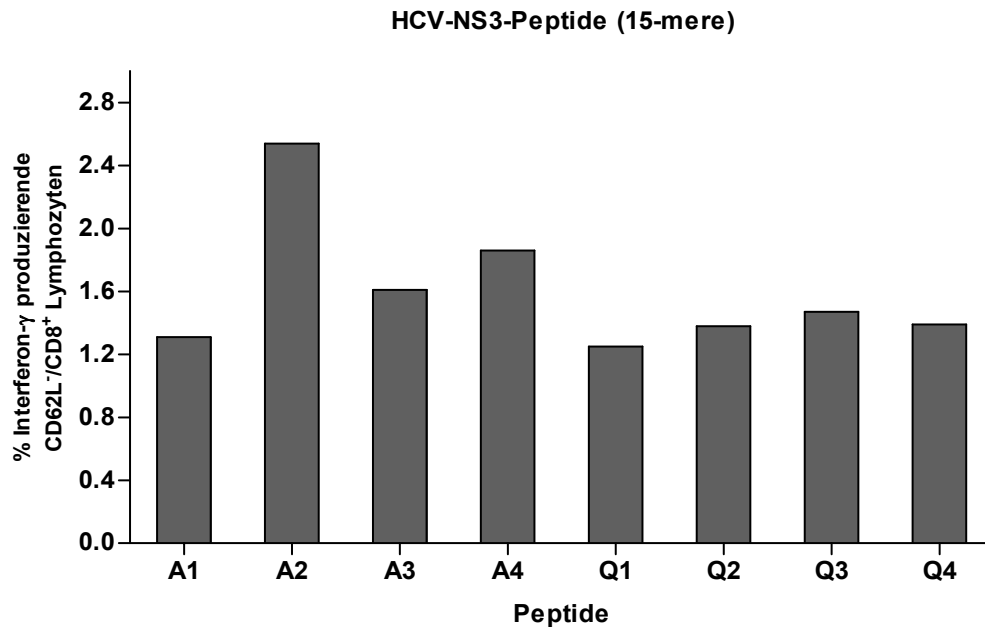
#### 4.3.4 Identifizierung eines immundominanten HLA-A\*0201-restringierten HCV-NS3 CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Epitops

Die Kenntnis von definierten, immunogenen Peptidepitopen ist hilfreich bei der Analyse zellulärer Immunantworten und ermöglicht die Effizienz einer Impfung auf zellmolekularer Ebene zu verfolgen. Für die Identifizierung eines HLA-A\*0201-restringierten, immundominanten HCV-NS3 CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Epitops war der Einsatz von HLA-A\*0201 transgenen HHD-Mäusen erforderlich. Die Mäuse erhielten zwei Immunisierungen mit MVA-NS3 ( $10^8$  IE MVA-NS3 *i.p.*) im Abstand von 14 Tagen. Nach einer NS3-spezifischen Stimulation durch MHV-68-NS3-infizierte naive (HHD-)Milzzellen, wurden die vereinigten Milzzellen der immunisierten Tiere mit einer Peptid-Bibliothek (siehe 6.2, S. 105) stimuliert. Die Bibliothek umfasst das gesamte HCV-NS3-Protein und besteht aus mit 7 Aminosäuren überlappenden 15-mer Oligopeptiden. Damit alle Epitope der Peptid-Bibliothek getestet werden konnten, erfolgte die Stimulation mit einem Peptidgemisch aus jeweils vier verschiedenen 15-meren. Die Zusammensetzung der Peptidgemische (A-T) ist in *Tabelle 16* (S. 105-107) ersichtlich.



**Abbildung 29: Quantifizierung HCV-NS3-spezifischer CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten durch intrazelluläre Interferon- $\gamma$ -Färbung.** Vereinigte Milzzellen aus mit MVA-NS3 immunisierten Mäusen wurden mit NS3-Oligopeptidgemischen (je vier 15-mer) stimuliert und in einer FACS-Analyse auf die Anwesenheit aktivierter, Interferon- $\gamma$  produzierender CD8<sup>+</sup>-T-Zellen untersucht.

Durch intrazelluläre Interferon- $\gamma$ -Färbung konnte in allen Kulturansätzen NS3-spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten nachgewiesen werden, allerdings war das Oligopeptidgemisch A in der Lage, höhere Immunantworten zu induzieren, als die Gemische B bis T (*siehe Abbildung 29, S. 80*).



**Abbildung 30: Quantifizierung HCV-NS3-spezifischer CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten durch intrazelluläre Interferon- $\gamma$ -Färbung.** Vereinigte Milzzellen aus mit MVA-NS3 immunisierten Mäusen wurden mit NS3-Oligopeptiden (15-mere) stimuliert und in einer FACS-Analyse auf die Anwesenheit aktivierter, Interferon- $\gamma$  produzierender CD8<sup>+</sup>-T-Zellen untersucht.

Nach einer Vereinzelung des viel versprechendsten Peptidgemisches A konnte im Vergleich zum Gemisch Q ein substanzielles CD8<sup>+</sup>-T-Zellepitop in der Aminosäuresequenz des Peptids A2 identifiziert werden (*siehe Abbildung 30, S. 81*). Da MHC-Klasse-I-Epitope nur 8-10 Aminosäuren umfassen, ist zur Bestimmung der exakten Sequenz des HLA-A\*0201-restringierten NS3-Peptidepitops eine Überprüfung aller 8-10mere nötig, die in der Aminosäuresequenz des 15mers A2 enthalten sind.

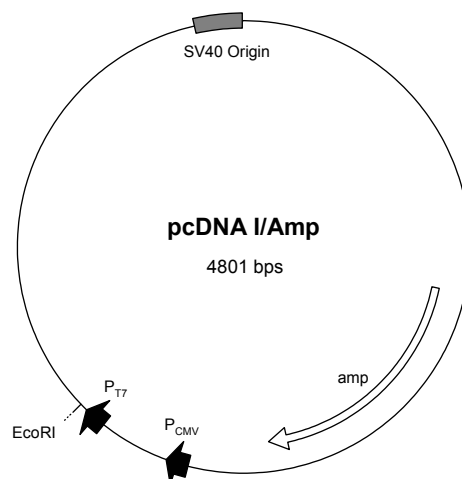
### 4.3.5 Steigerung der Immunogenität der MVA-Vakzinen durch heterologe Folgeimpfungen

Ein neuer attraktiver Ansatz zur möglichen Verbesserung von Impfwirkungen beruht auf der heterologen Verabreichung von Vektorimpfstoffen. Das Grundprinzip hinter dieser Methode ist, dass sich Immunantworten gegen das wiederholt verabreichte Zielantigen verstärken lassen, ohne die Immunantwort gegen den Impfvektor zu erhöhen. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob sich durch die Kombination der MVA-Vektoren mit Plasmid-DNA, Semliki-Forest-Viren (SFV) oder Adenoviren (AdV) die HCV-spezifische Immunantwort weiter steigern lässt.

#### 4.3.5.1 Steigerung der HCV-spezifischen Immunantwort durch heterologe DNA/MVA-Immunisierung

##### 4.3.5.1.1 Klonierung des Vektorplasmids *pcDNA-core*

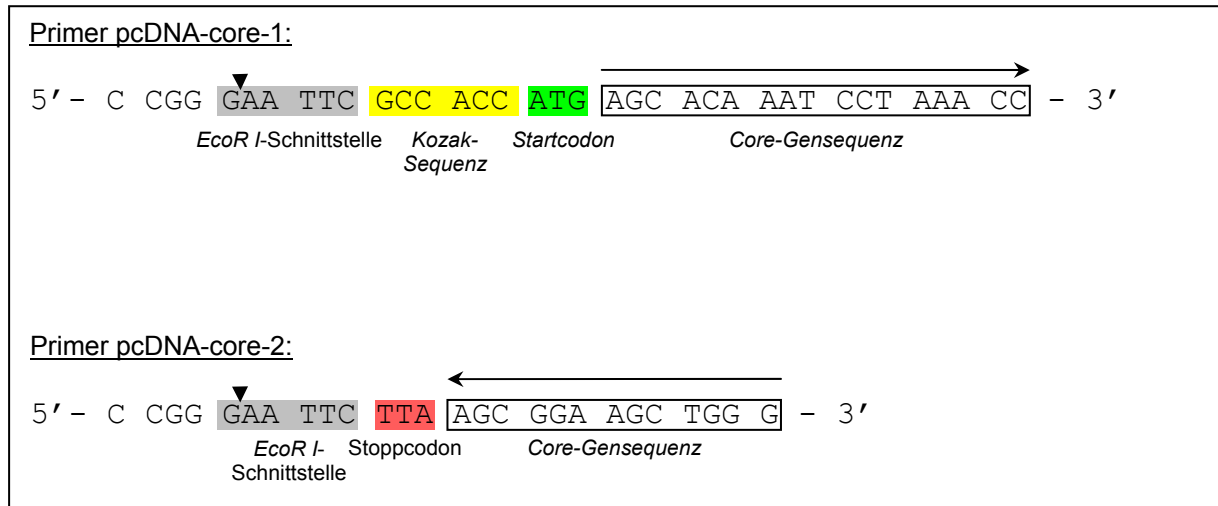
Für die Konstruktion eines HCV-core Plasmids wurde das Vektorplasmid *pcDNA I/Amp* verwendet, bei dem inserierte Gene unter transkriptioneller Kontrolle des für Säugerzellen generischen, unmittelbar/frühen Promotors des Zytomegalovirus (CMV),  $P_{CMV}$ , stehen.



**Abbildung 31:** Im Vektorplasmid *pcDNA I/Amp* (Invitrogen) können Gene für die Expression in Säugerzellen unter die transkriptionelle Kontrolle des unmittelbar/frühen CMV-Promotors ( $P_{CMV}$ ) gesetzt werden. Für eine *in vitro* Transkription der Gene durch die hocheffiziente T7-RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7, beinhaltet das Plasmid einen T7-Promotor ( $P_{T7}$ ). Die Selektion transformierter Bakterien wird durch eine Ampicillinrestistenz-Kassette (*amp*) vereinfacht.

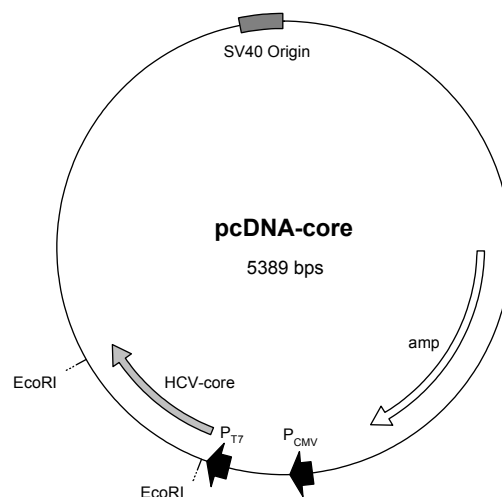


An die HCV-core-Gensequenz, die aus der HCV-1b-cDNA stammt (Kato, Hijikata et al. 1990), wurden unter Verwendung des Oligonukleotidpaares *pcDNA-core-1* / *pcDNA-core-2* Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonuklease *EcoR I*, ein Start- bzw. Stoppsignal, sowie eine Kozak-Sequenz (Kozak 1987) angefügt (siehe Abbildung 32).



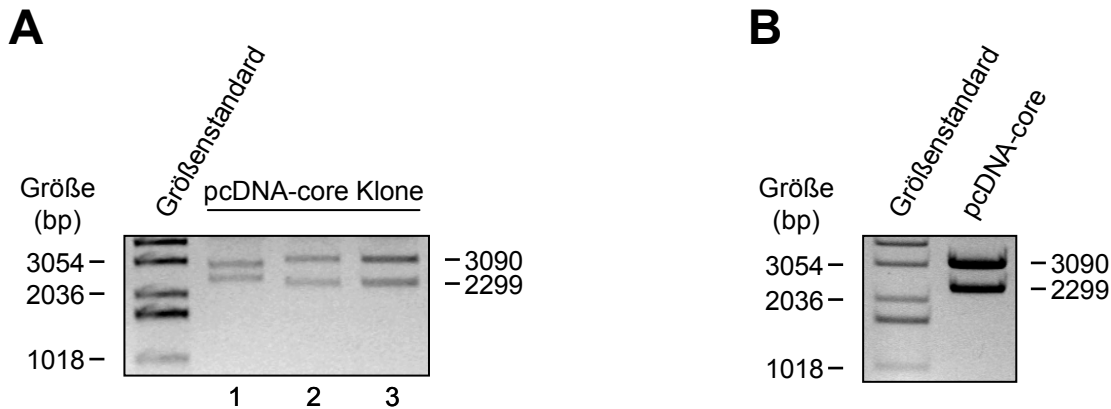
**Abbildung 32:** In die Primer für die Amplifikation der HCV-core-Gensequenz wurden eine *EcoR I*-Schnittstelle, eine Kozak-Sequenz und ein Start- bzw. Stoppsignal eingefügt.

Die Ligation der mit der Restriktionsendonuklease *EcoR I* geschnittenen HCV-core-Gensequenz in den ebenfalls mit *EcoR I* linearisierten, dephosphorylierten Vektor *pcDNA I/Amp*, führte zum Expressionsplasmid *pcDNA-core* (siehe Abbildung 33).



**Abbildung 33:** Im Expressionsplasmid *pcDNA-core* steht das HCV-core Gen unter transkriptioneller Kontrolle der Promotoren  $P_{CMV}$  und  $P_{T7}$ .

Ein Kontrollverdau extrahierter Plasmid-DNA aus Bakterienkolonien mit der Restriktionsendonuklease *Nae I* produzierte DNA-Fragmente mit Größen von 2936 bp und 2453 bp bzw. 3090 bp und 2299 bp (siehe Abbildung 34 A, S. 84).



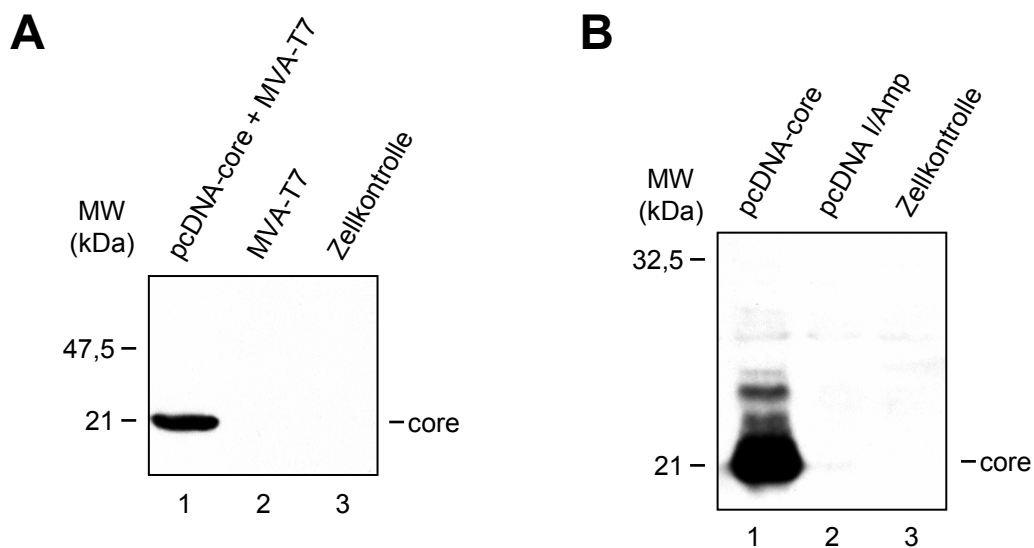
**Abbildung 34: Überprüfung des Expressionsplasmids pcDNA-core durch Restriktionsverdau.** (A) Eine Restriktionssplattung von pcDNA-core-Klonen mit *Nae I* ermöglichte die Unterscheidung der unterschiedlichen Orientierungen des HCV-core-Gens im Plasmid. (B) Der *Nae I*-Verdau einer pcDNA-core-Maxipräparation bestätigte die korrekte Integration des HCV-core-Gens ins Vektorplasmid. Die DNA-Fragmente wurden in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt; als Größenstandard diente eine 1 kb-DNA-Leiter.

Die DNA-Fragmente mit den Größen 3090 bp und 2299 bp bei den Klonen 2 und 3 (siehe Abbildung 34 A), stellen die Spaltprodukte bei korrekter Orientierung des HCV-core-Gens dar, Klon 1 zeigt die Insertion der Genkassette in falscher Orientierung. Eine Restriktionsanalyse einer präparativen Plasmidamplifikation mit *Nae I* bestätigte die korrekte Integration des HCV-core-Gens in das Vektorplasmid.

#### 4.3.5.1.2 Nachweis der Synthese des HCV-core-Proteins durch pcDNA-core

Die unter Transkriptionskontrolle des CMV- bzw. T7-Promotors produzierten Fremdproteine konnten durch Western-Blot-Analyse mittels HCV-Antigen-spezifischer Antikörper erfolgreich nachgewiesen werden (siehe Abbildung 35, S. 85). Die Analyse der HCV-core-Genexpression unter dem T7-Promotor erfolgte in mit MVA-T7 infizierten BHK-21-Zellen. Die Infektion mit MVA-T7 stellt die für den T7-Promotor erforderliche T7-RNA-Polymerase bereit. Das HCV-core-Protein konnte mit einem Anti-HCV-Antikörper (1:10000) nur in Lysaten aus mit pcDNA-core transfizierten und mit MVA-T7 coinfizierten BHK-21-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 35 A, S. 85). Lediglich mit MVA-T7 infizierte, oder uninfizierte BHK-21-Zellen zeigten kein Signal.

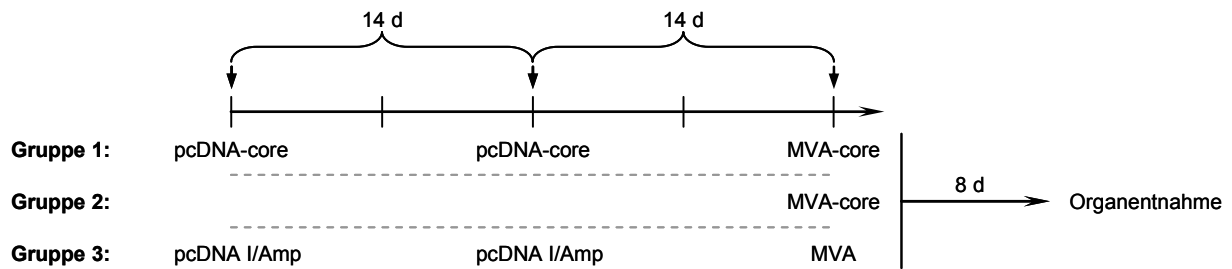
Die Transfektion des pcDNA-core Plasmids in Cos-7 Zellen ermöglichte die Expression von Genen, die unter der transkriptionellen Kontrolle des CMV-Promotors stehen. In einer Western-Blot-Analyse von Cos-7-Zelllysaten ließen sich nur in den mit pcDNA-core transfizierten Zellen HCV-spezifische Signale detektieren, die dem Molekulargewicht von 21 kDa des HCV-core Proteins entsprechen (siehe Abbildung 35 B, S. 85). Bei den mit pcDNA I/Amp transfizierten Zellen, sowie in der Cos-7-Zellkontrolle waren keine Signale erkennbar.



**Abbildung 35: Western-Blot-Analyse zum Nachweis des HCV-core Proteins in mit pcDNA-core transfizierten Zellen. (A)** Mit MVA-T7 infizierte BHK-21-Zellen mit pcDNA-core-Transfektion (Spur 1), mit MVA-T7 infizierte BHK-21-Zellen (Spur 2) und BHK-21-Zellkontrolle (Spur 3). **(B)** Mit pcDNA-core transfizierte Cos-7-Zellen (Spur 1), mit pcDNA I/Amp transfizierte Cos-7-Zellen (Spur 2) und Cos-7-Zellkontrolle (Spur 3). Die Auftrennung der Zelllysate erfolgte in einem 15 % Polyacrylamidgel. Das HCV-core Protein konnte mit einem Anti-HCV-Antikörper (1:10000) nachgewiesen werden.

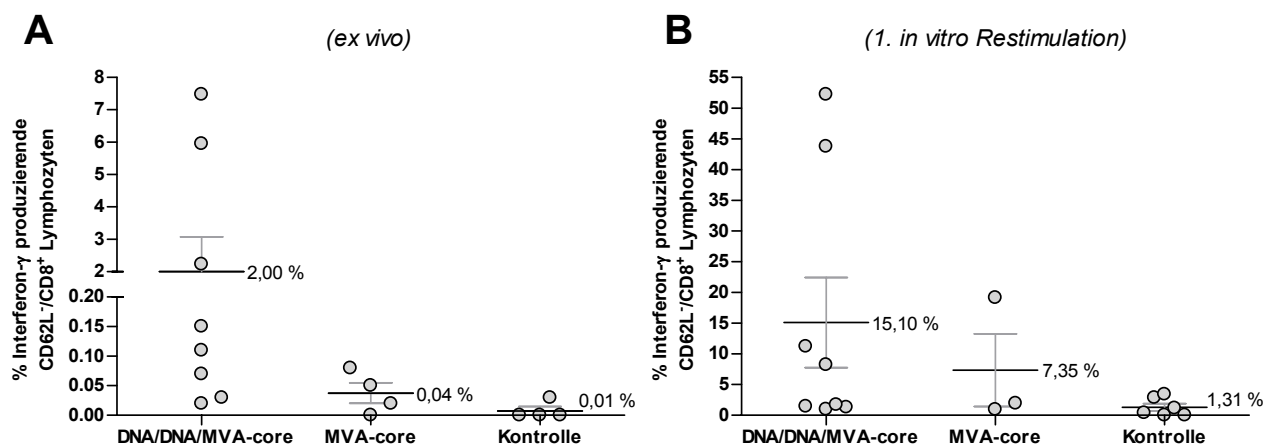
#### 4.3.5.1.3 Nachweis HCV-core-spezifischer T-Zellen durch heterologe DNA/MVA Immunisierung

Um eine Verbesserung der spezifischen Immunantwort nach einer Initialimpfung mit Plasmid-DNA zu überprüfen, wurden HHD-Mäuse mit endotoxinfreier Plasmid-DNA nach folgendem Immunisierungsschema geimpft:



**Abbildung 36: Immunisierungsschema für die Applikation von endotoxinfreier Plasmid-DNA.** Bei jeder DNA-Applikation wurden HHD-Mäusen je 50  $\mu\text{g}$  (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  PBS) endotoxinfreier Plasmid-DNA in den „tibialis anterior“-Muskel beider Unterschenkel injiziert.

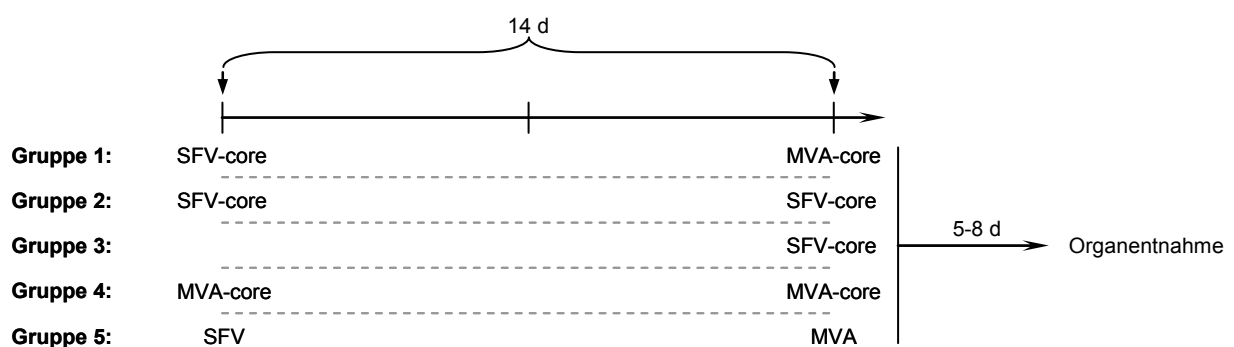
Mithilfe des HCV-core-spezifischen DLM-Peptids ließen sich in einer FACS-Analyse bei den mit pcDNA-core initialgeimpften Tieren nach einer MVA-core Folgeimpfung durchschnittlich 2,00 % (max. 7,47 %) aktivierte Interferon- $\gamma$ -produzierende  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen nachweisen, wohingegen eine Einzelimpfung mit MVA-core nur etwa 0,04 % (max. 0,08 %) der  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen spezifisch aktivieren konnte (siehe Abbildung 37 A). Bei den mit dem Kontrollplasmid pcDNA I/Amp geimpften Tieren war erwartungsgemäß keine HCV-core-spezifische Immunantwort detektierbar. Durch *in vitro* Restimulation konnten die DLM-spezifischen  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen auf 15,10 % (max. 52,22 %) (DNA/DNA/MVA-core), bzw. 7,35 % (max. 19,15 %) (MVA-core) expandiert werden (siehe Abbildung 37 B), allerdings konnten auch bei den kontrollimmunisierten Tieren im Mittel 1,31 % (max. 3,43 %) aktivierte Interferon- $\gamma$ -produzierende  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen amplifiziert werden.



**Abbildung 37: Quantifizierung HCV-core-spezifischer  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen nach heterologer DNA/MVA-Immunsierung.** Acht Tage nach der letzten Immunisierung wurden Milzzellen immunisierter Tiere mit dem DLM-Peptidstimuliert und die Anzahl aktivierter Interferon- $\gamma$ -produzierender  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen in einer FACS-Analyse ermittelt. (A) Ergebnisse von Einzeltieren aus zwei Experimenten und Gruppenmittelwert mit Standardfehler nach *ex vivo* Analyse. (B) Ergebnisse von Einzeltieren aus zwei Experimenten und Gruppenmittelwert mit Standardfehler nach *in vitro* Stimulation. Kontrollmäuse wurden entweder mit pcDNA I/Amp/MVA oder 2x MVA immunisiert.

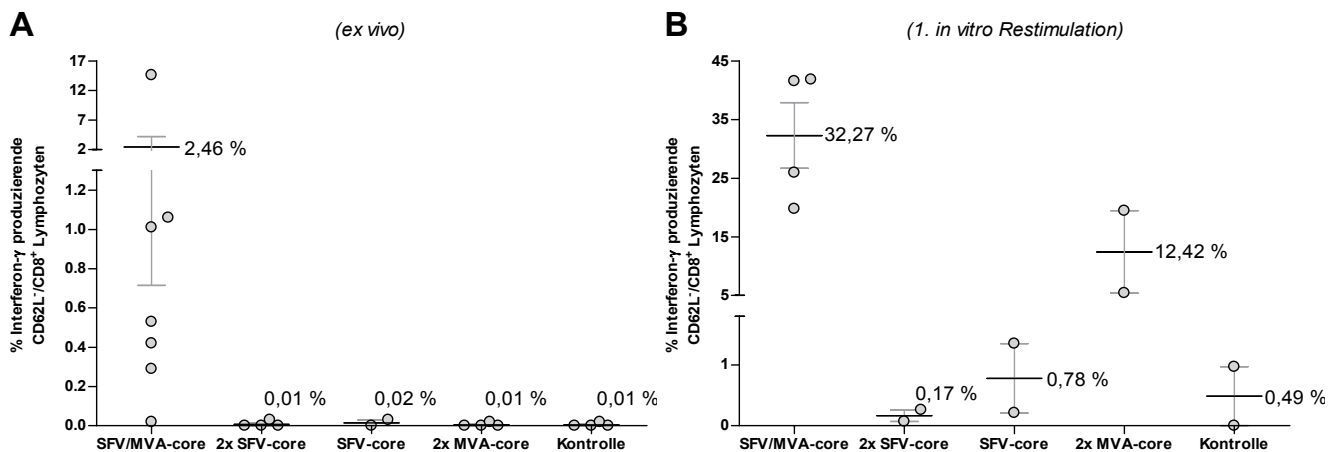
#### 4.3.5.2 Steigerung der HCV-spezifischen Immunantwort durch heterologe SFV/MVA-Immunisierung

Durch eine Impfung mit rekombinanten Semliki-Forest-Viren (SFV) ließ sich in Mäusen eine höhere Schutzwirkung gegen Virusinfektionen erzielen, als durch Plasmid-DNA (Fleaton, Liljestrom *et al.* 2000). Zudem konnte in Makaken eine verstärkte Immunogenität der heterologen SFV/MVA Immunisierung gezeigt werden (Nilsson, Makitalo *et al.* 2001). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob sich durch heterologe SFV/MVA Impfung auch die Immunogenität der MVA-HCV Vakzinen steigern lässt.



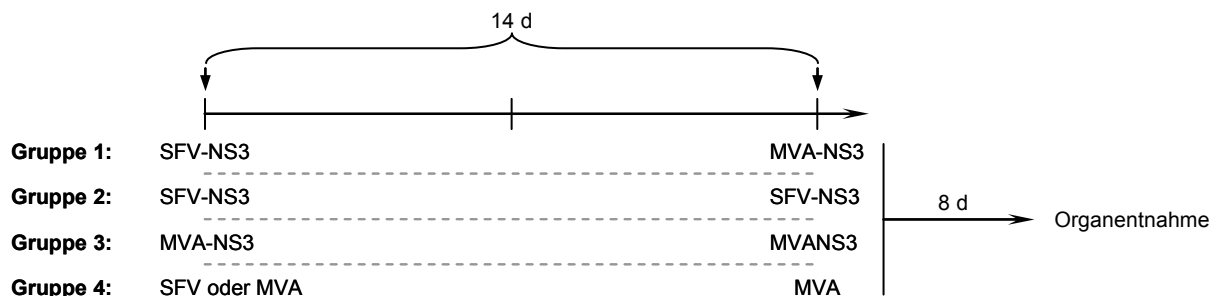
**Abbildung 38: Immunisierungsschema für die Applikation von SFV-core / MVA-core in HHD-Mäusen.** Die Semliki-Forest-Viren wurden subkutan injiziert, MVA intraperitoneal.

Um HCV-core-spezifische Immunantworten analysieren zu können, wurden HHD-Mäuse anhand des Immunisierungsschemas in *Abbildung 38* geimpft. Die Induktion HCV-core-spezifischer Immunantworten wurde *ex vivo* durch intrazelluläre Interferon- $\gamma$ -Färbung der frisch präparierten Milzzellen in einer FACS-Analyse untersucht. Bei den heterolog mit SFV-core und MVA-core geimpften Tieren konnten nach DLM-Peptidstimulation durchschnittlich 2,46 % (max. 14,61 %) aktivierter, Interferon- $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nachgewiesen werden (*siehe Abbildung 39 A, S. 88*). Da in den anderen Impfgruppen keine *ex vivo* messbare Immunantwort ausgelöst werden konnte, erfolgte eine *in vitro* Restimulation der Milzzellen mit dem HLA-A\*0201-restringierten Peptidepitop DLM. Dadurch konnten im Mittel 32,27 % (max. 41,82 %) (SFV-core/MVA-core) bzw. 12,42 % (max. 19,43 %) (2x MVA-core), sowie 0,17 % (max. 0,26 %) (2x SFV-core) und 0,78 % (max. 1,35 %) (1x SFV-core) der aktivierten Interferon- $\gamma$ -produzierenden CD8<sup>+</sup>-T-Zellen expandiert werden (*siehe Abbildung 39 B, S. 88*). Allerdings ließen sich auch bei der Kontrollgruppe 0,49 % (max. 0,97 %) der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch DLM amplifizieren.



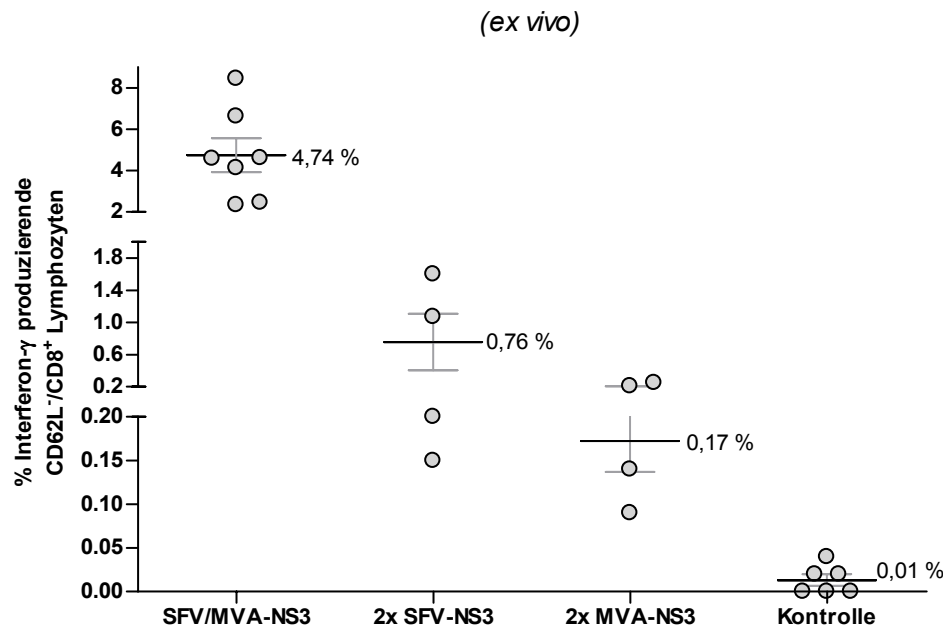
**Abbildung 39: Quantifizierung HCV-core-spezifischer CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nach heterologer SFV/MVA-Immunsierung.** 5-8 Tage nach der letzten Immunsierung wurden Milzzellen immunisierter Tiere mit dem DLM-Peptidstimuliert und die Anzahl aktivierter Interferon- $\gamma$  produzierender CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in einer FACS-Analyse ermittelt. **(A)** Ergebnisse von Einzeltieren aus zwei Experimenten und Gruppenmittelwert mit Standardfehler nach ex vivo Analyse. **(B)** Ergebnisse von Einzeltieren und Gruppenmittelwert mit Standardfehler nach in vitro Stimulation. Kontrollmäuse wurden mit SFV/MVA immunisiert.

Für die Analyse NS3-spezifischer T-Zellaktivierung wurden C57BL/6-Mäuse nach folgendem Immunsierungsschema geimpft:



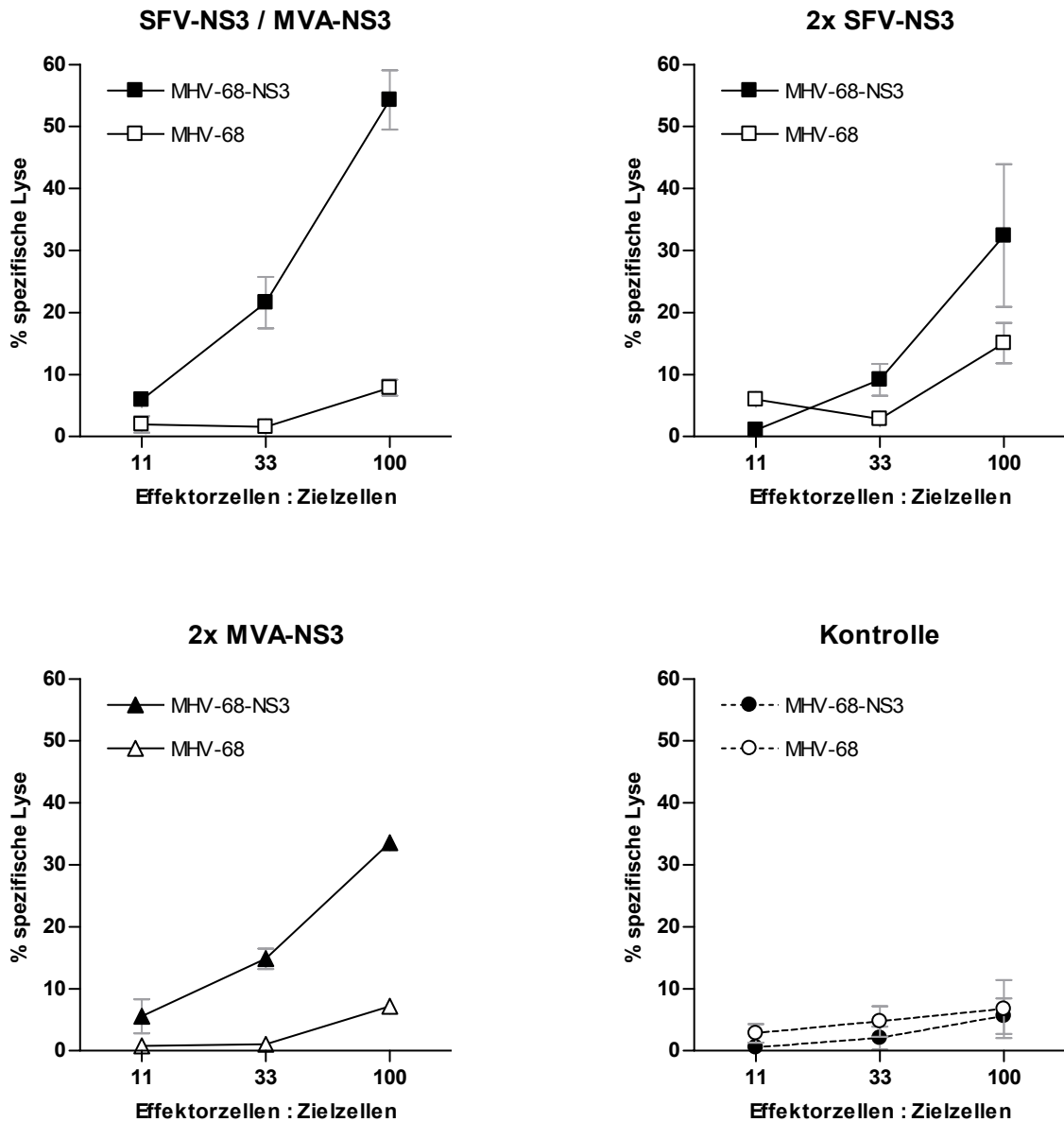
**Abbildung 40: Immunsierungsschema für die Applikation von SFV-NS3 / MVA-NS3 in C57BL/6-Mäusen.** Die Semliki-Forest-Viren wurden subkutan injiziert, MVA intraperitoneal. Die Kontrollgruppen erhielten heterologe (SFV/MVA) oder homologe (MVA/MVA) Auffrischungsimpfungen.

In der *ex vivo* FACS-Analyse der Milzzellpopulationen geimpfter Tiere konnten durchschnittlich 4,74 % (max. 8,45 %) (SFV-NS3/MVA-NS3), 0,76 % (max. 1,60 %) (2x SFV-NS3) und 0,17 % (max. 0,25 %) (2x MVA-NS3) NS3-spezifische Interferon- $\gamma$ -produzierende CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 41, S. 89). Mit den Wildtyp-Viren immunisierte Tiere besaßen keine T-Zellen, die sich durch Stimulation mit MHV-68-NS3 infizierten MC-3T3-E1-Zellen zur Interferon- $\gamma$ -Synthese anregen ließen.



**Abbildung 41: Quantifizierung HCV-NS3-spezifischer CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nach heterologer SFV/MVA-Immunisierung.** Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurden Milzzellen immunisierter Tiere mit MHV-68-NS3 infizierten MC-3T3-E1-Zellen stimuliert und die Anzahl aktivierter Interferon- $\gamma$  produzierender CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in einer FACS-Analyse ermittelt. Ergebnisse von Einzeltieren aus zwei Experimenten und Gruppenmittelwert mit Standardfehler nach ex vivo Analyse. Kontrollmäuse wurden entweder mit SFV/MVA oder 2x MVA immunisiert.

Um zu untersuchen, ob die induzierten CD8<sup>+</sup>-T-Zellen MHV-68-NS3-infizierte MC-3T3-E1-Zellen spezifisch lysieren können, wurden C57BL/6-Mäuse heterolog mit SFV-NS3/MVA-NS3 und homolog (2x SFV-NS3 bzw. 2x MVA-NS3) immunisiert. Als Kontrolle erhielten je 2 Tiere eine heterologe SFV/MVA- oder homologe MVA/MVA-Impfung. Nach einer NS3-spezifischen *in vitro* Stimulation waren in allen Impfgruppen ZTLs vorhanden, die bei einem Effektor:Zielzellen-Verhältnis (E:T) von 100:1 in der Lage waren, bis zu 54,3 % (SFV/MVA-NS3), bzw. 32,4 % (2x SFV-NS3) und 33,6 % (2x MVA-NS3) der MHV-68-NS3-infizierten MC-3T3-E1-Zellen spezifisch zu lysieren (siehe Abbildung 42, S. 90). In der Kontrollgruppe konnte keine Lyse der MC-3T3-E1-Zellen beobachtet werden.



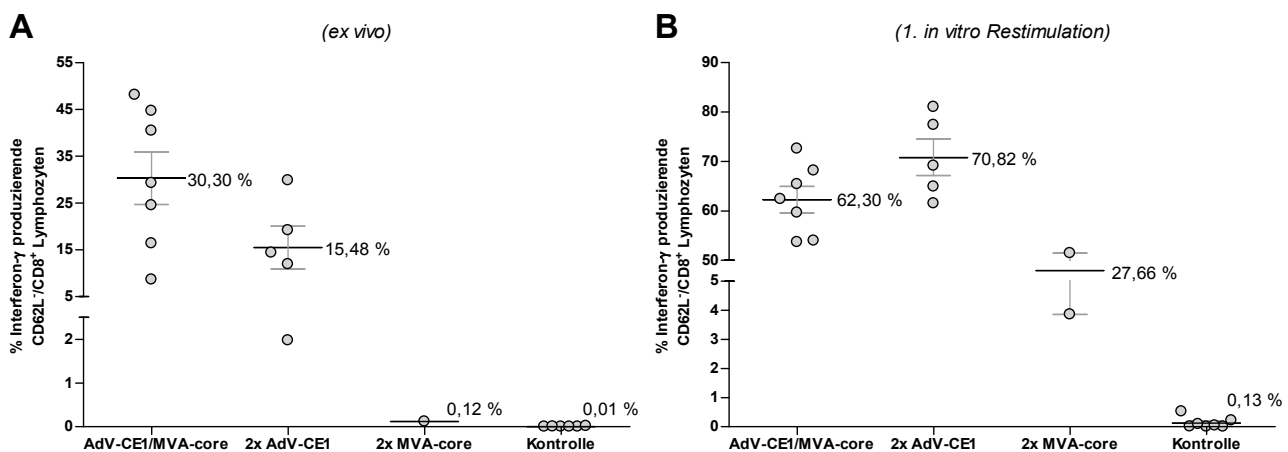
**Abbildung 42:** Die spezifische Lyse MHV-68-NS3-infizierter Zielzellen durch ZTLs immunisierter Mäuse wurde in einem Chrom-Freisetzungsversuch ermittelt. Mit MHV-68-NS3 (■,▲,●) oder MHV-68 (□,△,○) infizierte Zielzellen (MC-3T3-E1-Zellen) wurden in unterschiedlichem Effektor:Zielzellen-Verhältnis mit Milzzellen immunisierter C57BL/6-Mäuse inkubiert. Jede Kurve repräsentiert den Mittelwert mit Standardfehler aus bis zu 4 Einzelmäusen. Kontrollmäuse wurden entweder mit SFV/MVA oder 2x MVA immunisiert.



### 4.3.5.3 Steigerung der HCV-spezifischen Immunantwort durch heterologe AdV/MVA-Immunisierung

Rekombinante Adenoviren sind in der Lage, in Mäusen hohe zytotoxische T-Zellantworten zu induzieren (Bruna-Romero, Lasarte et al. 1997; Arribillaga, de Cerio et al. 2002; Lasarte, Sarobe et al. 2003; Matsui, Moriya et al. 2003). Da sich die Immunogenität von Plasmid-DNA oder SFV-Vektoren durch eine MVA-Folgeimpfung enorm verstärken ließ, war es von besonderem Interesse, ob sich diese Wirkung auch in Kombination mit rekombinanten Adenoviren erzielen lässt. Für die Immunisierung der Mäuse wurde das rekombinante Adenovirus AdV-CE1 (Bruna-Romero, Lasarte et al. 1997) verwendet, welches für die HCV-Gene des Nukleokapsids und Teile der Virushülle (E1) codiert. HHD-Mäuse wurden heterolog mit AdV-CE1/MVA-core, oder homolog mit 2x AdV-CE1 bzw. 2x MVA-core immunisiert. Der Abstand zwischen den Virusapplikationen betrug 14 Tage.

In der akuten Phase der Immunantwort wurde der Anteil der HCV-core-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in den Milzen immunisierter Tiere ermittelt. Hierfür wurden die Milzzellen mit dem HCV-core-spezifischen Peptid DLM stimuliert und in einer FACS-Analyse auf aktivierte, Interferon- $\gamma$ -produzierende CD8<sup>+</sup>-T-Zellen untersucht. Dabei konnten *ex vivo* durchschnittlich 30,30 % (max. 48,13 %) (AdV-CE1/MVA-core), bzw. 15,48 % (max. 29,87 %) (2x AdV-CE1) und 0,12 % (2x MVA-core) DLM-spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 43 A).



**Abbildung 43: Quantifizierung HCV-core-spezifischer CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nach heterologer AdV/MVA-Immunisierung.** Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurden Milzzellen immunisierter Tiere mit DLM-Peptid stimuliert und die Anzahl aktivierter Interferon- $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in einer FACS-Analyse ermittelt. Ergebnisse von Einzeltieren aus zwei Experimenten und Gruppenmittelwert mit Standardfehler nach *ex vivo* Analyse (A) und einer *in vitro* Restimulation (B). Kontrollmäuse wurden entweder mit AdV/MVA oder 2x MVA immunisiert

Milzzellen aus mit AdV/MVA- bzw. MVA/MVA-immunisierten Kontrolltieren konnten durch das DLM-Peptidepitop nicht zur Interferon- $\gamma$ -Produktion stimuliert werden. Der hohe Anteil der HCV-core-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen konnte in einer *in vitro* Stimulation mit dem DLM-Peptid noch weiter auf 62,30 % (max. 72,62 %) (AdV-CE1/MVA-core), bzw. 70,82 % (max. 81,03 %) (2x AdV-CE1) und 27,66 % (max. 51,46 %) (2x MVA-core) expandiert werden (*siehe Abbildung 43 B, S. 91*).

## 5 Diskussion

Mit der Applikation rekombinanter Vakziniaviren MVA konnten in der Vergangenheit bereits in einer Vielzahl von Tiermodellen, sowie in Patienten erfolgreich Immunantworten gegen verschiedene rekombinante Antigene induziert werden (*Sutter, Wyatt et al. 1994; Wyatt, Shors et al. 1996; Hanke, Samuel et al. 1999; Amara, Villinger et al. 2002; Hanke, McMichael et al. 2002; Wee, Patel et al. 2002; Cosma, Nagaraj et al. 2003*). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich rekombinante MVA-Vektoren ebenfalls für die Produktion von HCV-Antigenen eignen, und nach experimenteller Impfapplikation HCV-spezifische Immunantworten induzieren können.

Als Zielgene dienten die HCV-Strukturantigene Core, E1 und E2, bzw. das Nichtstrukturprotein NS3. Da noch keine Daten bekannt waren bezüglich der Effizienz der Produktion und Prozessierung von HCV-spezifischen Proteinen mittels rekombinanter MVA, waren auch Untersuchungen in *in vitro* Experimenten von besonderem Interesse. Die Wahl des identischen Vakziniaviruspromotors P<sub>7.5</sub> zur Transkriptionskontrolle aller HCV-Zielgene sicherte die Vergleichbarkeit der ermittelten Daten hinsichtlich des Niveaus der Genexpression. Alle Viren waren prinzipiell in der Lage, ihre rekombinanten Genprodukte nach der Infektion verschiedener Zelllinien zu synthetisieren. Offensichtliche Unterschiede konnten jedoch beim Vergleich von Infektionen mit MVA-1-830 (produziert ein Polyprotein Core-E1-E2-P7) bzw. MVA-core (produziert lediglich das HCV-core-Protein) festgestellt werden.

So waren nach Infektion von BHK-21-Zellen mit MVA-core grundsätzlich zwei Proteine mit einem Molekulargewicht von 21 kDa bzw. 23 kDa nachweisbar, während nach der Infektion mit MVA-1-830 nur ein 21 kDa schweres Protein detektierbar war (*siehe Abbildung 13, S. 62*). Diese Beobachtung deckt sich mit anderen Forschungsergebnissen (*Yasui, Wakita et al. 1998; Kato, Miyamoto et al. 2003; Majeau, Gagne et al. 2004*), bei denen für das HCV-core Protein zwei verschiedene Formen beschrieben werden: ein Vorläuferprotein p23 und eine reife/prozessierte Form p21 des Core-Proteins mit einem Molekulargewicht von 23 kDa bzw. 21 kDa. Eine Erklärung für die Anhäufung des unreifen Core-Proteins nach einer Infektion mit MVA-core könnte eine Überproduktion des Core-Proteins sein, da durch MVA-core, im Gegensatz zu MVA-1-830, die Hüllproteine E1 und E2 nicht synthetisiert werden müssen. Die katalytische Kapazität der ER-Signalpeptidase, die die Reifung des Core-Proteins vermittelt (*siehe 1.1.2.2.1.1, S. 15*), könnte somit durch die große Menge an

HCV-Core ausgeschöpft sein. Da das HCV-Kapsidprotein Core durch die carboxyterminale E1-Signalsequenz in der Membran des endoplasmatischen Retikulums verankert wird, wäre alternativ auch eine wichtige Rolle des E1-Hüllproteins bei der Abspaltung dieser Signalsequenz denkbar, z.B. durch einen möglichen Einfluss auf die Tertiärstruktur des Core-Polypeptids und einer dadurch besseren Zugänglichkeit für die Signalpeptidase.

Um die Immunogenität der MVA-Vakzinen zu untersuchen, wurden HLA-A\*0201 transgene HHD-Mäuse immunisiert und auf die Ausbildung HCV-Antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup>-T-Zellantworten analysiert. Die Fokussierung auf die CD8<sup>+</sup>-T-Zellantwort beruht auf Daten aus diversen Studien mit HCV-infizierten Patienten und Schimpansen, bei denen eine Korrelation zwischen spontaner Ausheilung der Hepatitis C und der Ausbildung einer HCV-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellantwort festgestellt werden konnte (*Cooper, Erickson et al. 1999; Lechner, Wong et al. 2000; Wertheimer, Miner et al. 2003*).

*Shirai et al. (Shirai, Okada et al. 1994)* haben gezeigt, dass sich durch die Applikation rekombinanter Vakziniaviren, die das HCV-Core-Protein synthetisieren, die Ausbildung zytotoxischer T-Lymphozyten induzieren lässt, die spezifisch gegen das konservierte HLA-A\*0201-restringierte HCV-Core-Peptid epitop DLMGYIPLV (*DLM*) gerichtet sind. Übereinstimmend mit diesen Daten konnten in dieser Arbeit nach der Verimpfung der rekombinanten MVA-Vakzinen MVA-core und MVA-1-830 in den Milzen der immunisierten Tiere CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten nachgewiesen werden, die spezifisch gegen das DLM-Peptid epitop gerichtet waren. Diese CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten besaßen zytotoxische Kapazität und waren somit in der Lage, DLM-Peptid präsentierende Zielzellen spezifisch zu lysieren.

Da das Hepatitis C Virus ein Humanpathogen ist und natürlicherweise nur Menschen infiziert, ist eine Analyse HCV-spezifischer Immunantworten im humanen Kontext wünschenswert. Bei Untersuchungen der T-Zellantworten bei Patienten konnten einige HLA-A\*0201-restringierte HCV-NS3-Peptid epitope identifiziert werden (*He, Rehmann et al. 1999; Urbani, Uggeri et al. 2001; Vertuani, Bazzaro et al. 2002*), mit denen sich allerdings in unserem Mausmodell nach MVA-Immunsierung keine spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten nachweisen ließen. Diese Fehlversuche lassen sich am besten dadurch erklären, dass sich die beschriebenen Peptid epitopsequenzen in mindestens einer Aminosäure von den entsprechenden Oligopeptiden des in dieser Arbeit verwendeten HCV-NS3-Polypeptids (*siehe 6.3, S. 107*) unterscheiden. Obwohl Daten existieren, die belegen, dass T-Lymphozyten von HLA-A\*0201 transgenen Mäusen dieselben (HCV)-Epitope erkennen können wie humane

HLA-A\*0201-restringierte ZTLs (Shirai, Arichi et al. 1995; Loirat, Lemonnier et al. 2000), lässt sich aber auch nicht ausschließen, dass die proteasomale Prozessierung der Antigene in (transgenen) murinen bzw. humanen Zellen unterschiedlich sein könnte. Somit besteht die theoretische Möglichkeit, dass nicht alle HLA-A\*0201-restringierten Peptidpitope in den transgenen Mäusen prozessiert und damit auf ihren MHC-Molekülen präsentiert werden können. Die Analyse der gegen HCV-NS3 gerichteten T-Zellantwort wurde in dieser Arbeit durch Stimulation der CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten mit dem gesamten NS3-Antigen verfolgt, welches aus der Infektion von Zielzellen mit einem rekombinanten MHV-68-NS3 stammt.

Die Frage, in welchen Immunisierungsschemas MVA-Impfstoffe am besten angewendet werden sollen, ist Gegenstand intensiver Untersuchungen. In den hier beschriebenen Experimenten wurde die wiederholte Applikation von MVA-Vakzinen evaluiert. In Übereinstimmung mit vielen früheren Ergebnissen in anderen Impfmodellen (Sutter, Wyatt et al. 1994; Moss, Carroll et al. 1996; Wyatt, Shors et al. 1996; Stittelaar, Wyatt et al. 2000), aber entgegen anderer Berichte (Hanke, Blanchard et al. 1998), ließ sich die Immunogenität des NS3-Inserts durch die Verimpfung von zwei sequenziell applizierten MVA-NS3-Dosen weiter steigern. Dieser erwartete Effekt lässt sich dadurch erklären, dass die durch die Initialimpfung induzierte Immunantwort durch den erneuten Kontakt mit dem NS3-Antigen nach der Folgeimpfung weiter verstärkt wird. Der *ex vivo* vorgefundene hohe Anteil NS3-spezifischer CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten an der Gesamtlymphozytenpopulation ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Immunantwort hier nicht auf ein einzelnes Peptidpitop beschränkt, sondern gegen eine Vielzahl von NS3-spezifischen Epitopen gerichtet ist.

Da sich die MVA-NS3-Vakzine in normalen Mäusen (C57BL/6) als immunogen erwiesen hatte, wurde der Versuch unternommen, in Impfxperimenten an transgenen HHD-Mäusen die Identifizierung eines immundominanten HLA-A\*0201-restringierten NS3-Peptidpitopes voranzutreiben. Die Kenntnis solcher definierter T-Zell-Epitope ermöglicht eine detaillierte Verfolgung der Entwicklung von T-Zellantworten nach Impffapplikation und ist hilfreich bei der Beurteilung der Effizienz eines Impfstoffes (Firat, Cochet et al. 2002; Himoudi, Abraham et al. 2002; Palmowski, Choi et al. 2002; Drexler, Staib et al. 2003), oder einer medikamentösen Behandlung (Vertuani, Bazzaro et al. 2002). Zudem können einfache Peptidimpfstoffe gezielt Immunantworten gegen einzelne Epitope auslösen, deren Wirksamkeit dann unabhängig vom Gesamtantigen spezifisch getestet werden kann (Thomson, Elliott et al. 1996; Loirat, Lemonnier et al. 2000).

In der Tat erlaubten die hier beschriebenen Arbeiten die Ermittlung eines bisher unbekanntes und möglicherweise immundominantes NS3-Oligopeptids. Anhand einer Überprüfung durch die SYFPEITHI-Datenbank (<http://syfpeithi.bmi-heidelberg.com>, V1.0, Stand: 10. März 2004; (Rammensee, Bachmann et al. 1999)) enthält dieses Oligopeptid eine für HLA-A\*0201 passende dekamere Aminosäuresequenz, allerdings steht eine Bestätigung dieses Epitops *in vivo* noch aus. Es ist anzumerken, dass zwar bereits in einigen Studien Zellen des peripheren Blutes\* (PBMC) aus HCV-infizierten Patienten mit HCV-Oligopeptidgemischen untersucht wurden, bislang konnte jedoch keine Reaktion auf das in dieser Arbeit beschriebene Oligopeptid gezeigt werden (Urbani, Uggeri et al. 2001; Wertheimer, Miner et al. 2003). Denkbar ist, dass in den untersuchten Personen auf Grund der hohen Variabilität des HCV-Genoms (siehe 1.1.1.3, S. 9) das hier beschriebene Epitop abgeändert ist, und somit keine dafür spezifischen T-Lymphozyten stimuliert werden konnten. Ferner besteht, wie zuvor erwähnt, die Möglichkeit, dass sich die Prozessierung von Antigenen im HLA-A\*0201-transgenen Mausmodell von der in menschlichen Zellen unterscheidet und dieses Peptidepitop im Menschen nicht auftritt.

In weiteren Impfxperimenten sollte untersucht werden, ob sich die Immunogenität der MVA-Vakzinen durch eine kombinierte Applikation mit Plasmid-DNA, Semliki-Forest-Viren, oder Adenoviren, die für dieselben Antigene codieren, steigern lässt. Wie bereits in verschiedenen Studien nachgewiesen wurde, kann durch heterologe DNA/MVA-Immunisierungen sowohl im Tiermodell, als auch beim Menschen, eine starke zelluläre Immunantwort gegen die verimpften Antigene induziert werden (Schneider, Gilbert et al. 1998; Amara, Villingner et al. 2002; Hanke, McMichael et al. 2002; Wee, Patel et al. 2002; McConkey, Reece et al. 2003). Im Einklang mit diesen Ergebnissen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich durch zwei Initialimpfungen mit Plasmid-DNA (pcDNA-core) und einer Folgeimpfung mit MVA-core, verglichen mit einer homologen MVA/MVA-Impfung, der Anteil an DLM-Epitop-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in den immunisierten Mäusen um ein vielfaches steigern lässt. Das dem zugrunde liegende Prinzip ist noch unklar, Schneider et al. (Schneider, Gilbert et al. 1998) spekulieren jedoch, dass die Immunantwort gegen durch MVA-Vektoren verabreichte, rekombinante Antigene wegen der großen Anzahl an konkurrierenden MVA-Vektorantigenen vermindert sein könnte. Die vorhergehende Applikation von Plasmid-DNA, die nur für das Antigen codiert, könnte allerdings für die Induzierung einer ausreichenden Anzahl an Antigen-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten

---

\* hauptsächlich Lymphozyten und Monozyten

genügen, um nach einer MVA-Folgeapplikation die Fokussierung der Immunantwort auf das rekombinante Antigen zu ermöglichen.

In einer vergleichenden Studie mit Plasmid-DNA und rekombinanten Semliki-Forest-Viren (SFV) berichten *Fleeton et al.*, dass ausschließlich die SFV-Vakzinen in der Lage waren, Mäuse vor einer letalen Dosis „Louping Ill“-Viren (LIV) zu schützen (*Fleeton, Liljestrom et al. 2000*). Für die Kombination aus einer SFV-Initialimpfung und einer MVA-Folgeimpfung wurde eine erhöhte Immunogenität beschrieben, verglichen mit der homologen Applikation der Vektorvakzinen (*Nilsson, Makitalo et al. 2001*). Dies konnte durch die Experimentaldaten dieser Arbeit bestätigt werden.

Ein kritischer Faktor beim Einsatz von Plasmid-DNA als Impfstoff ist deren Aufnahme in die Zelle. Da DNA und zelluläre Membranen im wässrigen Milieu gleichermaßen negativ geladen sind, wird eine Internalisierung von DNA ins Zellinnere durch diese elektrostatische Barriere behindert (*Bennett und O'Brien 1995*). Eine weitere Erschwernis stellen interstitielle Nukleasen dar, die die injizierte DNA häufig degradieren, bevor sie den Nukleus der Zielzelle zur Transkription erreicht (*Gregoriadis 1998; Lewis und Babiuk 1999*). Erst kürzlich gelang es *Jiao et al.*, die Plasmid-Aufnahme durch den Einsatz von mit kationischen Liposomen umhüllter DNA zu verbessern und sie dadurch auch vor der Degradation durch Nukleasen zu schützen (*Jiao, Wang et al. 2003*). Eine weitere Schwierigkeit bei der Applikation von Plasmid-DNA ist, dass sich die gleichmäßige Verteilung der DNA-Suspension im injizierten Muskelgewebe nur schwer gewährleisten lässt (*Davis, Whalen et al. 1993*).

Die subkutane Applikation der Semliki-Forest-Viren konnte besser kontrolliert werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen DNA- oder SFV-Initialimpfung, gefolgt von einer MVA-Applikation konnte jedoch in neueren Studien nicht belegt werden (*Hanke, Barnfield et al. 2003*). Allerdings konnte auch hier die Immunogenität dieser Impfvektoren durch eine MVA-Folgeimpfung weiter verbessert werden.

Adenovirale Vektoren erlauben nach Impfantikation die Synthese rekombinanter Proteine und ermöglichen die Induktion hoher ZTL-Immunantworten (*Bruna-Romero, Lasarte et al. 1997; Arribillaga, de Cerio et al. 2002; Shiver, Fu et al. 2002; Lasarte, Sarobe et al. 2003; Matsui, Moriya et al. 2003*). Durch die heterologe Immunisierung von HHD-Mäusen mit einem rekombinanten Adenovirus (AdV-CE1), der für die HCV-Gene des Nukleokapsids (Core) und Teile der Virushülle (E1) codiert, sowie einer MVA-core Folgeimpfung konnte in einer *ex vivo* Analyse der Immunantwort ein substantieller Anstieg an DLM-spezifischen

CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in den Milzen der immunisierten Tiere verzeichnet werden. Zwar reagierte nach homologen AdV-CE1/AdV-CE1 Initial-/Folgeimpfungen ebenfalls ein hoher Anteil der CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten spezifisch auf das DLM-Peptid, allerdings bestätigte auch dieses Experiment eine überlegene Verstärkungswirkung durch MVA-Auffrischungsimpfungen.

Eine bisher noch nicht erschöpfend untersuchte Frage beim Einsatz rekombinanter Vakziniaviren als Impfstoff im Menschen, ist eine eventuell bestehende Immunität gegen Pockenviren durch vorherige Impfungen, die die Immunogenität des rekombinanten Antigens beeinflussen könnte. Im schlechtesten Fall könnte es sein, dass Virus-neutralisierende Antikörper eine Infektion mit dem Vektorimpfvirus verhindern könnten. Ein solches Szenario ist z.B. für rekombinante Adenoviren bereits beschrieben worden (*Varnavski, Zhang et al. 2002*). Ebenso wurde nach der Verimpfung replikationsfähiger Vakziniaviren mittels Skarifikation das Ausbleiben bzw. eine abgeschwächte Ausprägung von Symptomen einer erfolgreichen Vakzinierung, wie lokale Virusreplikation oder Impfpusteln, beobachtet (*Frey, Newman et al. 2003; Tenorio, Peebles et al. 2004*). Bei der Bolus-artigen Verabreichung von MVA-Impfstoffen könnte aber die Neutralisierung durch Antikörper weniger starke Auswirkungen haben. In der Tat konnten *Wang et al.* kürzlich zeigen, dass sich nach einer Immunisierung von Mäusen mit MVA deutlich weniger neutralisierende Antikörper im Serum nachweisen lassen, als nach einer Immunisierung mit Vakziniaviren (*Wang, La Rosa et al. 2004*). Die Arbeitsgruppe von *Ramirez et al.* war in der Lage, in Mäusen mit bestehender MVA-Immunität eine höhere Expression von durch MVA verabreichten, rekombinanten Antigenen zu erzielen, als in Mäusen mit bestehender Immunität gegen Vakziniaviren des Stammes *Western Reserve* (*Ramirez, Gherardi et al. 2000*). Sie begründen diesen Effekt damit, dass MVA in Säugerzellen replikationsdefizient ist und sich somit im Wirt nicht vermehren kann. Dies führt im Gegensatz zu den replikationskompetenten Vakzinia- und *Western Reserve*-Viren zu einer verringerten Immunogenität der MVA-Vektoren. Die Immunogenität der durch MVA-Vektoren verabreichten, rekombinanten Antigene scheint allerdings nicht vermindert zu sein. Hierfür spricht auch, dass sowohl im Menschen (*Cosma, Nagaraj et al. 2003*), als auch im Tiermodell, trotz bestehender Immunität gegen Vakziniaviren eine zum Teil protektive Immunantwort gegen durch rekombinante Vakziniaviren eingeführte Antigene ausgelöst werden konnte (*Hu, Stallard et al. 1993; Belyakov, Moss et al. 1999; Ramirez, Gherardi et al. 2000; Yang, Wyatt et al. 2003*).



Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass rekombinante MVA-Viren HCV-Antigene sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* in Mausmodellen effektiv synthetisieren können. Die MVA-Vektoren sind in der Lage, in Mäusen die Ausbildung Antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup>-T-Zellantworten zu induzieren. Durch den Einsatz der rekombinanten MVA-Viren als Folgevakzinen in heterologen Impfprotokollen lassen sich höhere HCV-spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zellantworten auslösen, als durch Auffrischungsimpfungen mit gleichartigen Impfstoffen, basierend auf Plasmid-DNA, Semliki-Forest-Viren oder Adenoviren. Dabei scheint die Reihenfolge der Impfantikörper eine Rolle zu spielen, da sich MVA vor allem zur Verstärkung einer bereits initiierten CD8<sup>+</sup>-T-Zellantwort eignet (*Li, Rodrigues et al. 1993; Sedegah, Weiss et al. 2000; Gherardi, Najera et al. 2003*). Über mögliche Gründe hierfür liegen jedoch noch keine Erkenntnisse vor.

Der Nachweis der Immunogenität der in dieser Arbeit untersuchten HCV-rekombinanten MVA-Viren, sowie die Optimierung der Impfprotokolle durch Folgeimmunisierungen liefern die Grundlage für weitergehende Experimente. Da sich durch das Hepatitis C Virus nur Schimpansen und Menschen infizieren lassen, erlaubt die gezeigte Immunogenität der MVA-Vakzinen im Mausmodell keine Rückschlüsse auf die Schutzwirkung der Impfstoffe. Eine Möglichkeit dieser Frage nachzugehen wäre, Schimpansen anhand der in dieser Arbeit beschriebenen, optimierten Immunisierungsstrategien mit den MVA-Viren zu impfen, und anschließend mit dem Hepatitis C Virus zu infizieren. Eine Bewertung hinsichtlich des protektiven Potenzials der Impfung kann anschließend dadurch erfolgen, dass die virale HCV-RNA im Serum der infizierten Tiere quantifiziert, und die Viruslast über einen längeren Zeitraum verfolgt wird. Alternativ könnte versucht werden, die MVA-Vakzinen in klinischen Phase I und II Studien zur Immuntherapie von HCV-infizierten Patienten zu erproben. Dabei würde ein therapeutischer Effekt, der z.B. durch eine Erhöhung der HCV-spezifischen T-Zellantwort und einen messbaren Rückgang der Viruslast festgestellt werden kann, Rückschlüsse auf die Wirksamkeit von entsprechenden MVA-Vakzinen erlauben. Dieser Einsatz experimenteller MVA-Vakzinen sollte am ehesten bei chronisch HCV-infizierten Patienten möglich sein, die auf die aktuellen antiviralen Therapien mit Ribavirin und Interferon- $\alpha$  nicht ansprechen. Schließlich könnten klinische Phase I/II Studien auch mit freiwilligen, gesunden Individuen auf Verträglichkeit und Immunogenität der Impfvektoren durchgeführt werden (*Abrignani, Houghton et al. 1999*). Von besonderem Vorteil ist hierbei das hohe Sicherheitsprofil der MVA-Viren, sowie dass diese als typische Orthopockenviren ausschließlich im Zytoplasma infizierter Zellen replizieren und somit das Risiko einer stabilen

Integration der rekombinanten Virus-DNA in das Genom von Wirtszellen außerordentlich gering erscheint.

Als letzter Schritt einer klinischen Prüfung (Phase III) wäre die Vakzinierung einer großen Anzahl gesunder Personen aus Hochrisikogruppen (*siehe 1.1.1.4, S. 10*) für HCV-Infektionen vorstellbar. Solche Impfversuche werden für die Evaluierung von Impfstoffkandidaten gegen die HIV-Infektion bereits praktiziert (*Buchbinder, Metch et al. 2004; McClure, Gray et al. 2004*). Eine Aussage zur Schutzwirkung der Vakzinen kann dabei über das Verhältnis von Neuinfektionen in der geimpften Personengruppe zu denen in einer ähnlich großen Kontrollgruppe erhalten werden.

Mit den hier beschriebenen Experimenten wurden die ersten Schritte zur Entwicklung eines MVA-HCV-Impfstoffes getan. Zwar konnte die Immunogenität von HCV-rekombinanten MVA-Viren gezeigt werden, jedoch bedarf es noch weiterer Untersuchungen bis die MVA-HCV-Vakzinen in klinischen Tests zum Einsatz kommen können, oder gar klinische Anwendung finden. Die hier charakterisierten rekombinanten Viren können jedoch als wertvolle Werkzeuge dienen, um die notwendigen Grundlagen zur Wahl von geeigneten HCV-Impfantigenen, sowie zur Immunisierung mit MVA-Impfstoffen noch besser zu erforschen.

## 6 Anhang

### 6.1 Verwendete Abkürzungen

A	Adenin bzw. Ampère
Amp <sup>+/-</sup>	ampicillinhaltig / nicht ampicillinhaltig
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
b / bp	Base(n) / Basenpaar(e)
BHK-21	„baby hamster kidney“-Zellen
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
CIP	„calf intestinal phosphatase“
cm	Zentimeter
CMV	Zytomegalovirus
cpm	Impulse pro Minute (counts per minute)
<sup>51</sup> Cr	Chrom-Isotop 51
CTP	Cytidintriphosphat
d	Durchmesser
Da	Dalton
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes (vollentsalztes) Wasser
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes (vollentsalztes) Wasser
DMEM	Dulbecco's modified Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat

---

ds	„double stranded“ - doppelsträngig
DTE	Dithioerythrit
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMA	Ethidium Monoazid Bromid
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F	Farad
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsorter (Fluorescence Activated Cell Sorter)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FBS	Fötale Rinderserum
fmol	Femtomol
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
G	Guanin
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagenkolonie stimulierender Faktor
GTP	Guanosintriphosphat
Gy	Gray (SI-Einheit für die Strahlendosis)
h	Stunde
HCV	Hepatitis C Virus
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2'-ethansulfonsäure
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
k	kilo

---

l	Liter
LB	Luria Bertani
LDL	Lipoprotein geringer Dichte („low density lipoprotein“)
LPS	Lipopolysaccharid
m	milli
M	molar
μ	mikro
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex)
MOI	„multiplicity of infection“ = infektiöse Einheiten
min	Minute
mm	Millimeter
mRNA	Boten-RNA
MVA	modifiziertes Vakziniavirus Ankara
MW	Molekulargewicht („molecular weight“)
n	nano
nt	Nukleotid
Ω	Ohm
OD	optische Dichte
<sup>32</sup> P	Phosphor-Isotop 32
p	pico
p.i.	post infectionem
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	R-Phycoerythrin
PerCP	Peridininchlorophyll Protein
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PO	Peroxidase

---

r	rekombinant
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
s / sek	Sekunde
ss	„single stranded“ - einzelsträngig
SSC	Seitwärtsstreulicht (sideward scatter)
T	Thymin
TAE	Tris Acetat EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TTP	Thymidintriphosphat
U	Uracil bzw. Unit (Enzymeinheit)
u	atomare Masseneinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
W	Watt
w	Gewicht
wt	Wildtyp
ZTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt

## 6.2 HCV-NS3 Peptid-Bibliothek

	Start-AS	HCV-NS3 Peptid	Bemerkung des Herstellers (Clonestar)	
<b>A</b>	1	1028	PITAYSQQTRGLLGC	Cys term make c-term amide o.k.
	2	1036	TRGLLGCIITSLTGR	
	3	1044	ITSLTGRDKNQVDG	suggest remove E is o.k.
	4	1052	KNQVDGEVQVLSTAT	some dehydration will occur o.k.
<b>B</b>	1	1060	QVLSTATQSFLATCV	o.k.
	2	1068	SFLATCVNGVCWTVY	o.k.
	3	1076	GVCWTVYHGAGSKTL	o.k.
	4	1084	GAGSKTLAGPKGPIT	o.k.
<b>C</b>	1	1092	GPKGPITQMYTNVDQ	o.k.
	2	1100	MYTNVDQDLVGWPA	c-term pro removed
	3	1108	LVGWPAAPPGARSMT	c-term pro removed
	4	1116	GARSMTPTCTCGSSDL	o.k.
<b>D</b>	1	1124	TCGSSDLYLVRHAD	o.k.
	2	1132	LVTRHADVIPVRRRG	o.k.
	3	1140	IPVRRRGDSRGSLLS	o.k.
	4	1148	SRGSLLSPRPVSYLK	o.k.
<b>E</b>	1	1156	RPVSYLKGSSGGPLL	o.k.
	2	1164	SSGGPLLCPSGHVVG	o.k.
	3	1172	PSGHVVGIFRAAVCT	o.k.
	4	1180	FRAAVCTRGVAKAVD	o.k.
<b>F</b>	1	1188	GVAKAVDFIPVESME	o.k.
	2	1196	IPVESMETTMRSPVF	o.k.
	3	1204	TMRSPVFTDNSSPPA	o.k.
	4	1212	DNSSPPAVPQTFQVA	o.k.
<b>G</b>	1	1220	PQTFQVAHLHAPTGS	o.k.
	2	1228	LHAPTGSKGSTKVPA	o.k.
	3	1236	KSTKVPAAYAAQGYK	o.k.
	4	1244	YAAQGYKVRVLNPSV	Almost always L in position 1252 in other 1b isolates
<b>H</b>	1	Extra	YKVLVLNPSVAATLG	Extra Peptide for VLVLNPSVA immunodominant CD4 epitope
	2	1252	RVLNPSVAATLGFGA	
	3	1260	ATLFGAYMSKAHGI	o.k.
	4	1268	MSKAHGIENIRTGV	o.k.

	<i>Start-AS</i>	<i>HCV-NS3 Peptid</i>	<i>Bemerkung des Herstellers (Clonestar)</i>	
<b>I</b>	1	1276	PNIRTGVRTITTGG	c-term pro removed
	2	1284	TITGGPITYSTYK	o.k.
	3	1292	TYSTYGKFLADGGCS	will dehydrate across DG
	4	1300	LADGGCSGGAYDIII	o.k. Some dehydration will occur
<b>J</b>	1	1308	GAYDIIICDECHSTD	o.k.
	2	1316	DECHSTDWTTILGIG	o.k.
	3	1324	TTILGIGTVLDQAET	o.k.
	4	1332	VLDQAETAGARLVVL	o.k.
<b>K</b>	1	1340	GARLVVLATATPPGS	o.k.
	2	1348	TATPPGSITVPHNI	o.k.
	3	1356	TVPHNIEEVALSNTE	E addition suggested
	4	1364	EVALSNTEIPFYGK	o.k.
<b>L</b>	1	1372	EIPFYGKAIPIEAIK	o.k.
	2	1380	IPIEAIKGGRHIFC	o.k.
	3	1388	GRHLIFCHSKKKCDE	o.k.
	4	1395	ESKKKCEDELAAKLTGL	E addition suggested
<b>M</b>	1	1404	AAKLTGLGLNAVAYY	o.k.
	2	1412	LNAVAYYRGLDVSVI	o.k.
	3	1420	GLDVSVIPTSGDVVV	o.k.
	4	1428	TSGDVVVVATDALMT	o.k.
<b>N</b>	1	1436	ATDALMTGFTGDFDS	o.k.
	2	1444	FTGDFDSVIDCNTCV	o.k.
	3	1451	VIDCNTCVTQTVDFSL	V addition suggested
	4	1460	QTVDFSLDPTFTIET	o.k.
<b>O</b>	1	1468	PTFTIETTTVPQDAV	o.k.
	2	1476	TVPQDAVSRSQRRGR	o.k.
	3	1484	RSQRRGRTGRGRSGI	o.k.
	4	1492	GRGRSGIYRFVTPGER	R addition suggested
<b>P</b>	1	1500	RFVTPGERPSGMFDS	o.k.
	2	1508	PSGMFDSSVLCECYD	o.k.
	3	1516	VLCECYDAGCAWYEL	o.k.
	4	1524	GCAWYELTPAETTVR	o.k.
<b>Q</b>	1	1532	PAETTVRLRAYLNT	c-term pro removed
	2	1540	RAYLNTPLPVCQDH	o.k.
	3	1547	GLPVCQDHLEFWESVF	G addition suggested
	4	1556	EFWESVFTGLTHIDA	o.k.



	Start-AS	HCV-NS3 Peptid	Bemerkung des Herstellers (Clonestar)
<b>R</b>	1	1564 GLTHIDAHFLSQTQK	o.k.
	2	1572 FLSQTKQAGDNFPYL	o.k.
	3	1580 GDNFPYLVAYQATVC	o.k.
	4	1588 AYQATVCARAQAPPX	c-term pro: made as c-term-amide
<b>S</b>	1	1596 RAQAPPPSWDQMWK	o.k.
	2	1604 WDQMWKCLIRLKP	o.k.
	3	1612 IRLKPTLHGPTPLLY	o.k.
	4	1620 GPTPLLYRLGAVQNE	o.k.
<b>T</b>	1	1628 LGAVQNEITLTHPIT	o.k.
	2	1636 TLTHPITKFVMACMS	
	3	1644 KFVMACMSADLEVVT	

**Tabelle 16: Aminosäuresequenzen der synthetisierten HCV-Peptide (Shimotohno HCV-1b Isolat) (Kato, Hijikata et al. 1990) unter Angabe der Position im HCV-Polyprotein. Die Peptide wurden in DMSO gelöst und auf 1 mg/ml eingestellt.**

### 6.3 Aminosäuresequenz des Hepatitis C Virus NS3-Proteins

1027 MPITAYSQQT RGLLGCIITS LTGRDKNQVD GEVQVLSTAT QSFLATCVNG  
1077 VCWTVYHGAG SKTLGPKGP ITQMYTNVDQ DLVGPAPPG ARSMTFCTCG  
1127 SSDLYLVTRH ADVIPVRRRG DSRGSLSPR PVSYLKSSG GPLLCPSGHV  
1177 VGIFRAAVCT RGVAKAVDFI PVESMETTMR SPVFTDNSSP PAVPQTFQVA  
1227 HLHAPTGS GK STKVPAAYAA QGYKVRVLP SVAATLGFGA YMSKAHGIEP  
1277 NIRTGVRTIT TGGPITYSTY GKFLADGGCS GGAYDIIICD ECHSTDWTTI  
1327 LGIGTVLDQA ETAGARLVVL ATATPPGSIT VPHPNIEEVA LSNTGEIPFY  
1377 GKAIPIEAIK GGRHLIFCHS KKKCEDELA AK LTGLGLNAVA YYRGLDVSVI  
1427 PTSGDVVVVA TDALMTGFTG DFDSVIDCNT CVTQTVDFSL DPTFTIETTT  
1477 VPQDAVSR SQ RRGRTGRGRS GIYRFVTPGE RPSGMFDSSV LCECYDAGCA  
1527 WYELTPAETT VRLRAYLNTP GLPVCQDHLE FWESVFTGLT HIDAHFLSQT  
1577 KQAGDNFPYL VAYQATVCAR AQAPPPSWDQ MWKCLIRLKP TLHGPTPLLY  
1627 RLGAVQNEIT LTHPITKFVM ACMSADLEVVT S

**Abbildung 44: Die Aminosäuresequenz des Hepatitis C Virus NS3-Proteins. Bis auf die erste Aminosäure (Formyl-Methionin, M), die bei der Isolation der NS3-Gensequenz eingeführt wurde, stimmt die Zahlenangabe mit der Aminosäureposition im HCV-Polyprotein überein. Das 15mere Oligopeptid, welches das potenzielle HLA-A\*0201 restringierte NS3-Peptid epitop beinhaltet (siehe 4.3.4, S. 80), ist umrahmt.**

## 7 Literaturverzeichnis

- Abrignani, S., M. Houghton, et al. (1999). "Perspectives for a vaccine against hepatitis C virus." J Hepatol **31 Suppl 1**: 259-63.
- Agnello, V., G. Abel, et al. (1999). "Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(22): 12766-71.
- Amara, R. R., F. Villinger, et al. (2002). "Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine." Vaccine **20**(15): 1949-55.
- Amara, R. R., F. Villinger, et al. (2001). "Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine." Science **292**(5514): 69-74.
- Arribillaga, L., A. L. de Cerio, et al. (2002). "Vaccination with an adenoviral vector encoding hepatitis C virus (HCV) NS3 protein protects against infection with HCV-recombinant vaccinia virus." Vaccine **21**(3-4): 202-10.
- Barba, G., F. Harper, et al. (1997). "Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(4): 1200-5.
- Bartenschlager, R., L. Ahlborn-Laake, et al. (1993). "Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions." J Virol **67**(7): 3835-44.
- Bartenschlager, R. und V. Lohmann (2000). "Replication of hepatitis C virus." J Gen Virol **81**(Pt 7): 1631-48.
- Bartosch, B., J. Dubuisson, et al. (2003). "Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes." J Exp Med **197**(5): 633-42.
- Belyakov, I. M., B. Moss, et al. (1999). "Mucosal vaccination overcomes the barrier to recombinant vaccinia immunization caused by preexisting poxvirus immunity." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(8): 4512-7.
- Bender, B. S., C. A. Rowe, et al. (1996). "Oral immunization with a replication-deficient recombinant vaccinia virus protects mice against influenza." J Virol **70**(9): 6418-24.
- Bennett, D. E. und D. F. O'Brien (1995). "Photoactivated enhancement of liposome fusion." Biochemistry **34**(9): 3102-13.
- Birnboim, H. C. und J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-23.
- Borowski, P., M. Heiland, et al. (1999). "Characterisation of non-structural protein 3 of hepatitis C virus as modulator of protein phosphorylation mediated by PKA and PKC: evidences for action on the level of substrate and enzyme." Arch Virol **144**(4): 687-701.
- Borowski, P., R. Kuhl, et al. (1999). "Identification and characterization of a histone binding site of the non-structural protein 3 of hepatitis C virus." J Clin Virol **13**(1-2): 61-9.

- Borowski, P., K. Oehlmann, et al. (1997). "Nonstructural protein 3 of hepatitis C virus blocks the distribution of the free catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase." J Virol **71**(4): 2838-43.
- Boulant, S., M. Becchi, et al. (2003). "Unusual multiple recoding events leading to alternative forms of hepatitis C virus core protein from genotype 1b." J Biol Chem **278**(46): 45785-92.
- Bressanelli, S., L. Tomei, et al. (2002). "Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides." J Virol **76**(7): 3482-92.
- Brinster, C., M. Chen, et al. (2002). "Hepatitis C virus non-structural protein 3-specific cellular immune responses following single or combined immunization with DNA or recombinant Semliki Forest virus particles." J Gen Virol **83**(Pt 2): 369-81.
- Brown, R. S., Jr. und P. J. Gaglio (2003). "Scope of worldwide hepatitis C problem." Liver Transpl **9**(11): S10-3.
- Bruna-Romero, O., J. J. Lasarte, et al. (1997). "Induction of cytotoxic T-cell response against hepatitis C virus structural antigens using a defective recombinant adenovirus." Hepatology **25**(2): 470-7.
- Buchbinder, S. P., B. Metch, et al. (2004). "Determinants of Enrollment in a Preventive HIV Vaccine Trial: Hypothetical Versus Actual Willingness and Barriers to Participation." J Acquir Immune Defic Syndr **36**(1): 604-612.
- Bukh, J., R. H. Purcell, et al. (1994). "Sequence analysis of the core gene of 14 hepatitis C virus genotypes." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(17): 8239-43.
- Butcher, S. J., J. M. Grimes, et al. (2001). "A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization." Nature **410**(6825): 235-40.
- Carrasco, L. (1995). "Modification of membrane permeability by animal viruses." Adv Virus Res **45**: 61-112.
- Carrere-Kremer, S., C. Montpellier-Pala, et al. (2002). "Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus." J Virol **76**(8): 3720-30.
- Carroll, M. W. und B. Moss (1997). "Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line." Virology **238**(2): 198-211.
- CDC (2003), Hepatitis C,  
[http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/slideset/hep\\_c/hcv\\_epi\\_for\\_distrib\\_000925.ppt](http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/slideset/hep_c/hcv_epi_for_distrib_000925.ppt), (Stand: 23.03.2004)
- Chang, J., S. H. Yang, et al. (1998). "Hepatitis C virus core from two different genotypes has an oncogenic potential but is not sufficient for transforming primary rat embryo fibroblasts in cooperation with the H-ras oncogene." J Virol **72**(4): 3060-5.
- Choo, Q. L., G. Kuo, et al. (1989). "Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome." Science **244**(4902): 359-62.

- Choukhi, A., S. Ung, et al. (1998). "Involvement of endoplasmic reticulum chaperones in the folding of hepatitis C virus glycoproteins." J Virol **72**(5): 3851-8.
- Cocquerel, L., C. C. Kuo, et al. (2003). "CD81-dependent binding of hepatitis C virus E1E2 heterodimers." J Virol **77**(19): 10677-83.
- Cohen, J. (1999). "The scientific challenge of hepatitis C." Science **285**(5424): 26-30.
- Cooper, S., A. L. Erickson, et al. (1999). "Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus." Immunity **10**(4): 439-49.
- Cormier, E. G., F. Tsamis, et al. (2004). "CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(19): 7270-4.
- Cosma, A., R. Nagaraj, et al. (2003). "Therapeutic vaccination with MVA-HIV-1 nef elicits Nef-specific T-helper cell responses in chronically HIV-1 infected individuals." Vaccine **22**(1): 21-9.
- Davis, H. L., R. G. Whalen, et al. (1993). "Direct gene transfer into skeletal muscle in vivo: factors affecting efficiency of transfer and stability of expression." Hum Gene Ther **4**(2): 151-9.
- Drexler, I., K. Heller, et al. (1998). "Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells." J Gen Virol **79** ( Pt 2): 347-52.
- Drexler, I., C. Staib, et al. (2003). "Identification of vaccinia virus epitope-specific HLA-A\*0201-restricted T cells and comparative analysis of smallpox vaccines." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(1): 217-22.
- Driesel, G., D. Wirth, et al. (1994). "Hepatitis C virus (HCV) genotype distribution in German isolates: studies on the sequence variability in the E2 and NS5 region." Arch Virol **139**(3-4): 379-88.
- Dubuisson, J., F. Penin, et al. (2002). "Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids." Trends Cell Biol **12**(11): 517-23.
- EASL (1999). "EASL International Consensus Conference on hepatitis C. Paris, 26-27 February 1999. Consensus statement." J Hepatol **31 Suppl 1**: 3-8.
- Egger, D., B. Wolk, et al. (2002). "Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex." J Virol **76**(12): 5974-84.
- Fan, Z., Q. R. Yang, et al. (1999). "Specific in vitro association between the hepatitis C viral genome and core protein." J Med Virol **59**(2): 131-4.
- Farci, P., H. J. Alter, et al. (1992). "Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus." Science **258**(5079): 135-40.
- Feinstone, S. M., A. Z. Kapikian, et al. (1975). "Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B." N Engl J Med **292**(15): 767-70.

- Fenner, F. (1980). "The global eradication of smallpox." *Med J Aust* **1**(10): 455-5.
- Firat, H., M. Cochet, et al. (2002). "Comparative analysis of the CD8(+) T cell repertoires of H-2 class I wild-type/HLA-A2.1 and H-2 class I knockout/HLA-A2.1 transgenic mice." *Int Immunol* **14**(8): 925-34.
- Firat, H., S. Tourdot, et al. (2001). "Design of a polyepitope construct for the induction of HLA-A0201-restricted HIV 1-specific CTL responses using HLA-A\*0201 transgenic, H-2 class I KO mice." *Eur J Immunol* **31**(10): 3064-74.
- Fleeton, M. N., P. Liljestrom, et al. (2000). "Recombinant Semliki Forest virus particles expressing louping ill virus antigens induce a better protective response than plasmid-based DNA vaccines or an inactivated whole particle vaccine." *J Gen Virol* **81**(Pt 3): 749-58.
- Francois, C., G. Duverlie, et al. (2000). "Expression of hepatitis C virus proteins interferes with the antiviral action of interferon independently of PKR-mediated control of protein synthesis." *J Virol* **74**(12): 5587-96.
- Frey, S. E., F. K. Newman, et al. (2003). "Response to smallpox vaccine in persons immunized in the distant past." *Jama* **289**(24): 3295-9.
- Gale, M., Jr., C. M. Blakely, et al. (1998). "Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation." *Mol Cell Biol* **18**(9): 5208-18.
- Gale, M. J., Jr., M. J. Korth, et al. (1997). "Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein." *Virology* **230**(2): 217-27.
- Gallinari, P., D. Brennan, et al. (1998). "Multiple enzymatic activities associated with recombinant NS3 protein of hepatitis C virus." *J Virol* **72**(8): 6758-69.
- Gesundheitsberichterstattung des Bundes (2003). Hepatitis C. Berlin, Robert Koch-Institut. **Heft 15**.
- Gherardi, M. M., J. L. Najera, et al. (2003). "Prime-boost immunization schedules based on influenza virus and vaccinia virus vectors potentiate cellular immune responses against human immunodeficiency virus Env protein systemically and in the genitoretal draining lymph nodes." *J Virol* **77**(12): 7048-57.
- Gherardi, M. M., E. Perez-Jimenez, et al. (2004). "Induction of HIV immunity in the genital tract after intranasal delivery of a MVA vector: enhanced immunogenicity after DNA prime-modified vaccinia virus Ankara boost immunization schedule." *J Immunol* **172**(10): 6209-20.
- Goffard, A. und J. Dubuisson (2003). "Glycosylation of hepatitis C virus envelope proteins." *Biochimie* **85**(3-4): 295-301.
- Gosert, R., D. Egger, et al. (2003). "Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons." *J Virol* **77**(9): 5487-92.

- Gregoriadis, G. (1998). "Genetic vaccines: strategies for optimization." Pharm Res **15**(5): 661-70.
- Griffin, S. D., L. P. Beales, et al. (2003). "The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine." FEBS Lett **535**(1-3): 34-8.
- Han, J. H., V. Shyamala, et al. (1991). "Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly(A) tails at the 3' end." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(5): 1711-5.
- Hanke, T., C. Barnfield, et al. (2003). "Construction and immunogenicity in a prime-boost regimen of a Semliki Forest virus-vectored experimental HIV clade A vaccine." J Gen Virol **84**(Pt 2): 361-8.
- Hanke, T., T. J. Blanchard, et al. (1998). "Enhancement of MHC class I-restricted peptide-specific T cell induction by a DNA prime/MVA boost vaccination regime." Vaccine **16**(5): 439-45.
- Hanke, T., A. J. McMichael, et al. (2002). "Development of a DNA-MVA/HIVA vaccine for Kenya." Vaccine **20**(15): 1995-8.
- Hanke, T., R. V. Samuel, et al. (1999). "Effective induction of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes in macaques by using a multiepitope gene and DNA prime-modified vaccinia virus Ankara boost vaccination regimen." J Virol **73**(9): 7524-32.
- Harada, T., N. Tautz, et al. (2000). "E2-p7 region of the bovine viral diarrhea virus polyprotein: processing and functional studies." J Virol **74**(20): 9498-506.
- He, X. S., B. Rehermann, et al. (1999). "Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(10): 5692-7.
- Himoudi, N., J. D. Abraham, et al. (2002). "Comparative vaccine studies in HLA-A2.1-transgenic mice reveal a clustered organization of epitopes presented in hepatitis C virus natural infection." J Virol **76**(24): 12735-46.
- Hope, R. G. und J. McLauchlan (2000). "Sequence motifs required for lipid droplet association and protein stability are unique to the hepatitis C virus core protein." J Gen Virol **81**(Pt 8): 1913-25.
- Hsu, M., J. Zhang, et al. (2003). "Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(12): 7271-6.
- Hu, S. L., V. Stallard, et al. (1993). "Protection of vaccinia-primed macaques against SIVmne infection by combination immunization with recombinant vaccinia virus and SIVmne gp160." J Med Primatol **22**(2-3): 92-9.
- Hugle, T., F. Fehrmann, et al. (2001). "The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein." Virology **284**(1): 70-81.

- Ide, Y., L. Zhang, et al. (1996). "Characterization of the nuclear localization signal and subcellular distribution of hepatitis C virus nonstructural protein NS5A." Gene **182**(1-2): 203-11.
- Ishido, S. und H. Hotta (1998). "Complex formation of the nonstructural protein 3 of hepatitis C virus with the p53 tumor suppressor." FEBS Lett **438**(3): 258-62.
- Jiao, X., R. Y. Wang, et al. (2003). "Modulation of cellular immune response against hepatitis C virus nonstructural protein 3 by cationic liposome encapsulated DNA immunization." Hepatology **37**(2): 452-60.
- Kaneko, S., S. Murakami, et al. (1992). "Quantitation of hepatitis C virus RNA by competitive polymerase chain reaction." J Med Virol **37**(4): 278-82.
- Kaneko, T., Y. Tanji, et al. (1994). "Production of two phosphoproteins from the NS5A region of the hepatitis C viral genome." Biochem Biophys Res Commun **205**(1): 320-6.
- Katayama, K., J. Kumagai, et al. (2004). "Titration of hepatitis C virus in chimpanzees for determining the copy number required for transmission." Intervirology **47**(1): 57-64.
- Kato, N. (2001). "Molecular virology of hepatitis C virus." Acta Med Okayama **55**(3): 133-59.
- Kato, N., M. Hijikata, et al. (1990). "Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(24): 9524-8.
- Kato, T., M. Miyamoto, et al. (2003). "Processing of hepatitis C virus core protein is regulated by its C-terminal sequence." J Med Virol **69**(3): 357-66.
- Kim, D. W., Y. Gwack, et al. (1995). "C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity." Biochem Biophys Res Commun **215**(1): 160-6.
- Kim, J. L., K. A. Morgenstern, et al. (1996). "Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide." Cell **87**(2): 343-55.
- Koch, J. O. und R. Bartenschlager (1999). "Modulation of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by nonstructural proteins NS3, NS4A, and NS4B." J Virol **73**(9): 7138-46.
- Kolykhalov, A. A., S. M. Feinstone, et al. (1996). "Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA." J Virol **70**(6): 3363-71.
- Kozak, M. (1987). "An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs." Nucleic Acids Res **15**(20): 8125-48.
- Kozlowski, A., S. A. Charles, et al. (2001). "Development of pegylated interferons for the treatment of chronic hepatitis C." BioDrugs **15**(7): 419-29.

- Kumar, P. K., K. Machida, et al. (1997). "Isolation of RNA aptamers specific to the NS3 protein of hepatitis C virus from a pool of completely random RNA." Virology **237**(2): 270-82.
- Kuo, G., Q. L. Choo, et al. (1989). "An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis." Science **244**(4902): 362-4.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). "Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose." J Biochem Biophys Methods **10**(3-4): 203-9.
- Lai, M. M. und C. F. Ware (2000). "Hepatitis C virus core protein: possible roles in viral pathogenesis." Curr Top Microbiol Immunol **242**: 117-34.
- Lasarte, J. J., P. Sarobe, et al. (2003). "A recombinant adenovirus encoding hepatitis C virus core and E1 proteins protects mice against cytokine-induced liver damage." Hepatology **37**(2): 461-70.
- Lechner, F., D. K. Wong, et al. (2000). "Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus." J Exp Med **191**(9): 1499-512.
- Lewis, P. J. und L. A. Babiuk (1999). "DNA vaccines: a review." Adv Virus Res **54**: 129-88.
- Li, S., M. Rodrigues, et al. (1993). "Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8+ T-cell-mediated protective immunity against malaria." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(11): 5214-8.
- Li, X., L. J. Jeffers, et al. (1995). "Identification of hepatitis C virus by immunoelectron microscopy." J Viral Hepat **2**(5): 227-34.
- Lin, C., B. D. Lindenbach, et al. (1994). "Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini." J Virol **68**(8): 5063-73.
- Lo, S. Y., M. J. Selby, et al. (1996). "Interaction between hepatitis C virus core protein and E1 envelope protein." J Virol **70**(8): 5177-82.
- Loirat, D., F. A. Lemonnier, et al. (2000). "Multiepitopic HLA-A\*0201-restricted immune response against hepatitis B surface antigen after DNA-based immunization." J Immunol **165**(8): 4748-55.
- Majeau, N., V. V. Gagne, et al. (2004). "The N-terminal half of the core protein of hepatitis C virus is sufficient for nucleocapsid formation." J Gen Virol **85**(Pt 4): 971-981.
- Major, M. E., K. Mihalik, et al. (1999). "Long-term follow-up of chimpanzees inoculated with the first infectious clone for hepatitis C virus." J Virol **73**(4): 3317-25.
- Martell, M., J. I. Esteban, et al. (1992). "Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution." J Virol **66**(5): 3225-9.



- Marusawa, H., M. Hijikata, et al. (1999). "Hepatitis C virus core protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kappaB activation." J Virol **73**(6): 4713-20.
- Matsui, M., O. Moriya, et al. (2003). "Enhanced induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes and protective efficacy in mice by DNA vaccination followed by adenovirus boosting in combination with the interleukin-12 expression plasmid." Vaccine **21**(15): 1629-39.
- Matsumoto, M., S. B. Hwang, et al. (1996). "Homotypic interaction and multimerization of hepatitis C virus core protein." Virology **218**(1): 43-51.
- Mayr, A., P. A. Bachmann, et al. (1974). Zellkulturen. Virologische Arbeitsmethoden. G. Wittmann. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag. **Band 1**.
- Mayr, A., V. Hochstein-Mintzel, et al. (1975). "Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-stammes MVA." Infection **3**: 6-14.
- Mayr, A. und E. Munz (1964). "[Changes in the vaccinia virus through continuing passages in chick embryo fibroblast cultures]." Zentralbl Bakteriol [Orig] **195**(1): 24-35.
- McClure, C. A., G. Gray, et al. (2004). "Challenges to Conducting HIV Preventative Vaccine Trials With Adolescents." J Acquir Immune Defic Syndr **36**(2): 726-733.
- McConkey, S. J., W. H. Reece, et al. (2003). "Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans." Nat Med **9**(6): 729-35.
- McLauchlan, J. (2000). "Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes." J Viral Hepat **7**(1): 2-14.
- McLauchlan, J., M. K. Lemberg, et al. (2002). "Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets." Embo J **21**(15): 3980-8.
- Meyer, H., G. Sutter, et al. (1991). "Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence." J Gen Virol **72 ( Pt 5)**: 1031-8.
- Misumi, Y., K. Miki, et al. (1986). "Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes." J Biol Chem **261**(24): 11398-403.
- Mizushima, H., M. Hijikata, et al. (1994). "Two hepatitis C virus glycoprotein E2 products with different C termini." J Virol **68**(10): 6215-22.
- Monazahian, M., I. Bohme, et al. (1999). "Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus." J Med Virol **57**(3): 223-9.
- Moriya, K., H. Fujie, et al. (1998). "The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice." Nat Med **4**(9): 1065-7.
- Moss, B. (2001). Poxviridae: the viruses and their replication. Fields Virology, 4th ed. D. M. Knipe, Howley P. M. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. **2**: 2849-2883.

- Moss, B., M. W. Carroll, et al. (1996). "Host range restricted, non-replicating vaccinia virus vectors as vaccine candidates." Adv Exp Med Biol **397**: 7-13.
- Mullis, K., F. Faloona, et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-73.
- Neddermann, P., A. Clementi, et al. (1999). "Hyperphosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein requires an active NS3 protease, NS4A, NS4B, and NS5A encoded on the same polyprotein." J Virol **73**(12): 9984-91.
- "NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C: 2002." (2002). NIH Consensus State Sci Statements **19**(3): 1-46.
- Nilsson, C., B. Makitalo, et al. (2001). "Enhanced simian immunodeficiency virus-specific immune responses in macaques induced by priming with recombinant Semliki Forest virus and boosting with modified vaccinia virus Ankara." Vaccine **19**(25-26): 3526-36.
- Okamoto, H., M. Kojima, et al. (1992). "Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2-year infection in a chimpanzee: variability and stability." Virology **190**(2): 894-9.
- Op De Beeck, A., L. Cocquerel, et al. (2001). "Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins." J Gen Virol **82**(Pt 11): 2589-95.
- Op De Beeck, A., R. Montserret, et al. (2000). "The transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins E1 and E2 play a major role in heterodimerization." J Biol Chem **275**(40): 31428-37.
- Palmowski, M. J., E. M. Choi, et al. (2002). "Competition between CTL narrows the immune response induced by prime-boost vaccination protocols." J Immunol **168**(9): 4391-8.
- Pascolo, S., N. Bervas, et al. (1997). "HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta2m double knockout mice." J Exp Med **185**(12): 2043-51.
- Pavlovic, D., D. C. Neville, et al. (2003). "The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(10): 6104-8.
- Penin, F., J. Dubuisson, et al. (2004). "Structural biology of hepatitis C virus." Hepatology **39**(1): 5-19.
- Pileri, P., Y. Uematsu, et al. (1998). "Binding of hepatitis C virus to CD81." Science **282**(5390): 938-41.
- Podevin, P., A. Sabile, et al. (2001). "Expression of hepatitis C virus NS5A natural mutants in a hepatocytic cell line inhibits the antiviral effect of interferon in a PKR-independent manner." Hepatology **33**(6): 1503-11.
- Ramirez, J. C., M. M. Gherardi, et al. (2000). "Attenuated modified vaccinia virus Ankara can be used as an immunizing agent under conditions of preexisting immunity to the vector." J Virol **74**(16): 7651-5.

- Rammensee, H., J. Bachmann, et al. (1999). "SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs." Immunogenetics **50**(3-4): 213-9.
- Ray, R. B., L. M. Lagging, et al. (1996). "Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype." J Virol **70**(7): 4438-43.
- Reed, K. E., A. E. Gorbalenya, et al. (1998). "The NS5A/NS5 proteins of viruses from three genera of the family flaviviridae are phosphorylated by associated serine/threonine kinases." J Virol **72**(7): 6199-206.
- Riedy, M. C., K. A. Muirhead, et al. (1991). "Use of a photolabeling technique to identify nonviable cells in fixed homologous or heterologous cell populations." Cytometry **12**(2): 133-9.
- Rijnbrand, R., P. Bredenbeek, et al. (1995). "Almost the entire 5' non-translated region of hepatitis C virus is required for cap-independent translation." FEBS Lett **365**(2-3): 115-9.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-91.
- Saito, I., T. Miyamura, et al. (1990). "Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(17): 6547-9.
- Salter, R. D. und P. Cresswell (1986). "Impaired assembly and transport of HLA-A and -B antigens in a mutant TxB cell hybrid." Embo J **5**(5): 943-9.
- Schmidt-Mende, J., E. Bieck, et al. (2001). "Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase." J Biol Chem **276**(47): 44052-63.
- Schneider, J., S. C. Gilbert, et al. (1998). "Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara." Nat Med **4**(4): 397-402.
- Schreier, E. und M. Höhne (2001). "Hepatitis C - Epidemiologie und Prävention." Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz **44**: 554-561.
- Schreier, E., M. Roggendorf, et al. (1996). "Genotypes of hepatitis C virus isolates from different parts of the world." Arch Virol Suppl **11**: 185-93.
- Sedegah, M., W. Weiss, et al. (2000). "Improving protective immunity induced by DNA-based immunization: priming with antigen and GM-CSF-encoding plasmid DNA and boosting with antigen-expressing recombinant poxvirus." J Immunol **164**(11): 5905-12.
- Shi, S. T. und M. M. Lai (2001). "Hepatitis C viral RNA: challenges and promises." Cell Mol Life Sci **58**(9): 1276-95.
- Shirai, M., T. Arichi, et al. (1995). "CTL responses of HLA-A2.1-transgenic mice specific for hepatitis C viral peptides predict epitopes for CTL of humans carrying HLA-A2.1." J Immunol **154**(6): 2733-42.

- Shirai, M., H. Okada, et al. (1994). "An epitope in hepatitis C virus core region recognized by cytotoxic T cells in mice and humans." *J Virol* **68**(5): 3334-42.
- Shiver, J. W., T. M. Fu, et al. (2002). "Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity." *Nature* **415**(6869): 331-5.
- Simmonds, P., E. C. Holmes, et al. (1993). "Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region." *J Gen Virol* **74** ( Pt 11): 2391-9.
- Song, J., M. Nagano-Fujii, et al. (2000). "Nuclear localization and intramolecular cleavage of N-terminally deleted NS5A protein of hepatitis C virus." *Virus Res* **69**(2): 109-17.
- Spahn, C. M., J. S. Kieft, et al. (2001). "Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit." *Science* **291**(5510): 1959-62.
- Staib, C., I. Drexler, et al. (2000). "Transient host range selection for genetic engineering of modified vaccinia virus Ankara." *Biotechniques* **28**(6): 1137-42, 1144-6, 1148.
- Staib, C., M. Lowel, et al. (2003). "Improved host range selection for recombinant modified vaccinia virus Ankara." *Biotechniques* **34**(4): 694-6, 698, 700.
- Stittelaar, K. J., T. Kuiken, et al. (2001). "Safety of modified vaccinia virus Ankara (MVA) in immune-suppressed macaques." *Vaccine* **19**(27): 3700-9.
- Stittelaar, K. J., L. S. Wyatt, et al. (2000). "Protective immunity in macaques vaccinated with a modified vaccinia virus Ankara-based measles virus vaccine in the presence of passively acquired antibodies." *J Virol* **74**(9): 4236-43.
- Sutter, G. und B. Moss (1992). "Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(22): 10847-51.
- Sutter, G., M. Ohlmann, et al. (1995). "Non-replicating vaccinia vector efficiently expresses bacteriophage T7 RNA polymerase." *FEBS Lett* **371**(1): 9-12.
- Sutter, G., A. Ramsey-Ewing, et al. (1994). "Stable expression of the vaccinia virus K1L gene in rabbit cells complements the host range defect of a vaccinia virus mutant." *J Virol* **68**(7): 4109-16.
- Sutter, G., L. S. Wyatt, et al. (1994). "A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus." *Vaccine* **12**(11): 1032-40.
- Suzich, J. A., J. K. Tamura, et al. (1993). "Hepatitis C virus NS3 protein polynucleotide-stimulated nucleoside triphosphatase and comparison with the related pestivirus and flavivirus enzymes." *J Virol* **67**(10): 6152-8.
- Taguchi, T., M. Nagano-Fujii, et al. (2004). "Hepatitis C virus NS5A protein interacts with 2',5'-oligoadenylate synthetase and inhibits antiviral activity of IFN in an IFN sensitivity-determining region-independent manner." *J Gen Virol* **85**(Pt 4): 959-69.
- Tanaka, T., N. Kato, et al. (1996). "Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome." *J Virol* **70**(5): 3307-12.

- Tanaka, Y., T. Shimoike, et al. (2000). "Selective binding of hepatitis C virus core protein to synthetic oligonucleotides corresponding to the 5' untranslated region of the viral genome." *Virology* **270**(1): 229-36.
- Tanji, Y., T. Kaneko, et al. (1995). "Phosphorylation of hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS5A." *J Virol* **69**(7): 3980-6.
- Taylor, D. R., S. T. Shi, et al. (1999). "Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein." *Science* **285**(5424): 107-10.
- Tenorio, A. R., M. E. Peeples, et al. (2004). "Evolution of Vaccinia Virus-Specific CD8+ Cytotoxic T-Lymphocyte Responses in Primary Vaccinees and Revaccinees." *Clin Diagn Lab Immunol* **11**(4): 758-61.
- Thomson, S. A., S. L. Elliott, et al. (1996). "Recombinant polyepitope vaccines for the delivery of multiple CD8 cytotoxic T cell epitopes." *J Immunol* **157**(2): 822-6.
- Tokita, H., G. R. Kaufmann, et al. (2000). "Hepatitis C virus core mutations reduce the sensitivity of a fluorescence enzyme immunoassay." *J Clin Microbiol* **38**(9): 3450-2.
- Tomei, L., C. Failla, et al. (1993). "NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein." *J Virol* **67**(7): 4017-26.
- Tsukiyama-Kohara, K., N. Iizuka, et al. (1992). "Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA." *J Virol* **66**(3): 1476-83.
- Urbani, S., J. Uggeri, et al. (2001). "Identification of immunodominant hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T-cell epitopes by stimulation with endogenously synthesized HCV antigens." *Hepatology* **33**(6): 1533-43.
- Urvil, P. T., N. Kakiuchi, et al. (1997). "Selection of RNA aptamers that bind specifically to the NS3 protease of hepatitis C virus." *Eur J Biochem* **248**(1): 130-8.
- Varaklioti, A., N. Vassilaki, et al. (2002). "Alternate translation occurs within the core coding region of the hepatitis C viral genome." *J Biol Chem* **277**(20): 17713-21.
- Varnavski, A. N., Y. Zhang, et al. (2002). "Preexisting immunity to adenovirus in rhesus monkeys fails to prevent vector-induced toxicity." *J Virol* **76**(11): 5711-9.
- Vassilaki, N. und P. Mavromara (2003). "Two alternative translation mechanisms are responsible for the expression of the HCV ARFP/F/core+1 coding open reading frame." *J Biol Chem* **278**(42): 40503-13.
- Vertuani, S., M. Bazzaro, et al. (2002). "Effect of interferon-alpha therapy on epitope-specific cytotoxic T lymphocyte responses in hepatitis C virus-infected individuals." *Eur J Immunol* **32**(1): 144-54.
- Vidalin, O., A. Fournillier, et al. (2000). "Use of conventional or replicating nucleic acid-based vaccines and recombinant Semliki forest virus-derived particles for the induction of immune responses against hepatitis C virus core and E2 antigens." *Virology* **276**(2): 259-70.

- Vukajlovich, S. W., J. Hoffman, et al. (1987). "Activation of human serum complement by bacterial lipopolysaccharides: structural requirements for antibody independent activation of the classical and alternative pathways." Mol Immunol **24**(4): 319-31.
- Wang, C., P. Sarnow, et al. (1993). "Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism." J Virol **67**(6): 3338-44.
- Wang, Z., C. La Rosa, et al. (2004). "Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing a soluble form of glycoprotein B causes durable immunity and neutralizing antibodies against multiple strains of human cytomegalovirus." J Virol **78**(8): 3965-76.
- Wee, E. G., S. Patel, et al. (2002). "A DNA/MVA-based candidate human immunodeficiency virus vaccine for Kenya induces multi-specific T cell responses in rhesus macaques." J Gen Virol **83**(Pt 1): 75-80.
- Werner, G. T., U. Jentsch, et al. (1980). "Studies on poxvirus infections in irradiated animals." Arch Virol **64**(3): 247-56.
- Wertheimer, A. M., C. Miner, et al. (2003). "Novel CD4+ and CD8+ T-cell determinants within the NS3 protein in subjects with spontaneously resolved HCV infection." Hepatology **37**(3): 577-89.
- WHO (1999). "Hepatitis C-global prevalence (update)." Wkly Epidemiol Rec **74**(49): 425-7.
- WHO (2002), Prevalence of HCV Infection,  
[http://www.who.int/ith/chapter05\\_m05\\_hepatitisc.html](http://www.who.int/ith/chapter05_m05_hepatitisc.html), (Stand: 21.03.2004)
- WHO (2003). "Global situation of the HIV/AIDS pandemic, end 2003. Part II: Estimating ARV global treatment needs (2003-2005)." Wkly Epidemiol Rec **78**(50): 426-30.
- Wolk, B., D. Sansonno, et al. (2000). "Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines." J Virol **74**(5): 2293-304.
- Wyatt, L. S., M. W. Carroll, et al. (1998). "Marker rescue of the host range restriction defects of modified vaccinia virus Ankara." Virology **251**(2): 334-42.
- Wyatt, L. S., S. T. Shors, et al. (1996). "Development of a replication-deficient recombinant vaccinia virus vaccine effective against parainfluenza virus 3 infection in an animal model." Vaccine **14**(15): 1451-8.
- Xie, Z. C., J. I. Riezu-Boj, et al. (1998). "Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews." Virology **244**(2): 513-20.
- Xu, Z., J. Choi, et al. (2001). "Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift." Embo J **20**(14): 3840-8.
- Yang, Z. Y., L. S. Wyatt, et al. (2003). "Overcoming immunity to a viral vaccine by DNA priming before vector boosting." J Virol **77**(1): 799-803.
- Yasui, K., T. Wakita, et al. (1998). "The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein." J Virol **72**(7): 6048-55.

Zhang, J., G. Randall, et al. (2004). "CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection." J Virol **78**(3): 1448-55.

## 8 Lebenslauf

	<b>PERSÖNLICHE DATEN</b>
Name	Marcus Tobias Meyr
Geburtstag	11. Januar 1975
Geburtsort	Nördlingen
Familienstand	verheiratet
Nationalität	deutsch
	<b>AUSBILDUNG</b>
1981 - 1985	St.-Ulrichs-Volksschule Schwabmünchen
1985 - 1994	Leonhard-Wagner-Gymnasium Schwabmünchen
07/1994	Abitur
09/1994 - 11/1995	Zivildienst im Städtischen Krankenhaus Schwabmünchen
11/1995 - 02/2001	Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg <i>Hauptfach: Biochemie</i> <i>Nebenfächer: Immunbiologie, Virologie, Tierphysiologie</i>
03/2000 - 02/2001	Diplomarbeit bei Prof. Dr. Friedrich Grummt, Institut für Biochemie, Universität Würzburg <i>Thema: Gewinnung von Antikörpern zur Analyse des murinen ORC-Komplexes</i>
03/2001 - 05/2004	Doktorarbeit bei PD Dr. Gerd Sutter, GSF-München-Neuherberg <i>Thema: Untersuchung rekombinanter Vakziniaviren MVA auf Eignung als Vektorimpfstoff gegen Infektionen mit dem Hepatitis C Virus</i>
	<b>BERUFSPRAXIS</b>
03/2000 - 02/2001	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Biochemie, Universität Würzburg
03/2001 - 05/2004	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Molekulare Virologie der GSF-München-Neuherberg
seit 05/2004	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Molekulare Virologie der Technischen Universität München