

Erzeugung und Charakterisierung
genetischer Impfstoffe gegen
konservierte Proteine
von Influenza A

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin,

vorgelegt von

Mathias M. Knauf

aus Frankfurt a.M.

im Oktober, 2011

Diese Arbeit wurde in der Zeit zwischen dem 1.4.2006 und dem 31.12.2009 am Robert Koch-Institut unter der Leitung von Dr. Stephen Norley angefertigt.

Es wurden nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet.

1. Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Kurth

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am 19. Januar 2012

Für meine Eltern Marion und Thies

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	8
Epidemiologie der Influenzaviren	8
Das Influenza A Virus	9
Influenza A H5N1 – die Vogelgrippe	12
Immunologie der Influenza A Infektion	13
Angeborenes Immunsystem	13
Adaptives Immunsystem – T- und B-Zellen	14
Influenza A Impfstoffe und Virustatika	15
Parameter der Optimierung.....	19
Vektoren.....	19
Plasmidimpfstoffe	21
Applikationsroute & Ort.....	23
Applikationszeitplan.....	24
Genetische Parameter.....	25
Codon-Optimierung	26
Biochemische Parameter	27
Adjuvantien und Immunomodulatoren	29
Zielsetzung	32
Material und Methoden.....	34
Konstruktion der Gene	34
Erzeugung der Gene per „Gradient-cycle PCR“	36
Primerverlängerung der Wildtyp-Sequenzen.....	37
Agarose-Gelelektrophorese	38
Gelextraktion.....	38
Restriktion und Ligation	39
Elektroporation von Prokaryonten	39
Bakterielle Kultur.....	40
Colony PCR.....	40
Sequenzierung.....	41
Zielgerichtete Mutagenese.....	41
Zellkultur	43
Lipofektion mit Polyfect	44
Transfektion mit Polyethylenimin.....	44
IPA Immunfärbung von Zellkulturen	45

Immunfluoreszenzmikroskopie.....	45
Polyacrylamid-Gelelektrophorese	46
Gel-Silberfärbung.....	47
Western Blot	48
Durchflusszytometrie (FACS).....	48
Herstellung der Gene Gun Munition.....	49
Impfung per Gene Gun	50
Serumpräparation	53
ELISA	53
Isolierung und Stimulation von murinen Milzzellen.....	54
ELISPOT nach Peptidstimulation.....	54
Virustitration unter BSL3	55
Belastungsversuche unter BSL3.....	56
Ergebnisse	57
De novo Synthese der Codon-optimierten Gene.....	57
Klonierung und Expression	57
Expression der codon-optimierten Immunogene der Schweinegrippe H1N1	61
Expression des IL-21co im Western Blot	61
Plasmid-Reinheit.....	62
Phase I - Immunogene.....	64
ELISPOT-Ergebnisse der Einzelgenimmunisierungen.....	64
ELISA-Zeitverläufe der Einzelgen-Immunsierungen	68
ELISA-Endpunkte der Einzelgen-Immunsierungen.....	72
Phase II - Adjuvantien.....	74
ELISPOT-Ergebnisse der Adjuvantienuntersuchungen	74
ELISA-Ergebnisse der Adjuvantienuntersuchungen	77
Phase III - Stammvergleich	80
ELISPOT-Ergebnisse des Stammesvergleichs.....	80
ELISA-Ergebnisse des Stammesvergleichs.....	83
Phase IV – Belastung mit 5 MLD ₅₀ von drei Stämmen	86
Phase V - Impfdosissteigerung und Belastung mit 50 MLD ₅₀ von zwei Stämmen.....	89
Phase VI – Einzelgen-Immunsierungen und homosubtypische Belastung mit 10 MLD ₅₀ ..	91
Phase VII - H1N1-Immunsierung und homosubtypische Belastung mit 10 MLD ₅₀	95

Diskussion.....	99
Vogelgrippe-Impfstoffe.....	99
Herstellung der Immunogene und Modulatoren	99
Lipopolysaccharid-Analyse der Plasmid-Reinheit.....	100
Phase I - Immunogene.....	101
Phase II - Adjuvantien.....	102
Phase III – Stammesunterschiede zwischen Balb/C und C57Bl/6.....	104
Phase IV – niedrig dosierte Belastung mit drei Stämmen.....	105
Phase V – hohe Belastung mit Steigerung der Impfdosis.....	106
Phase VI – Korrelate des Impfschutzes bei mittlerer Belastung	106
Phase VII – Transfer der Erkenntnisse auf die Schweinegrippe.....	108
Ausblicke	109
Zusammenfassung.....	112
Summary.....	113
Danksagung	115
Veröffentlichungen	117
Anhänge.....	118
Verwendete Puffer und Reagenzien	118
Verwendete Zelllinien	122
Verwendete Antikörper	122
„Score Sheet“ der täglichen Inspektion nach einer Infektion.....	123
Verwendete Primer	124
Verwendete Peptide.....	127
Quellenverzeichnis	132

Einleitung

Epidemiologie der Influenzaviren

Die Virusgrippe Influenza ist die Infektionskrankheit mit den höchsten Infektionszahlen weltweit, mit drei bis fünf Millionen schweren Erkrankungen und 250.000 – 500.000 Toten ¹. Allein in Deutschland sterben jedes Jahr über 8-11.000 Menschen an Influenza ², mit Maximalwerten von circa 31.000 Toten im Winter 1995/96, überwiegend durch Subtyp A ³. Es gibt in gemäßigten Klimazonen zwei jährliche Wellen der saisonalen Grippe: in Deutschland im Herbst ansteigend mit maximalen Infektionsraten um die 44.-50. Kalenderwoche herum und um die 4.-10. Kalenderwoche des folgenden Jahres, während in den Tropen die Infektionsraten mit Ausnahme von ein bis zwei Schwerpunkten in der Regenzeit ganzjährig konstant verlaufen. Eine Influenzainfektion verursacht häufig Fieber, Husten, Schüttelfrost, Nasen-, Rachen-, Hals- und Gliederschmerzen, Verdauungsbeschwerden und starke Entzündungsreaktionen in den Atemwegen ⁴.

Influenza ist die häufigste infektionsbedingte Ursache für Morbidität und Mortalität im Kindesalter und in der älteren Bevölkerung. In der EU und anderen industrialisierten Ländern werden pro Jahr ungefähr 5-15% der Bevölkerung während der Grippeepidemien infiziert ⁵. Hinzu kommen der wirtschaftliche Schaden durch krankheitsbedingten Arbeitsausfall sowie allein in Deutschland 1-5 Millionen Arztbesuche und 5.000-20.000 Hospitalisierungen ¹⁷.

Jährliche Influenzaepidemien werden infolge des Prozesses des antigenen Drifts in einer Bevölkerung mit unzureichender Immunität verursacht. Der antigene Drift resultiert aus der Anhäufung von Punktmutationen in den Genen, die für die beiden für das Immunsystem zuerst erkennbaren viralen Oberflächenglykoproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) kodieren. Diese Punktmutationen erzeugen mutierte Viren, die als Fluchtmutanten vom Immunsystem bis zum Beginn ihrer Replikation unerkannt bleiben. Da Fluchtmutationen nur selten ohne Einbußen in der Funktion des mutierten Proteins entstehen, folgen häufig kompensatorische Mutationen an anderen Stellen der Virusbestandteile zum Ausgleich der Funktionsminderung.

In Intervallen von nicht absehbarer Dauer kann zusätzlich ein antigener Shift auftreten ⁶. Dies wird durch die segmentierte Struktur des Influenzavirusgenoms ermöglicht, die bei gleichzeitiger Infektion eines Wirtes mit zwei Influenzastämmen zur Entstehung von

Reassortanten führen kann. Durch genetisches Reassortment während der Koinfektion kann ein humanpathogenes Influenzavirus neue Gensegmente unter anderem für die antigenen Oberflächenproteine HA und NA anderer Influenzaviren erwerben. Wenn es einer solchen Reassortante gelingt, in die humane Population einzudringen und dort aufgrund fehlender Antikörper effizient zu zirkulieren, kann dieses Ereignis eine weltweite Epidemie zur Folge haben, welche dann als Pandemie bezeichnet wird ⁷.

Durch die beide Eigenschaften der hohen Mutabilität (auch „*antigen drift*“) und des „*reassortment*“ (auch „*antigen shift*“) kommen immer wieder Viren hervor, die eine Herdenimmunität unterwandern können und die saisonale Grippe auslösen - und bisher spätestens alle 30-40 Jahre auch eine Pandemie hervorrufen. Diese Prognose könnte durch die heutige hohe Durchimpfungsrate mit der einhergehenden Herdenimmunität und der verbesserten Ernährungs- und medizinischen Versorgungslage allerdings zukünftig deutlich abgeschwächt werden.

Drei Influenza-Pandemien traten im letzten Jahrhundert auf: 1918, 1957 und 1968. Die schwerste im Jahr 1918 infizierte circa 50% der Weltbevölkerung und hatte ungefähr 20-50 Millionen Todesfälle zur Folge, besonders unter jungen Erwachsenen. Der Bevölkerungszuwachs wurde dadurch in den der Pandemie folgenden 10 Jahren reduziert ⁸.

Das Influenza A Virus

Influenza ist in drei Gruppen unterteilt, A, B und C ^{9 10}, wovon Influenza C für den Menschen aufgrund seiner relativen Seltenheit und seines milden Krankheitsverlaufs aus epidemiologischer Sicht nur eine untergeordnete Bedeutung besitzt ¹¹. Die Influenza wird auch als Virusgrippe bezeichnet und gehört zur Familie der *Orthomyxoviridae*. Die Influenza A ist ein behülltes Virus von circa 200nm Durchmesser und besitzt ein in acht Segmente unterteiltes, einzelsträngiges RNA-Genom in negativer Orientierung ¹².

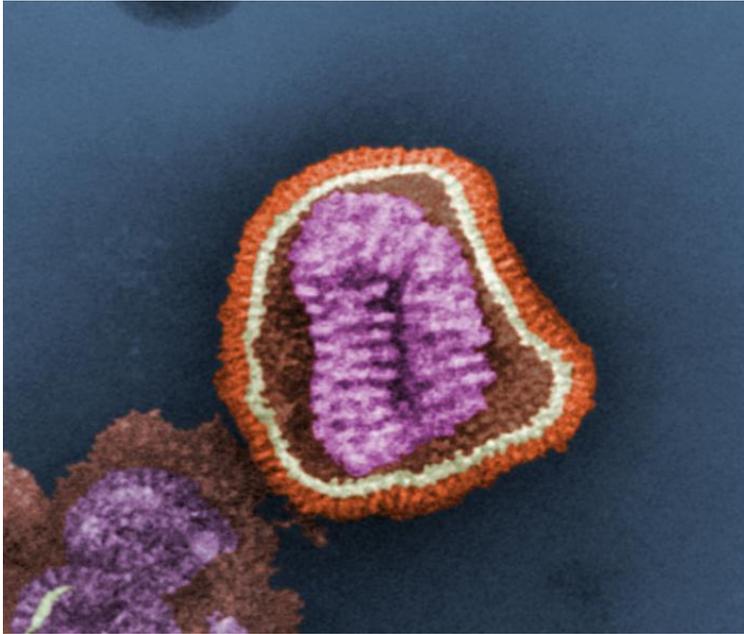


Abbildung 1 – Nachträglich eingefärbte elektronenmikroskopische Aufnahme eines Influenzavirions mit Oberflächenproteinen (orange) in der Membranhülle (weiß), die Matrixproteine M1 (braun) umhüllen Stapel aus Ribonucleoprotein-Komplexen (violett) ¹³

Aus diesen acht Segmenten werden nach der transkriptionalen Synthese der Plusstränge bei der Translation durch alternatives Spleißen elf Proteine abgelesen. Das Proteom umfasst acht im Virion befindliche Proteine (strukturelle Proteine), mit denen das Virus Zellen infizieren kann, und drei für die Replikation sowie der Hemmung der Immunreaktion benötigte Proteine (NS1, NS2, PB1-F2). Die strukturellen Proteine umfassen in der Virushülle ein Hämagglutinin (HA) zur Bindung des Virions an den zellulären sialylierten Rezeptor, woraufhin nach einer proteolytischen Aktivierung durch zelluläre Furin-Proteasen und einer Ansäuerung des Endosoms die Penetration der lysosomalen Membran und damit der Zelleintritt eingeleitet wird. Weiterhin folgt eine Neuraminidase (NA), zur Freisetzung des Hämagglutinins der neugebildeten Virionen während und nach der Exozytose des Endosomeninhaltes, und das Matrixprotein 2 (M2), ein Protonenkanal zur Ansäuerung des Viruslumens während der endosomalen Ansäuerung beim Zelleintritt, wodurch das Fusionspeptid des Hämagglutinins die lysosomale Membran penetriert und den Viruskern ins Cytosol freisetzt ^{14 15}.

Das Nucleoprotein (NP) verpackt die RNA-Segmente und bildet so das Ribonucleoprotein im Virion, außerdem besitzt es die für den Kernimport des Ribonucleoproteins notwendigen Signalsequenzen ¹⁶. Das Matrixprotein 1 (M1) verbindet das Ribonucleoprotein mit der Virushülle. Im Ribonucleoprotein bindet neben NP noch die für die Replikation und Transkription notwendige RNA-abhängige RNA-Polymerase (PA) an die RNA, im Komplex mit den Polymerase-bindenden Proteinen PB1 und PB2 ¹⁷.

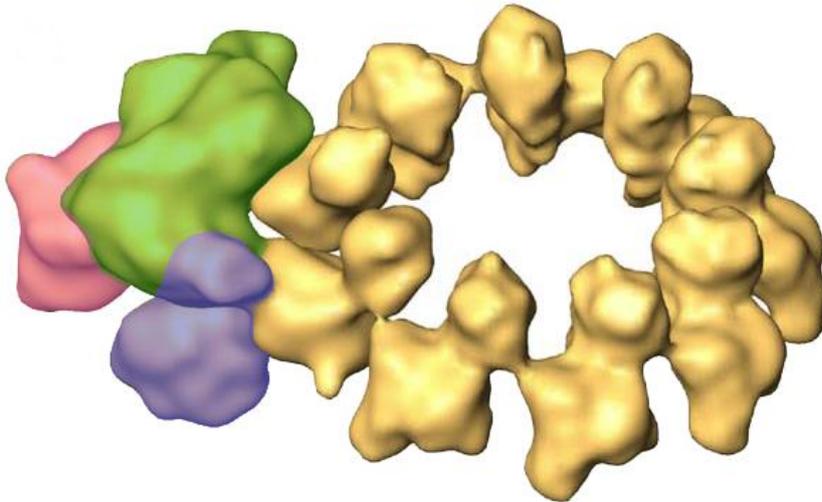


Abbildung 2: Nonamere des Nucleoproteins (beige) in einer Rekonstruktion nach Cryo-EM-Bildern als RNP-Komplex mit PA (grün), PB1 (blau) und PB2 (rot), farblich modifiziert nach Coloma et al. ¹⁸.

Die nichtstrukturellen Proteine bestehen aus NS1, NS2 und PB1-F2, von denen Letzteres in voller Länge nur bei humanen und porcinen Influenzaviren vorkommt. Ersteres hemmt die Interferonreaktion der Zelle nach einer Infektion ¹⁹ und verhindert den Kernexport von RNA mit PolyA-Schwanz, wodurch aufgrund verringerter Konkurrenz mit zellulärer RNA am Ribosom mehr virale Proteine aus der viralen RNA erzeugt werden, da die virale RNA keinen PolyA-Schwanz trägt ^{20 21}. NS2 sorgt für den Export von viraler RNA aus dem Zellkern ²². Das Genprodukt des zweiten Leserasters im PB1-Segment, PB1-F2, führt über den mitochondrialen Weg zur Apoptose in infizierten Zellen und fördert die korrekte Lokalisation von PB1 im Zellkern und seine Assoziation mit der Polymerase PA ^{23 24}.

Influenzaviren haben sich, je nach Berechnungsmethode, vor circa 100 - 300 Jahren in die Subtypen A und B aufgespalten ²⁵, die Abspaltung von Subtyp C erfolgte aufgrund seines deutlich unterschiedlichen Genoms vermutlich wesentlich früher. Die genaue Bestimmung des Zeitpunkts der Trennung von Typ C und A oder B ist bei den hochvariablen RNA-Viren allerdings problematisch. Die derzeitigen C-Typ Viren lassen sich ungefähr auf einen letzten gemeinsamen C-Typ Vorfahren im Jahre 1950 zurückführen. Möglicherweise gab es einen Flaschenhalseffekt oder „founder effect“, bei dem alle rezenten C-Typ Viren aus einem übriggebliebenen Stamm entstanden.

Influenza A H5N1 – die Vogelgrippe

Der erste Ausbruch einer H5N1-Influenza mit hoher Mortalität und Pandemie-Potential trat 1997 auf, als in Hongkong und den umliegenden Provinzen ein neues humanpathogenes Influenzavirus mit einem HA eines aviären Influenzavirus (H5N1) entstand. Die Ausbreitung dieses Ausbruches konnte durch das massive Töten von Geflügel verhindert werden. Das Auftreten weiterer H5N1-Viren wurde von Vietnam, Thailand, Indonesien, China und der Türkei über den Rest Europas seit 2003 berichtet. Bis zum Mai 2009 haben Infektionen durch das H5N1-Virus unter Menschen global insgesamt 262 Todesopfer bei 429 bestätigten Fällen gefordert ²⁶. Der Grund für die hohe Pathogenität liegt vermutlich in der multibasischen Furin-Schnittstelle und in Mutationen in PA ²⁷, PB1 ²⁸ und PB2 ²⁹ und PB1-F2 ^{30 31}, was in höherer Viruslast und Cytokinämie resultiert ^{32 33}. Bisher gibt es jedoch noch keine Hinweise darauf, dass H5N1 Viren effizient unter Menschen übertragen werden können, bis 2008 wurden nur vier direkte humane Transmissionen registriert ³⁴. Die veränderte Präferenz des H5-Hämagglutinins für eine Bindung an α 2,3- und α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren im Gegensatz zu anderen humanpathogenen Influenzastämmen zeigte nicht die erwartete Steigerung der Pathogenität durch erhöhte Bindungsfähigkeit ^{35 36} des viralen Andockproteins, sondern erweitert ausschließlich das Wirtsspektrum im Reich der Vögel.

Die H5N1-Funde in Europa sind mit einer bedeutenden epizootischen Belastung durch hochpathogene aviäre H5N1-Influenzaviren im Südostasien zusammengefallen, die nicht nur häusliches Geflügel, sondern auch Wildvögel wie Gänse, Flamingos und Enten tötete ³⁷. Es hat sich gezeigt, dass diese Viren auch hochpathogen und übertragbar auf verschiedene Säugetierspezies wie Frettchen, Katzen ³⁸ und Tiger ³⁹ sind. Es muss daher befürchtet werden, dass H5N1-Viren die Kapazität gewinnen können, sich in der humanen Population infolge von Mutation oder "Reassortment" auszubreiten und so eine neue Pandemie mit hoher Mortalitätsrate und einer neu erworbenen Transmission von Mensch zu Mensch auslösen zu können. Das H5N1-Virus ist bereits in den meisten Ländern der EU, in der Ukraine und Kroatien in toten Vögeln identifiziert worden, darunter auch Deutschland (Influenza A/H5N1/Germany/R65/2006). Das Entstehen einer pandemischen Influenza durch H5N1-Viren stellt somit eine akute Bedrohung dar, die durch die konventionellen Grippeimpfstoffe nicht abgedeckt wird, da diese nur gegen die enthaltenen Subtypen H1N1, H3N2 und Influenza B wirksam schützen und in Tiermodellen keinen Impfschutz gegen Belastung mit H5N1-Viren erzeugen. Weiterhin bieten klassische, Antikörper-induzierende Impfstoffe nur einen stammspezifischen Schutz, was einen hohen Anpassungsaufwand und eine zeitliche Verzögerung des Behandlungsbeginns mit sich bringt.

Es besteht daher ein dringendes Bedürfnis für die Neuentwicklung von schnell verfügbaren, aktualisierten, kostengünstigen und breitenwirksamen sowie H5N1-spezifischen Impfstoffen, um den möglichen Ausbruch einer Grippepandemie durch H5N1-Viren durch Immunisierung frühzeitig kontrollieren zu können. Durch die vielfältigen Anpassungsmöglichkeiten genetischer Vakzine kann ein Impfstoff rapide erzeugt werden, der sich an das Virus der ersten Welle anlehnt und in der zweiten Welle eine deutlich höhere Kreuzreaktivität gegenüber neuen Varianten aufweist.

Immunologie der Influenza A Infektion

Angeborenes Immunsystem

Die Bestandteile von Myxoviren - und in noch bedeutenderem Umfang von RNA-Viren - sind dem Immunsystem des Menschen seit vielen tausend Jahren bekannt. Dadurch konnten sich im Immunsystem Rezeptoren gegen konstante und dem Wirtsorganismus fremdartige Struktur motive, sogenannte „pathogen-associated molecular patterns“ ausbilden, unter anderem auch gegen jene der Grippe.

Diese umfassen zur Auslösung der Interferonreaktion ^{40 41} bei Säugern die „Toll-like receptors“ (TLR), insbesondere den TLR3 zur Erkennung längerer doppelsträngiger viraler RNA ⁴² und TLR7 und TLR8 für kürzere, einzel- oder doppelsträngige RNA, sowie im Cytosol die Proteine RIGI ^{43 44}, MDA5 ^{45 46} und DAI ⁴⁷.

Doppelsträngige RNA werden daneben auch von der Interferon-induzierten dsRNA-abhängigen Proteinkinase R (PKR) erkannt, welche nach Bindung der dsRNA eine autoaktivierende Phosphorylierung, dann eine inaktivierende Phosphorylierung von eIF2A und somit eine Translationsinhibition zur Folge haben.

Die ebenfalls Interferon-induzierte Oligoadenylatsynthetase (OAS1) bindet ebenfalls doppelsträngige RNA und produziert daraufhin cAMP, welches zu einer Aktivierung der ssRNA-abhängigen RNase L führt, in Folge dessen virale RNA und auch die zelluläre RNA degradiert wird und über den JNK-Weg zur Apoptose der Wirtszelle führt ⁴⁸.

Eine Apoptose kann auch durch das Nod-like Receptor Protein 3 (NLRP3) nach Erkennung derzeit noch unbekannter Struktur motive ⁴⁹ induziert werden, was aufgrund der daraus folgenden niedrigeren Viruslast einen mildernden Effekt auf den Krankheitsverlauf hat.

Schließlich existiert auch noch der Interferon-induzierte Myxovirus-Resistenzfaktor MxA (in Mäusen: Mx1), ein GTP-bindendes Protein, welches den Kernimport von RNP behindert und die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase inhibiert⁵⁰.

Adaptives Immunsystem – T- und B-Zellen

Nach einer natürlichen Infektion mit Influenza werden von den drei auf der Virionoberfläche befindlichen Proteinen nur HA und NA regelmäßig von Antikörpern erkannt und demnach werden Influenzaviren serologisch in 16 HA-Gruppen und 9 NA-Gruppen unterteilt. Der Oberflächenteil des dritten und letzten Membranproteins M2 besteht aus nur 24 Aminosäuren und wird durch die Überdeckung mit zellulären Oberflächenproteinen, Hämagglutininen und Neuraminidasen maskiert. Diese Maskierung gilt sowohl für die Zellmembran vor der Virenkapselung als auch für das reife Virion und verhindert zumeist eine Antikörperinduktion. Sporadisch findet man auch Antikörper gegen NP und andere interne Virusproteine⁵¹.

Natürliche Antikörper – also präexistierende Antikörper ohne vorherigen Antigenkontakt der B-Zelle und ohne Klassenwechsel oder somatische Hypermutation der Immunglobulingene – gegen Influenza können die Viruslast bei einer Infektion ebenfalls senken^{52 53}.

Häufig entstehen in geringem Umfang kreuzreaktive Antikörper gegen H5N1^{54 55 56 57 58 59} oder H1N1-Schweinegrippe⁶⁰ nach der Impfung⁶¹ oder vielmehr noch nach einer Infektion. Diese reichen schon kurze Zeit nach der Infektion nicht mehr aus, um eine neue Infektion eines anderen Influenzavirus zu verhindern, lindern aber den Verlauf der Erkrankung und beschleunigen die Genesung.

Das Hämagglutinin^{62 63}, die Neuraminidase und in geringerem Umfang auch das Matrixprotein 2⁶⁴ induzieren stammspezifische neutralisierende Antikörper⁶⁵, welche mit einem Schutz vor Infektion und nicht nur mit einer Besserung des Infektionsverlaufs assoziiert sind. Von diesen drei Oberflächenproteinen kann aufgrund seiner geringeren Variabilität vermutlich nur das M2-Protein kreuzreaktive Antikörper^{66 67 68 69} induzieren.

Die Epitope für zytotoxische T-Lymphozyten (CTL)⁷⁰ von NP und M1 sind sowohl bei Mäusen als auch beim Menschen^{71 72} immundominant, ihre Peptide erzeugen die stärkste zelluläre Immunantwort. Schwache Epitope wie das CTL-Epitop des M2 Proteins im Menschen werden dann immundominant, wenn keine dominanteren Epitope anderer Gene

mit verabreicht werden ^{73 74 75}. Insbesondere bei den weniger variablen Genen ist eine längerfristige breitenwirksame zytotoxische T-Zell-Immunität (CTLI) und humorale Immunität zu erreichen, die sich gegen zeitlich und phylogenetisch konservierte Epitope richtet. Kreuz-Reaktivitäten von humanen CTL gegen Epitope von Influenza H5N1 wurden bereits beschrieben ⁷⁶.

Das M1-, M2- und NP-Gene sind innerhalb der Influenzaviren zwischen 90 – 97% konserviert und somit ideale Impfstoffkandidaten für breitenwirksame Influenzaimpfstoffe ⁷⁷, welche saisonunabhängig einsetzbar sind. Es gibt bisher nur wenige Ansätze, bei denen durch eine Überexpression *in vivo* gegen hochkonservierte Gene - ohne die restlichen Virusbestandteile - immunisiert wird. Dieser Ansatz hat die Vorteile, dass der Impfschutz sowohl die Grippe als auch die Vogelgrippe umfasst und nicht jedes Jahr ein neuer Impfstoff konstruiert werden muss. Die Korrelate eines Impfschutzes sind wenig charakterisiert. Selbst jahrzehntelang erprobte Nachweismethoden für Antikörper gegen Oberflächenproteine wie der Hämagglutinationsinhibitionstest oder der Microneutralisierungstest können negativ ausfallen, obwohl Frettchen nach der Immunisierung gegenüber tödlichen Dosen geschützt wurden ⁷⁸, was auf eine Antikörper-unabhängige Immunität hindeutet.

Im Mausmodell ist Influenza in der Regel erst nach Anpassung an den Wirt durch serielle Passagen in einem Gewebe maximaler Virusproduktion (Lunge) oder mit begrenztem Immunsystem (Hirn), wie der in den Belastungsversuchen verwendete adaptierte H1N1-Stamm A/PuertoRico/8/1934 ⁷⁹. Allerdings sind im Gegensatz dazu H5N1-Isolate direkt pathogen für Mäuse, wobei es keine einzelnen charakteristischen Mutationen gibt, die zu dieser Pathogenität in Mäusen führen, sondern mehrere Kombinationen ⁸⁰. Die Symptomatik von Influenza bei Mäusen unterscheidet sich in drei Hauptfaktoren von der beim Menschen, es gibt kein Fieber, kein Husten und deshalb keine Virusausscheidung und Ausbreitung auf Artgenossen, wohl aber alle anderen Auswirkungen wie Appetitlosigkeit, Trägheit, Gewichtsverlust, Schüttelfrost und als schwere Verlaufsformen mit einer Infektion des Herzmuskels oder des Hirns mit neurologischen Symptomen wie Enzephaloenteritis und Paresen bis hin zum Tod.

Influenza A Impfstoffe und Virustatika

Ziel eines immunogenen Impfstoffes ist die Erzeugung einer spezifischen und langanhaltenden Immunreaktion gegen einen Erreger, der auch zu einem Schutz vor einer

Erkrankung führt. Daneben existieren zur Dämpfung einer überschießenden Immunreaktion oder Autoimmunreaktion auch tolerogene Impfstoffe.

Die klassischen und weltweit momentan verwendeten Impfstoffe gegen Influenza sind entweder gereinigte Oberflächenantigene, Virus-Spaltimpfstoffe, inaktivierte Viren oder attenuierte Viren, mit zunehmender Induktion der Immunantwort aber auch mit zunehmenden Nebenwirkungen. Die inaktivierten und die attenuierten Viren induzieren höhere Immunantworten pro Antigenmenge als einzelne Antigene oder gereinigte Virusproteine, vermutlich aufgrund der enthaltenen RNA und der Aktivierung des TLR7⁸¹. Bei attenuierten Viren erfolgt zusätzlich eine verminderte intrazelluläre Replikation, welche eine MHC-I-Präsentation und eine daraus folgende zelluläre Immunantwort erlaubt.

Diese Impfstoffe werden in der Regel aus befruchteten Hühnereiern hergestellt, in denen die Viren angezüchtet wurden. Bei Spaltimpfstoffen werden die ausgesuchten und isolierten Virusstämme in befruchteten Eiern im Inkubator angezüchtet und anschließend per Dichtegradientenzentrifugation gereinigt, mit Formalin oder β -Propiolacton inaktiviert und mit einem Tensid versetzt, um das Virus in seine Bestandteile zu zerlegen. Abschließend werden drei Spaltviren von drei unterschiedlichen zirkulierenden Stämmen (2 x Subtyp A und 1 x Subtyp B) der letzten Jahre zu einem neuen Impfstoff vereinigt und pro Impfdosis auf je 15 μ g Hämagglutinin von jedem der drei Stämme verdünnt. Inaktivierte Viren werden prinzipiell ähnlich, aber ohne Tensidsplaltung erzeugt, während bei attenuierten Viren sowohl das Tensid als auch die Inaktivierung mittels Formalin entfällt. Da bei attenuierten Viren die Gefahr einer Reversion zu einem pathogenen Wildtyp und bei den segmentierten Viren zusätzlich eine Rekombination mit anderen viralen RNA-Segmenten bei einer Koinfektion möglich ist, werden bei attenuierten Viren umfangreiche Deletionen eingeführt. Die zugelassenen H5N1- und Schweinegrippe-Vakzine (Spaltimpfstoffe) und beinhalten nur einen Stamm.

Eine jährliche Influenza-Schutzimpfung ist notwendig, um einen Impfschutz aufrechtzuerhalten, da sich das hochvariable Influenza-A-Virus saisonal an die unterschiedlichen Immunantworten in der Bevölkerung anpasst. Diese Selektion fördert unter Erhalt der Funktion des Virus neue Mutationen zur Umgehung der Immunantwort in der Wirtspopulation, diese neuen Viren werden als Fluchtmutanten bezeichnet.

Von der Selektion bis zum fertigen Produkt vergehen 6-9 Monate, sodass der passende Impfstoff für eine Pandemie zu spät verfügbar wird und dann aus einem Virus vom Beginn der Pandemie besteht, nicht aus dem dann aktuell zirkulierenden Stamm.

Die Produktion in bebrüteten Hühnereiern erzeugt zudem vergleichsweise hohe Kosten und ist in seiner Kapazität aufgrund des hohen manuellen Arbeitsaufwands nur kostenaufwändig erweiterbar⁸². Hinzu gesellt sich das Problem der Eiproteine als Kontamination im Impfstoff, was nach Injektion zu Hypersensibilitäten gegen Hühnereibestandteile bis hin zur Anaphylaxie führen kann.

Die Herstellung und Prüfung eines DNA-Vakzins gegen Influenza dauert dagegen 2-3 Monate, was bei einer möglichen Pandemie ein entscheidender Zeitvorteil ist⁸³. Kommerzielle Grippeimpfstoffe induzieren aufgrund des fehlenden Zelleintritts ausschließlich Antikörper, welche zudem meist nur gegen einen Virusstamm wirksam sind⁸⁴. Nur selten entstehen dabei auch zytotoxische T-Lymphozyten, die einen breitenwirksamen Schutz vermitteln können.

In Deutschland sind zur Zeit folgende Grippe-Impfstoffe durch das Paul-Ehrlich-Institut⁸⁵ oder die „European Medicines Agency“⁸⁶ zugelassen:

Tabelle 1 – Aktuell erhältliche Influenza-Impfstoffe

(*) mock-up Zulassung, bei dem der H5N1-Impfstamm jeweils angepasst werden muss

Name	Hersteller	Impfstofftyp	Virusstamm
Addigrip	Sanofi Aventis Pasteur MSD / Chiron Novartis	Spaltimpfstoff	variabel, 2xIAV, 1xIBV
Afluria	CSL Biotherapies	Spaltimpfstoff	variabel, 2xIAV, 1xIBV
Begrivac / Fluad / Optaflu	Chiron Novartis	Spaltimpfstoff	variabel, 2xIAV, 1xIBV
Fluarix / Influxplit SSW	GlaxoSmithKline	Spaltimpfstoff	variabel, 2xIAV, 1xIBV
Grippeimpfstoff Beta	Betapharm	Spaltimpfstoff	variabel, 2xIAV, 1xIBV
Grippeimpfstoff Hexal	Hexal	Spaltimpfstoff	variabel, 2xIAV, 1xIBV
Grippeimpfstoff Ratiopharm	Ratiopharm / Biokanol	Spaltimpfstoff	variabel, 2xIAV, 1xIBV
Infectovac Flu	Berna	Spaltimpfstoff	variabel, 2xIAV, 1xIBV
Influvac / Invivac	Solvay	Spaltimpfstoff	variabel, 2xIAV, 1xIBV
Mutagrip	Sanofi Aventis Pasteur MSD	Spaltimpfstoff	variabel, 2xIAV, 1xIBV
Arepanrix	GlaxoSmithKline	Inaktiviert	variabel, nur 1 Stamm
Celvapan	Baxter	inaktiviert	variabel, nur 1 Stamm
Daronrix*	GlaxoSmithKline	inaktiviert	variabel, nur 1 Stamm
Humenza	Sanofi Aventis Pasteur MSD	Inaktiviert	variabel, nur 1 Stamm
Focetria	Chiron Novartis	Oberflächenantigen	variabel, nur 1 Stamm
Celtura	Chiron Novartis	Spaltimpfstoff	variabel, nur 1 Stamm
Pandemrix / Prepandrix	GlaxoSmithKline	Spaltimpfstoff	variabel, nur 1 Stamm

Die häufigsten Nebenwirkungen⁸⁷ sind lokaler Schmerz, Schwellung, Muskelschmerzen und Fieber, sehr selten auch das Guillain-Barré-Syndrom. Des Weiteren führen Allergien gegen Proteine des Hühnereis in seltenen Fällen zu Anaphylaxie, weshalb die Spaltimpfstoffe vermehrt in Zellkultur (z.B. Optaflu und Celtura in Verozellen) anstatt in bebrüteten Hühnereiern hergestellt werden.

Aufgrund geringerer Zulassungsvoraussetzungen der „*Federal Drug Administration*“ (FDA), wie beispielsweise ungeprüfte Abnahmen firmenseitiger Toxizitätsuntersuchungen und Studienergebnisse, sind in den USA weitere Impfstoffe zugelassen, wie z.B. das aus einem attenuierten Grippevirus bestehende Flumist® von MedImmune, welches in der Schweiz in Phase-III-Versuchen an knapp 1600 Menschen getestet wurde. Es hat mehr Nebenwirkungen mit sich gebracht, als in der Kontrollgruppe mit dem klassischen Spaltimpfstoff zu finden war. Insbesondere die Inzidenz für temporäre (1,5 - 60 Tage, durchschnittlich 26 Tage) einseitige Lähmungen der Gesichtsmuskulatur lag bei 0,7%, wodurch die Markteinführung in Europa abgebrochen wurde⁸⁸.

Attenuierte Viren werden durch Adaptation an nicht-humane Bedingungen wie ausschließliches Wachstum bei Raumtemperatur erzeugt, wie z.B. der Stamm Influenza A/AnnArbor^{89 90} als konstante Basis in FluMist®. Sie induzieren eine milde bis inapparente Infektion mit einer sowohl humoralen als auch, aufgrund der zytosolischen Prozessierung und MHC-I-Präsentation, einer zellulären Immunantwort, es besteht aber gleichzeitig die Gefahr der Reversion – die Entstehung einer Mutante mit wiederhergestellter Pathogenität. Eine weitere Attenuierungsstrategie besteht in der Deletion nichtessentieller Gene des Impfvirus, wie das M2 Gen von Influenza⁹¹.

Unter den experimentellen Influenza-Impfstoffen, die schützende Antikörper oder zytotoxische T-Zellen induzieren, befinden sich Spaltimpfstoffe^{92 93 94 95} neu-aufretender Stämme, die Schutz durch IgG gegen HA und NA⁹⁶ vermitteln, inaktivierte Viren^{97 98} und replikationsgehemmte H5N1-Impfviren auf der Basis eines durch Kälteadaptation attenuierten Influenzavirus^{99 100}.

Darüber hinaus gibt es unter den virale Impfvektoren, die nicht ausschließlich aus Influenza A-Bestandteilen bestehen, HA-Alphaviren mit einhergehender Induktion von zytotoxischen T-Zellen¹⁰¹, H5-Adenoviren^{102 103}, H5-MVA-Vacciniaviren¹⁰⁴, HA-NA-Vacciniaviren¹⁰⁵.

Unter den Plasmidimpfstoffen befinden sich i.m. applizierte IL-18-modulierte H5- & H7-Plasmide^{106 204}, HA- & M1- & NP-Plasmide¹⁰⁷, HA- & NP-Plasmide^{108 109}, NP- und M-

Plasmide ^{110 111}, ein M-Plasmid ^{112 113}, ein M-Plasmid mit GM-CSF und IL-12 ¹¹⁴, ein NP-Plasmid ¹¹⁵, NP-Plasmide mit Adenoviren ¹¹⁶, diverse Plasmide (HA, NA, M1, M2, NP, NS1, und NS2) intramuskulär injiziert ¹¹⁷, diverse Plasmide (HA, NA, M1 und NP) per Gene Gun, i.m. oder i.n. Anwendung ¹¹⁸, sowie PCR-Produkte von HA und NA ¹¹⁹.

Daneben wurde ein Antikörper-basierter Impfschutz vor Infektion durch „Virus-Like Particles“ (VLP) ^{120 121 122 123 124} erreicht, auch bei nasaler Anwendung ¹²⁵ und bei nachfolgenden Infektionen mit anderen Stämmen ¹²⁶. Spaltimpfstoffe mit MF59 als Adjuvans ^{127 128 129 130 131} zeigten kreuzreaktive Antikörper ^{132 133} und haben die klinische Phase I durchlaufen ¹³⁴.

Neben den Impfstoffen existieren auch monoklonale Antikörper zur passiven Immunisierung ¹³⁵ sowie therapeutische Virustatika, die erst nach einer Infektion verabreicht werden können. Hierzu zählen die Neuraminidasehemmer Oseltamivir (Tamiflu®) und Zanamivir (Relenza®) und die Protonenkanalhemmer Amantadin und Rimantadin. Während Antikörper kostenintensiv sind, Amantadin und Rimantadin als Adamantane starke neurologische Nebenwirkungen besitzen und das Virustatikum Oseltamivir in weniger als der Hälfte der H5N1-Infizierten wirkt ^{136 137}, und im Allgemeinen Therapeutika nur während der Einnahmedauer wirken, ist ein breitenwirksamer Impfstoff für den Menschen dringlich im Hinblick einer möglichen hochpathogenen Pandemie. Momentan in Entwicklung befinden sich noch Fusionshemmer, die auf tertiärem Butyl-Hydrochinon basieren ¹³⁸.

Parameter der Optimierung

Vektoren

Bei Influenza werden momentan verschiedene Ansätze mit den als Vektoren bezeichneten Überträgern eines Antigens oder seiner Erbinformation experimentell untersucht, mit dem gemeinsamen Ziel, einen breitenwirksamen Impfschutz gegen verschiedenste Serotypen oder wenigstens einen Schutz vor allen Viren eines Serotyps zu vermitteln, was die zugelassenen Impfstoffe nicht bieten.

Nach der Entwicklung der klassischen Impfstoffe wie Oberflächenantigene, Spaltimpfstoffe, attenuierte oder inaktivierte Viren, folgten rekombinante Proteine, synthetische Peptide und rekonstituierte virale Partikel ^{139 140}, auch „Virus-Like Particles“ (VLP) genannt, welche aufgrund der genetischen Unvollständigkeit keine Replikation von Viren und keinen Ausbruch der Krankheit mehr aufwiesen, was bei unvollständiger Spaltung oder Inaktivierung

der im Impfstoff enthaltenen Viren passieren kann. Sie enthalten keine virale RNA, stimulieren den TLR7 nicht, verbleiben extrazellulär und sind dadurch zwar weniger immunogen als attenuierte oder inaktivierte Viren, aber verträglicher. Zugelassen sind bisher als VLP-Impfstoffe beispielsweise Gardasil® als HPV-Impfstoff und Engerix® als HBV-Impfstoff. Bei den VLP zur Influenzaimpfung wird die Ektodomäne des M2 (M2e) chemisch¹⁴¹ oder genetisch⁶⁹ an das „Hepatitis-B-Virus core antigen“ (HBcAg), das HIV Gag-Protein¹⁴² das Papillomavirus E7 Antigen¹⁴³, das Papaya Mosaic Virus¹⁴⁴ oder den Bakteriophagen Q β ¹⁴⁵ gekoppelt, um die Antigenpräsentation durch eine erhöhte lokale Konzentrierung zu verbessern. Momentan sind in den USA Phase-I-Versuche (NCT00819013) mit M2e-HBcAg¹⁴⁶ abgeschlossen worden.

Reine Proteinantigene, Spaltimpfstoffe und auch VLP haben sich als ineffektiv zur Erzeugung einer zellulären Immunantwort herausgestellt^{147 148 149 150}, das gilt ebenso für synthetische Peptide und die repetitiven Epitope der „multiple antigenic peptides“ (MAP) als Immunogene¹⁵¹. Es bedarf hier wohl einer zusätzlichen zellulären Aufnahme und Prozessierung des Antigens für eine Präsentation am „Major Histocompatibility Complex I“ (MHC-I) und einer Kostimulation der Immunreaktion. Daher werden die Proteinantigene zur Steigerung der Immunantwort als Polyepitope oder „epitope strings“¹⁵² von mehreren konservierten und immunogenen Epitopen hergestellt, weiterhin als Konjugatimpfstoffe mit Immunomodulatoren oder immunogenen Proteinen (z.B. Flagellin¹⁵³, EtxB¹⁵⁴, KLH¹⁴¹, OMPC⁶⁹, CTx¹⁵¹, CTxA1¹⁵⁵, CTxB¹⁵⁶, Ubiquitin¹⁰⁸) kovalent konjugiert, oder für eine Depotwirkung verpackt in Liposomen^{157 158}, „Microspheres“ aus Chitosan oder Poly-Lactat-L-Glycolat¹⁵⁹ oder in transgenen Bakterien wie Lactobacillen¹⁶⁰, Salmonellen und *Escherichia coli*. Eine zelluläre Aufnahme des Antigens als Voraussetzung für eine TH₁-Antwort erfolgt hierbei nur auf Basalniveau. So wird nach einer klassischen Immunisierung bisher nur ein homosubtypischer Schutz vermittelt¹⁶¹, während nach einer überstandenen Infektion auch eine heterosubtypische Immunität induziert wird¹⁶².

Schließlich existieren noch die genetischen Impfstoffvektoren – wie Plasmide und virusbasierte genetische Vektoren, welche der Wirtszelle die Erbinformation und dem Immunsystem das *in situ* erzeugte, native Immunogen bereitstellen. Die genetischen Vektoren – aber auch rekombinante Protein- und synthetische Peptidimpfstoffe – bieten gerade bei hochvariablen Erregern den Vorteil, gegenüber konventionellen Impfstoffen schnell angepasst werden zu können, und somit innerhalb zweier Wochen verfügbar zu sein, also noch innerhalb des Zeitraums einer ersten pandemischen Welle. Die genetischen Impfstoffe sind allesamt apathogene, meist replikationsdefiziente Überträger der enthaltenen genetischen Information eines gewünschten Immunogens. Dieser Ansatz besitzt den Vorteil

der Transkription und Translation der Gene im Impfling mit den naturidentischen posttranslationalen Modifikationen am Immunogen, und das *in situ* erzeugte Protein liegt mit korrekter Faltung im richtigen Kompartiment vor - wie bei einer Virusinfektion. Die endogene Antigen synthese erlaubt eine zytosolische Prozessierung und eine Präsentation an MHC I, die eine T_{H1}-Immunantwort ermöglichen. Durch die komplette Gleichheit der Antigene und einer Immunantwort wie bei einer natürlichen Infektion stehen sämtliche vorhandenen Epitope auch einer Immunreaktion zur Verfügung.

Neuere, in der präklinischen oder klinischen Prüfung befindliche Konstrukte umfassen noch virale genetische Vektoren verschiedener Virenfamilien wie die Paramyxoviren „Newcastle Disease Virus“ (NDV)¹⁶³, Sendavirus¹⁶⁴, Adenoviren (AdV)¹⁶⁵, porcine Adenoviren (pAdV3)¹⁶⁶, Adeno-assoziierte Vektoren (AAV)^{167 168 169 170}, Baculoviren¹⁷¹, das Alphavirus/VEEV-Replicon^{172 173}, SFV-Replicon¹⁷⁴, das VEEV-basierte Replicon, Lentivirale Vektoren^{175 176}, Vesikulostomatitisviren (rVSV)^{177 178} sowie die aus der Pockenvirusfamilie stammenden „modified Vaccinia Ankara“ (MVA)¹⁷⁹ und NYVAC¹⁸⁰. Im Prinzip ähneln diese Vektoren den zur Gentherapie verwendeten Strategien. Sie unterscheiden sich aber grundlegend darin, dass zur Immunisierung nur eine kurzzeitige Expression der fremden Gene und eine Immunantwort dagegen induziert werden soll. Impfvektoren basieren auf apathogenen Viren mit hoher Transduktionseffizienz möglichst ohne präexistierende Immunität gegen den Vektor in der Bevölkerung, mit möglichst großer Immunogenität und Verträglichkeit pro Partikel. Potentielle genetische Vektoren findet man bei xenotropen Viren, Phagen sowie bakteriellen Plasmiden, nur muss die Transfektionseffizienz durch Anpassung der Andockproteine oder Verwendung von Zell-penetrierenden Peptiden (CPP, synonym „protein transduction domain“) gesteigert werden, bei Plasmiden kann man auch Transfektionsmethoden verwenden (siehe Adjuvantien und Immunomodulatoren).

Plasmidimpfstoffe

Plasmid-basierte Impfstoffe besitzen viele Vorteile wie niedrige Kosten, eine hohe Geschwindigkeit der Anpassung an veränderte Gensequenzen und keine Aufreinigungsverluste des nativen Immunogens durch die Biosynthese *in situ*¹⁸¹. Auch entfällt die extensive und kostspielige Reinigung großer Mengen eines in Zellkultur erzeugten Virus oder eines rekombinant exprimierten Proteins als Immunogen im Vergleich zur Plasmidaufreinigung. Die Plasmidimpfstoffe sind reine DNA-Konstrukte, mit den Vorteilen der geringen Produktionskosten für eine Plasmidisolierung aus *E.coli* durch Fermenter und „Airlift“-Reaktoren sowie einer hohen Stabilität und Lagerbarkeit. Die hohe Stabilität von

Plasmid-DNA ermöglicht weiterhin eine Verteilung von Impfstoffen ohne eine logistische Kühlkette. In der Gene Gun verwendet, erzielen Plasmidimpfstoffe auch eine hohe Reproduzierbarkeit. Plasmide von Antigenen sind beliebig modular kombinierfähig mit Plasmiden von Immunomodulatoren, welche ohne zusätzlichen Arbeitsaufwand gemeinsam verimpft werden können.

Zudem erfolgt bei genetischen Impfstoffen die *in situ* Erzeugung der Genprodukte durch die bei der Impfung transfizierten Wirtszellen, wodurch die native Konformation des Immunogens einschließlich aller posttranslationalen Modifikationen ohne Löslichkeitsprobleme im richtigen Kompartiment gesichert ist. Durch die Lokalisation im richtigen Kompartiment wird sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort erzeugt.

Ein Plasmid hat im Gegensatz zu viralen Vektoren den weiteren Vorteil, dass nur gewünschte Antigene exprimiert werden. Somit gibt es keine Vektorimmunität, welche die Immunantwort vom Antigen hin zu Vektorbestandteilen ablenkt. Das führt zwangsläufig bei viralen Vektoren zu einem Prime-Boost-Schema mit zwei verschiedenen, einmal-verwendbaren Vektorsystemen, während Plasmide auch wiederholt verabreicht werden können. Plasmide können nicht nur einzelne Impfgene enthalten, sondern ermöglichen auch die Erzeugung von VLP im Impfling, erreicht wurde so bereits ein Impfschutz vor H7N1¹⁸². Eine Produktion von vollständigen infektiösen Influenzaviren nach gemeinsamer Transfektion von Plasmiden codierend für Influenzagene und einem vRNA-codierenden Plasmid wurde entwickelt, um Influenzaviren per zielgerichteter Mutagenese genetisch manipulieren zu können oder neue Reassortanten zu erzeugen^{183 184}. Dies erlaubt eine gezielte Anpassung von Impfstämmen für die konventionelle Herstellung von Influenzaimpfstoffen.

Die DNA wird im Impfling nicht repliziert, sie unterliegt keinem „antigenic drift“ wie Influenzaviren (und andere RNA-basierte Viren) und integriert nicht in das Wirtsgenom, sie kann im Gegensatz zu den attenuierten Impfstoffen auch nicht zum Pathogen revertieren. Es gibt auch – außer bei Patienten mit systemischem Lupus erythematosus – keine bereits bestehende Immunantwort gegen ein Plasmid, was zu einer Eliminierung des Impfstoffes führen kann, bevor es zur Expression kommt. DNA wird nicht an MHC präsentiert und ist deshalb auch wenig immunogen.

Momentan befinden sich Plasmid-basierte Impfstoffe gegen saisonale Influenza in Phase-II-Studien in Großbritannien¹⁸⁵ und den USA (NCT00709800, NCT00489931, NCT00408109). Diese Plasmide werden parallel in weiteren Studien auch nadelfrei per Vapor-Gasdruckinjektion mit dem Biojector 2000® verabreicht (NCT00694213 und NCT00776711). Auch HIV-Plasmidimpfstoffe befinden sich in Phase I¹⁸⁶. DNA-basierte

Vektoren sind auch als Mediatoren einer anti-Tumor-Immunität beschrieben worden ¹⁸⁷ und PSA- ¹⁸⁸ und PSMA- exprimierende ¹⁸⁹ Plasmide befinden sich momentan in klinischen Phase-I/II-Studien.

Applikationsroute & Ort

Es gibt inzwischen vielfältige Applikationsrouten und –vektoren. Für die Injektion haben sich aufgrund der Sicherheit und Wirksamkeit die intramuskuläre und subkutane gegenüber der intravenösen Injektion durchgesetzt. Zum Einen werden die Antigene mit maximaler Einfachheit in Nähe der Lymphknoten appliziert unter Umgehung des Abbaus in der Leber, andererseits wird der systemischen Ausbreitung einer möglichen Überreaktion wie z.B. eines anaphylaktischen Schocks über den Blutkreislauf vermieden.

Schonende Routen werden genutzt, wenn eine mit der i.m. Injektion vergleichbare Immunantwort erreicht werden kann. Schluckimpfungen scheitern meistens am Abbau im Magen und Darm, eine Ausnahme bildet die Impfung gegen Polio bei Menschen mit attenuierten Viren, die aus Gründen einer möglichen Reversion, lebensgefährdender Infektionsverläufe bei immungeschwächten Menschen und mangelnder Resorption des Impfstoffs während einer Magen-Darm-Erkrankung oder bei der Einnahme von Antibiotika in Deutschland nicht mehr eingesetzt wird.

Reine Plasmid-DNA wird nur ineffizient von eukaryotischen Zellen aufgenommen, weshalb ohne einen Zusatz von Wirkungsverstärkern bei einer Maus von circa 25 g durchschnittlich 80 µg Plasmid-DNA injiziert werden, beim Menschen steigt die notwendige Dosis auf 1 mg zur Induktion einer vergleichbaren Immunantwort (Phase-I-Studie NCT00709800). Mittels verschiedener Methoden der Transfektion werden deutliche Dosissenkungen und Kosteneinsparungen erreicht. Neuere Entwicklungen mit vermutlich höherer Akzeptanz in der Bevölkerung als die Injektion umfassen Nasensprays (FluMist®), inhalative Aerosole, mucosale Transfektion ^{190 191}, Hydrogelpflaster ¹⁹² und die Bioballistik (GeneGun®, Powderject®). Weniger schonende Routen wie Electroporation *in vivo* ^{193 194}, Nadelreihen ^{195 196 197}, Tätowiermaschinen, Microporation durch Hitzeverdampfung der Haut ¹⁹⁸ und die Entfernung der Epidermis ^{199 200} durch Abreißen eines Aufklebers mit Sekundenkleber haben dagegen weniger Potenzial zur Marktreife.

Die Gene Gun® von BioRad und auch das Powderject® von Novartis verwenden die als „particle bombardment“, „Biolistic Transfection“ oder Aerosol-Gasdruckinjektion bekannt

gewordene Methode zur Applikation von DNA *in vivo*, welche 1987 von Klein ²⁰¹ ²⁰² zur Herstellung transgener Pflanzen erfunden und in den folgenden Jahren für die Anwendung an Tieren adaptiert wurde ²⁰³, nachfolgend auch zu Impfzwecken ²⁰⁴. Hierbei werden DNA-beschichtete Goldpartikel von circa 1 µm Durchmesser durch einen Helium-Puls von 300 bis 600 Psi in die Haut eingebracht. Notwendig ist hierbei die Verwendung von Promotoren, die eine Expression in antigen-präsentierenden Zellen wie den Epidermalzellen, Fibroblasten und vor allem Langerhansschen Zellen (LDC) der Haut erlauben. Diese Methode verspricht eine der intramuskulären Injektion überlegene Immunstimulation durch lokale Stimulation der Langerhansschen Zellen, einer Subpopulation der dendritischen Zellen, bei einer 100-fach niedrigeren Impfdosis ²⁰⁵. Die Direktion der Immunantwort in Richtung humoraler oder zellulärer Immunität erfolgt bei der Gene Gun eher zu Gunsten einer T_{H1}-vermittelten zellulären Antwort im Vergleich zur intramuskulären Injektion ²⁰⁶. Dies liegt möglicherweise an der niedrigeren Impfdosis ²⁰⁷, es konnten nach einer Gene-Gun-Immunisierung aber auch antigen-spezifische B-Zellen zur Produktion von Hybridomata mit hoher Effizienz gewonnen werden ²⁰⁸. Die Methode weist zudem im Kontrast zur Injektion eine hohe Reproduzierbarkeit der Induktion sowohl der zellulären als auch der humoralen Immunantwort auf ²⁰⁹, ohne das Risiko der Übertragung von Infektionskrankheiten durch Mehrfachnutzungen. Der Aerosol-Partikelbeschuss einer GeneGun® induziert die stärkste Immunantwort ²¹⁰ ²¹¹ im Vergleich zur ebenfalls nadelfreien Gasdruckinjektion von Flüssigkeiten per Biojector2000® oder der klassischen i.m. Injektion. In der Veterinärmedizin werden als weitere Alternativen zum Biojector2000® noch JetInjection®, BioWare Gene Gun®, Dermojet®, Jet2000®, Lectrajet® und MIT-V® verwendet.

Eine weitere Möglichkeit der Einbringung von Plasmiden ist die Permeabilisierung der Haut mit Dimethylsulfoxid (DMSO) durch eine DNA-DMSO-Lösung, was eine mucosale Immunität, aber kaum Immunoglobulin G als Teil der systemischen Immunität induziert ²¹².

Applikationszeitplan

Ziel der Impfstoffentwicklung ist es, bereits nach einer Immunisierung einen Impfschutz zu bieten. Um neue, potentielle Gene zu finden, werden meist von Beginn an zwei Immunisierungen angesetzt, um deutlichere Unterschiede der Immunantwort zu messen. Die Reifung von T- und B-Zellen nach Antigenkontakt dauert 5-8 Tage. Nach diesem zwischenzeitlichen Maximum fällt über die folgenden Wochen die Konzentration der Antigen-spezifischen Zellen, bis nach einem Monat die Gedächtniszellen den Großteil der Population an spezifischen Zellen ausmachen. Daher liegen meistens zwei bis vier Wochen zwischen

erster und zweiter Immunisierung, also zwischen Prime und Boost, um die Antigen-spezifischen Gedächtniszellen gezielt zu stimulieren und ein Minimum an Zeit zu verlieren.

Genetische Parameter

Genetische Regulationselemente können bei Plasmiden die Expression weiter steigern. Die Wahl des Promotors und Enhancers definiert Menge und Gewebsspezifität der Expression des Immunogens. Aufgrund seiner hohen Expressionstärke und der ubiquitären Expression fällt die Wahl meist auf CMV^{213 214}, Metallothionein, CAG²¹⁵ oder Hybride^{216 217}. Für eine auf dendritische Zellen begrenzte Expression kann der Fascin-Promotor eingesetzt werden²¹⁸. Die früher zur Expression in Säugern verwendeten Promotoren von RSV²¹⁹ und SV40^{220 221} haben sich als onkogen erwiesen.

Für DNA-Immunisierungsversuche am Menschen wird von behördlicher Seite erwartet, die zur Produktion der Plasmide in *E.coli* eingesetzten Selektionsmarker wie eine Ampicillinresistenz, Neomycin-Phosphotransferase oder Kanamycinresistenz zu entfernen, um Resistenztransfers zur bakteriellen Flora des Menschen zu vermeiden. Als Selektionsmarker in der Plasmidproduktion sind Auxotrophien²²² dagegen prinzipiell erlaubt. Eine weitere Möglichkeit ist eine induzierte homologe Rekombination des Plasmids in *E.coli* zur Entfernung von Replikationsursprung, Resistenzgenen und Membran-Anheftungssequenzen, was zu kurzen ringförmigen Expressionskassetten führt, die als „minicircles“²²³ weniger inflammatorische Wirkungen und eine verbesserte Kernlokalisierung der DNA und somit eine verbesserte Transfektionseffizienz erzielen können. Der Kernimport der DNA kann durch Einfügen von Sequenzen zusätzlich gesteigert werden, die von Kernimportproteinen gebunden werden^{224 225}.

Die Verwendung einer „Hogness-Box“ aus CCAAT- und TATAAA-Motiv bei etwa 75 und 25 Nukleotiden (nt) respektive innerhalb des Promoters vor dem Transkriptionsbeginn ATG führt zu einer effizienten Bindung von der Transkriptionsfaktoren CTF und TFIID²²⁶ und zu einer erhöhten mRNA-Konzentration, die in vermehrter Translation und Expression resultiert. Alternativ kann eine „GC-Box“ zur Bindung von Sp1, AP2 und CREB für eine gewebsspezifische Transkription verwendet werden²²⁷.

Die Vermeidung von AUUUA-Sequenzen erhöht die Halbwertszeit der mRNA bei der Degradation^{228 229}, was ebenfalls zu erhöhten mRNA-Konzentrationen führt^{230 231}. Im

Gegensatz dazu erhöht eine Polyadeninsequenz („polyA tail“) circa 11-30nt nach der Sequenz AAUAAA am 3'-Ende der mRNA den Kernexport und die Stabilität²³².

Zur Termination der Transkription wird meist der Terminator des bovinen Wachstumshormons (bGH)²³³ verwendet. Eine als Kozak-Sequenz bekannte Nukleotidfolge GCCGCC(A/G)CCAUGG²³⁴, erlaubt eine effizientere Initiation der Translation und dadurch erhöhte Expressionsraten²³⁵, AUG repräsentiert hierbei das Start-Methionin des Immunogens.

Unmethylierte CpG-Motive kommen ausschließlich in bakterieller DNA vor. Dieses Pathogen-assoziierte Motiv bindet an den TLR9 und aktiviert Immunzellen^{236 237 238} und kommt zweimal in der Ampicillinresistenz verwendeter Plasmide vor²³⁹.

Der hier verwendete Impfvektor pTH²⁴⁰ basiert auf dem Vektor pCMV mit einem Cytomegalievirus-immediate/early-Promotor²⁴¹, gefolgt von einer „Multiple Cloning Site“ mit Kozak-Sequenz und dem Polyadenylierungssignal des Rinderwachstumshormons (bGH). Weiterhin trägt das Plasmid einen prokaryotischen Replikationsursprung (ori) und ein beta-Lactamase-Operon (bla), welches eine Ampicillinresistenz vermittelt. Die Expression des Immunogens erfolgt transient in Säugerzellen, während eine Replikation des Plasmids durch den prokaryotischen Replikationsursprung auf *E.coli* und andere Gram-negative Bakterien begrenzt ist. Zur Detektion der Expression mittels kommerzieller Antikörper wurde die Immunogene als Fusionsproteine mit einem C-terminalen V5-Epitop (synonym Pk-Tag) konstruiert, welches aus dem N- und P-Protein des Paramyxovirus SV5 stammt.

Codon-Optimierung

Die Codon-Optimierung wurde erstmals von Haas et al.²⁴² experimentell durchgeführt, nach einer Auswahl der am stärksten exprimierten humanen Gene aus allen bekannten humanen Genen und einer statistischen Analyse ihrer Codon-Nutzung aus einer Datenbank der speziesbezogenen Codon-Nutzung^{243 244}. Jede Aminosäure außer Methionin und Tryptophan besitzt mehrere Codons, die ungleich sind bezüglich der Häufigkeit der verschiedenen tRNAs, deren Kinetik in der Translation²⁴⁵ und sich in der Spezifität ihrer tRNA sowohl zur mRNA Sequenz als auch zur Aminosäure unterscheiden – was als Isoakzeptanz bezeichnet wird und sich auf die Fehlerrate der Translation auswirkt²⁴⁶. Die darauf aufbauende ausschliessliche Verwendung der speziesbezogen am stärksten exprimierten Codons für jede Aminosäure in einer DNA-Sequenz kann zu deutlich höheren

Expressionsraten des Proteins führen. Das empfiehlt sich bei jeder artfremden Expression – oder bei viralen Proteinen, bei denen eine geringe Expression zur Vermeidung einer Immunantwort von Vorteil ist. Im Zuge der Codon-Optimierung werden außerdem unerwünschte regulatorische DNA-Sequenzen eliminiert, wovon insbesondere virale Proteine betroffen sind ^{247 248}.

In der Praxis werden die Codons der DNA-Sequenz unter Erhalt der Aminosäuresequenz gegen die 20 expressionsstärksten Codons ausgetauscht. Dies erfordert Methoden zur Konstruktion synthetischer Gene, denn es gibt keine natürlichen Vorlagen. Hier bietet sich die Fusions PCR oder die Ligation per Festphasensynthese an. Bei der Fusions-PCR werden die bestellten Oligonukleotide als 50-mere mit einer Überlappung von 25 Basen mit den komplementären Strängen in PCR-verwandten Reaktionen zusammengeführt und ligiert.

Tabelle 2 – Codontabelle maximaler Expression bei Menschen ²⁴⁹

Humane Codons maximaler Expression					
Ala	A	GCC	Leu	L	CTG
Arg	R	CGC	Lys	K	AAG
Asn	N	AAC	Phe	F	TTC
Asp	D	GAC	Pro	P	CCC
Cys	C	TGC	Ser	S	AGC
Gln	Q	CAG	Thr	T	ACC
Glu	E	GAG	Tyr	Y	TAC
Gly	G	GGC	Val	V	GTG
His	H	CAC	Met	M (invariant)	ATG
Ile	I	ATT	Trp	W (invariant)	TGG

Biochemische Parameter

Das Immunogen selbst kann durch Veränderungen der DNA- oder Proteinsequenz in seiner Immunogenität modifiziert werden.

Eine Veränderung der zellulären Zielkompartimente und eine Verbesserung der Antigen-Präsentation an MHC kann durch eine ER-Signalsequenz wie die C-terminale KDEL-Sequenz mit einer verbesserten Präsentation an MHC-II und einer verstärkten T_{H2}-Antwort

erreicht werden. Eine Entfernung der Signalsequenzen führt zu einer cytosolischen Lokalisation und dirigiert die Immunantwort eher in Richtung einer T_{H1}-Antwort.

Eine verstärkte Peptidpräsentation an MHC kann durch Ubiquitin-Fusionsproteine¹⁰⁸ erreicht werden, was zu beschleunigtem Abbau des Immunogens im Proteasom und eine lokale Erhöhung der Epitop-Konzentration führen kann.

Im Zuge eines Epitop-Designs können Epitope hinsichtlich einer verbesserten MHC-Bindungsaffinität mutiert werden. Dies verbessert zwar die gemessene Immunantwort nach Impfungen, induziert aber aufgrund der verringerten Ähnlichkeit zum analogen Epitop im Erreger eine niedrigere Avidität des T-Zell-Rezeptors (TCR) und somit im Vergleich zu identischen Epitopen eine verlangsamte Rekonvaleszenz nach einer Infektion. Ein Austausch zwischen Impfung und Infektion von nur einer Aminosäure innerhalb eines dominanten Epitops für zytotoxische T-Zellen kann den darauf basierenden Schutz aufheben^{250 251 252}.

Eine Demaskierung von Epitopen kann durch die Entfernung der Glycosylierungen des Immunogens erreicht werden, da Kohlenhydratseitenketten die proteolytische Prozessierung des Immunogens inhibieren und, aufgrund des fehlenden Repertoires an Immunglobulinen dagegen, Toleranz-induzierend wirken können.

Membranankersequenzen und Lipidmodifikationen am Immunogen können zur Erhöhung der Löslichkeit bei rekombinanten Proteinen und synthetischen Peptiden entfernt werden, um den Aufreinigungsverlust durch „inclusion bodies“ bei der *ex vivo* Erzeugung der Immunogene zu minimieren, bergen aber durch die verringerte Ähnlichkeit zum natürlichen Antigen die Gefahr, gegen ein Artefakt zu immunisieren.

Eine Multimerisierung und Membranassoziation des Immunogens durch Kopplung an Fibrin-Trimerisierungsdomänen, C3d²⁵³, Leucinzipper²⁵⁴ oder anderen multimerisierenden Transmembrandomänen kann bei Membranprotein-assoziierten Proteinen verstärkt Antikörper gegen Konformationsepitope von Multimer-Komplexen induzieren. Gleiches lässt sich generell bei einer zusätzlichen Verwendung einer Signalsequenz der Sekretion bzw. des Imports in das endoplasmatische Retikulum für cytosolische Proteine anwenden. Hierdurch kann eine Präsentation des Proteins auf der Zelloberfläche für die Induktion T-Zell-unabhängiger Antikörper gegen Konformationsepitope oder nicht an MHC bindende Sequenzepitope erreicht werden. Bei der Ektodomäne des M2 erweitert dies das Spektrum der neutralisierenden Antikörper²⁵⁵.

Weiterhin gelten für genetische Vektoren die gleichen Möglichkeiten der Erzeugung von Fusionsproteinen wie sie auch für rekombinante Proteinvakzine bestehen, mit einem Spektrum an Adjuvantien, MAP und Polyepitopen (siehe Vektoren).

Monogenische und vielmehr monoepitopische Ansätze vermeiden die Verwendung immunodominanter Epitope eines Erregers zu Gunsten von konservierten subdominanten Epitopen, die eine breitenwirksame Reduktion der Viruslast vermitteln können. Sie besitzen aber den Nachteil, dass der immunologische Selektionsdruck nur auf ein Gen oder sogar ein Epitop begrenzt ist, was die Ausbildung von Fluchtmutanten erleichtert.

Adjuvantien und Immunomodulatoren

Die Steigerung einer Impfreaktion kann durch Zusatz von Adjuvantien (Wirkungsverstärkern) zur Impfstoff-Formulierung erreicht werden. Gleichzeitig kann auch die Antigenmenge pro Impfdosis reduziert werden, was zu Kostenersparnissen führt, da das Antigen meistens den kostenintensivsten Teil der Produktionskette darstellt. Die beiden in Europa zugelassenen Adjuvantien sind Aluminiumhydroxidphosphat-Gele und Squalen. Letzteres wird unter den Markennamen AS03® oder MF59® vertrieben und wurde im Zusammenhang mit den Schweinegrippeimpfstoffen kontrovers diskutiert, da Berichte über das Auftreten von Anti-Squalen-Antikörpern und „Gulf War Syndrom“ im Zusammenhang mit experimentellen Anthrax-Impfstoffen bei US-Soldaten existieren^{256 257}, die zwar nachfolgend entkräftet wurden, aber bisher nur von Herstellerseite und US-Militär^{258 259 260}. Andere Publikationen verdächtigen dagegen eher Aluminiumhydroxidphosphat^{261 262} als neurotoxisch, vermutlich aufgrund seiner proinflammatorischen Eigenschaften²⁶³.

Die experimentellen Adjuvantien umfassen Gene und Proteine von verschiedenen Cytokinen und Chemokinen, zur Verbesserung der Antigenpräsentation und Rekrutierung von Immunzellen an den Impfort, neben Kostimulatoren der Immunreaktion und TLR-Agonisten. Weitläufig verwendet werden der „Granulocyte and Monocyte colony stimulating factor“ (GM-CSF), Interleukin-12 (IL-12)²⁶⁴, Cytosin-Phospho-Guanosin-Motive (CpG), und CD40L²⁶⁵.

GM-CSF ist ein sezerniertes, dreifach glykosyliertes, homodimeres Protein von 2 * 16,3 KDa, welches Wachstum und Differenzierung von Granulozyten, Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen, Eosinophile und Erythrocyten über den Syndecan-2-Weg stimuliert. Dies führt zu einer Verstärkung der Antigen-Prozessierung und -Präsentation durch diese Zellen, was in erhöhten Antikörpertitern und CTL-Konzentrationen resultiert²⁶⁶.

Interleukin-12 ist ein sezerniertes, glycosyliertes heterodimeres Protein von 24,2 + 38,2 KDa, welche nach ihrer elektrophoretischen Mobilität unter denaturierenden reduzierenden Bedingungen p35 und p40 genannt werden. Il-12 stimuliert aktivierte T- und NK-Zellen über den JAK/STAT-Weg und fördert die Sekretion von IFN- γ durch periphere Blut-Monozyten ²⁶⁷.

Plasmid-DNA (pDNA) ist nach Entfernung der Endotoxine - vor allem Lipopolysaccharide - aus der bakteriellen Kultur beim Impfen gut verträglich und zugleich adjuvant durch die enthaltenen immunstimulierenden CpG-Motive ²⁶⁸. Gegen die pDNA kann eine vorübergehende dreifache Erhöhung von Antikörpern gegen DNA induziert werden, ohne zu den typischen Symptomen (wie Glomerulonephritis) eines systemischen Lupus erythematosus zu führen, auch wurde nach einer Injektion von pDNA in Muskelgewebe keine Myositis gefunden ²⁶⁹. Zudem wird pDNA auch für toleranz-induzierende Immunogene bei präexistenten Autoimmunerkrankungen eingesetzt, ohne eine Verschlimmerung der Symptome zu beobachten ^{270 271}. Das verbliebene bakterielle Lipopolysaccharid (LPS) sorgt vermutlich für eine Kostimulation der Immunreaktion ²⁷⁵, liegt aber in der Regel unter der murinen Stimulationsgrenze für seinen Rezeptor, den „Toll-like Receptor 4“ (TLR4).

Die Verwendung von Plasmiden als Expressionsvektoren für Antigene induziert oftmals eine T_{H1}-vermittelte Immunreaktion, aufgrund einer MHC-I-Präsentation der endogen erzeugten Antigene und einer Aktivierung des „Toll-like Receptor 9“ ²⁷² auf dendritischen Zellen durch die im Plasmid auftretenden CpG-Motive ^{273 274}. Diese Kostimulation ist hilfreich, aber nicht notwendig zur Erzeugung einer zellulären Immunantwort, da sich – wenn auch mit geringerer Rate und in geringerem Ausmaß - in TLR9-defizienten Mäusen nach Plasmid-Immunsierung nichtsdestotrotz CTL entwickeln und unabhängig davon auch Plasmide ohne spezifische CpG-Motive nach Impfung in C57Bl/6-Mäuse spezifische CTL induzieren konnten ²⁷⁵. CpG-Konstrukte und andere TLR-Agonisten wurden auch schon als Adjuvans ^{276 277} oder allein zur Immuntherapie ⁴² gegen Influenza verwendet. CpG-Oligonukleotide führen durch die Aktivierung der TLR9 zu einer umfangreicheren Aktivierung von dendritischen Zellen als die Aktivierung des TLR7 mit viraler RNA von Influenza ²⁷⁸.

Eine weitere Verstärkung der Immunreaktion nach einer Plasmidimmunsierung besteht in einer Zugabe von kationischen Lipiden oder kationischen Polymeren zur Steigerung der zellulären Aufnahme der DNA, welche als gelöste Nukleotidpolymere polyanionisch sind und polykationische Moleküle binden. Ist die Nettoladung des Komplexes positiv, bindet er an die überwiegend negativ geladene Zellmembran und wird verstärkt von der Zelle aufgenommen.

Die liposomale Transfektion (z.B. Ref. ²⁷⁹, Phase-I-Studien von Vical®) verwendet kationische Lipide zur Bildung von Liposomen, welche vermutlich nach Endozytose eine

Schwellung durch die hohe lokale Ionenstärke und die nachfolgende Hydratation induzieren, anschließend mit der lysosomalen Membran fusionieren und schließlich die DNA ins Cytosol freisetzt.

Kationische Polymere von circa 20-50 KDa führen vermutlich nur zu einer Ruptur des Lysosoms nach einer Schwellung^{280 281}. Aufgrund ihrer Polarität (oder Hydrophilie) können sie nicht mit der Membran fusionieren. Die kationischen Polymere wie Polyethylenimin (PEI)²⁸², Polyvinylpyrrolidon (PVP), Chitosan-Derivate²⁸³ oder Poly-L-Lysin (PLL)²⁸⁴ mit Histidin-Termini²⁸¹ oder Kombinationen davon²⁸⁵ bilden im Gegensatz zu den kationischen Liposomen Alkohol-unlösliche Aggregate, die sowohl flüssig als auch trocken verabreicht werden können und sich somit für eine Aerosol-Gasdruckinjektion mittels eines biobalistischen Verfahrens (GeneGun®, Powderject®) eignen. Die GeneGun® verwendet als kationische Polymere Spermidin zur Kompaktierung und Adsorption der DNA an der Goldoberfläche, sowie PVP zur Beschichtung der Gold-Spermidin-DNA-Aggregate mit positiven Ladungen.

Während kationische Polymere aufgrund der geringeren Partikelgröße und der positiven Ladung eher durch die Kernporen ($d = 25 \text{ nm}$)²⁸⁶ in den Kern importiert werden, wird liposomal transfizierte DNA aufgrund der geringeren Maskierung stärker transkribiert²⁸⁷.

Rezeptorspezifische Transfektionsmethoden werden versucht, um die Verteilung an die Zielorgane nach Injektion steuern zu können und einen Abbau in der Leber oder eine Ausscheidung über die Niere zu vermeiden. Die Verwendung von den auch als „protein transduction domains“ oder „fusogenic peptides“ bekannt gewordenen Zell-penetrierenden Peptiden (CPP) erlaubt einen effizienteren Transfer der DNA ins Cytosol durch Bindung an die negativ geladene Zelloberfläche und an der endosomalen Membran sowie anschließender Fusion²⁸⁸, mehr noch in Kombinationen mit Lipiden, kationischen Polymeren oder Fusionspeptiden für eine verbesserte Passage der endosomalen Membran. Beispiele für CPP sind das HIV-Tat-Peptid 48-60²⁸⁹, HIV-Rev-Peptid 24-50²⁹⁰, HTLV-II-Rex-Peptid 4-16²⁹⁰, BMV Gag-Peptid 7-20²⁹⁰, Penetratin, Flock House Virus Coat Protein 35-49²⁹⁰ und Polyarginine der Länge 6-8^{290 291 292}. Die Zell-penetrierenden Peptide sind aufgrund ihres Arginin-Reichtums anfällig für Proteasen^{293 294}. Durch Verwendung von D-Aminosäuren könnte dieses Problem reduziert werden^{295 290}. Diese Alternative impliziert aber eine Festphasensynthese der Peptide und verhindert eine kostengünstige Proteinerzeugung per Gentechnik im Fermenter.

Die Endosomen-permeabilisierenden Fusionspeptide HA2^{296 291} und INF7 aus dem Influenza-Hämagglutinin, das (LAEL)₃-Peptid²⁹⁷ und Polyhistidine²⁹⁸ verstärken zusätzlich

die endosomale Freisetzung und werden in Kombination mit CPP eingesetzt. Oftmals werden „spacer“ genannte Abstandshalter aus Polyethylenglykol (PEG) eingefügt, um das Peptid zugänglicher zu machen oder die unspezifische Adsorption des Komplexes im Organismus zu verringern.

Die kombinatorischen Ansätze zur Steigerung der Transfektionseffizienz *in vivo* umfassen z.B. das Transferrin-Poly-L-Lysin+HA2peptid-PolyLysin+HA2-Peptid+pDNA²⁹⁹ oder TAT-PEG-PEI+DNA^{300 301}. Bei kationischen Lipiden und seinen zwitterionischen und anionischen Colipiden wie Diolel-Phosphatidyl-Ethanolamin (DOPE) und Cholesterol-Hemisuccinat (CHS) werden Ansätze wie Tat-PEG-DOPE+PEG-DOPE³⁰² mit saurer Hydrolyse des PEG im Endosom³⁰³, PEG-DOPE+PEI-DNA³⁰⁴, Peptid-PEG-DOPE+DNA mit proteolytischer Abspaltung des PEG im Endosom³⁰⁵ oder durch Verpackung in tetralamellaren Vesikeln³⁰⁶ untersucht.

Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung, Erzeugung und Charakterisierung von breitenwirksamen Plasmid-basierten GeneGun-Impfstoffen gegen das Influenza A Virus vom Subtyp H5N1. Es gibt bisher keinen Grippeimpfstoff, der zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) gegen codon-optimierte hochkonservierte H5N1-Influenzagene induziert. Es gibt auch keinen Grippeimpfstoff, der breitenwirksam auch vor der Vogelgrippe schützt, wodurch sich jährliche Impfstoffzusammenstellungen erübrigen könnten.

Die Impfstoffe wurden in codon-optimierter Form *de novo* erzeugt, in ein Plasmid kloniert und in Zellkultur nach Transfektion wurde die Expressionsstärke mit den klonierten Genen des Wildtyps verglichen. Die Immunantwort wurde untersucht, um Korrelate für einen Impfschutz vor einer Infektion zu bestimmen.

In der ersten Impfreihe wurde die Impfwirkung einzelner codon-optimierter und Wildtyp-Gene im Vergleich mit einer polygenen Immunisierung untersucht. Weiterhin wurden für die zweite Impfreihe immunomodulatorische Gene erzeugt und in verschiedenen Kombinationen mit dem polygenen Impfstoff angewendet. In der dritten Versuchsrunde wurde die Impfreaktion in zwei unterschiedlichen Mausstämmen, C57Bl/6 und Balb/c, verglichen.

Beginnend mit der vierten Impfsreihe wurden Belastungsexperimente mit Influenzaviren nach einer Immunisierung mit Immunomodulatoren durchgeführt, zuerst mit 5 LD₅₀ von drei unterschiedlichen Influenzastämmen – H5N1 A/Vietnam/1194/04 (autologe Belastung), H5N1 A/Germany/R65/06 (homosubtypische Belastung) und H1N1 A/PuertoRico/8/34 (heterosubtypische Belastung). Die fünfte Impfsreihe charakterisierte die Wirkung einer Impfdosissteigerung bei Belastungssteigerung mit 50 LD₅₀ von zwei H5N1-Stämmen – A/Vietnam/1194/04 und A/Germany/R65/06. Die sechste Reihe bestand aus Einzelgenimmunisierungen mit Belastung durch 10 LD₅₀ des heterologen Stammes (A/Germany/R65/06) zur Bestimmung der protektiven Komponente in der zuvor verwendeten polygenen Impfstoffkombination.

Abschließend wurden als Transfer der gewonnenen Erkenntnisse Impfstoffe auf Grundlage der pandemischen, ursprünglich porcinen H1N1-Influenza in Codon-optimierter Form entwickelt. Daraufhin wurden die Vakzine in Zellkultur auf Expression untersucht und als siebte Impfreihe in Mäusen eingesetzt, um Schutz vor Belastung mit 10 LD₅₀ der H1N1-Influenza (A/PuertoRico/8/34) zu erzielen.

Material und Methoden

Die verwendeten Peptide, Primer, Zellkulturen und Antikörper sowie die Abbruchkriterien sind im Anhang aufgeführt. Für weiterführende Informationen zu den Methoden, siehe ³⁰⁷. Bearbeitungen von DNA- oder Proteinsequenzen wurden mit dem Programm BioEdit durchgeführt. Die Texte, Tabellen und Graphen wurden mit Microsoft Office 2007 erstellt. Literaturrecherchen erfolgten im Internet bei Entrez PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed>).

Die Datenbankrecherchen erfolgten über Expasy (<http://expasy.org>) oder Influenza Research Database (<http://www.fludb.org/brc/home.do?decorator=influenza>).

Konstruktion der Gene

Die „Fusion Polymerase Chain Reaction“ (Fusion-PCR) ^{308 309} ist eine PCR-basierte Methode ³¹⁰ zur gezielten Konstruktion synthetischer Gene aus Oligonukleotiden, welche zuvor per Festphasensynthese erzeugt wurden. Die Fusion-PCR verwendet das Overlap-Extension-Prinzip ³¹¹, bei dem überlappende Oligonukleotide in einer PCR sich gegenseitig als Primer dienen. Die codon-optimierten Gensequenzen von M2, NP und IL-21 wurden jeweils mit einem C-terminalen V5-Tag und einer BamHI-Schnittstelle sowie mit einer N-terminalen HindIII-Schnittstelle erweitert. Diese Sequenzen wurden *in silico* in je 50-mere mit einer Überlappung von jeweils 25 Basen mit den angrenzenden komplementären Strängen zerlegt (Sequenzen im Anhang) und bei Invitrogen als entsalzte Oligonukleotide bestellt.

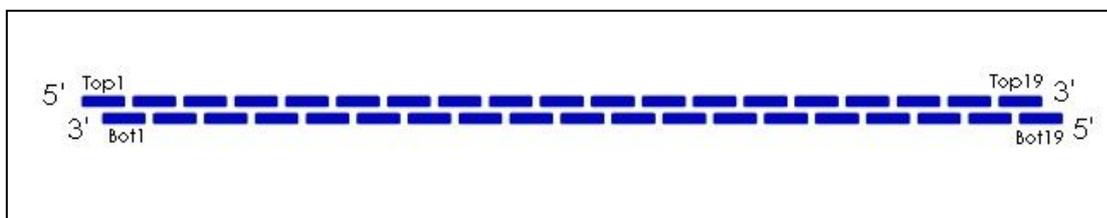


Abbildung 3 – schematische Darstellung der 50-mere

Die entsalzten und lyophilisierten Oligonukleotide wurden mit DNase-freiem Aq.dest. auf 100µM eingestellt und für jeden Strang eine Mischung von jeweils 200pmol der verschiedenen Oligonukleotide hergestellt. In der ersten PCR-Runde werden Ansätze aus jedem komplementären sense (genannt Top) und antisense (genannt Bot) Oligonukleotid angesetzt, und nach „Touchdown-PCR“ per Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Alle

weiteren PCR nutzten Standardbedingungen. In der zweiten Runde wurden jeweils 1 µl aus 3 PCR-Ansätzen der ersten Runde von aneinander angrenzenden Oligonukleotiden in einer zweiten PCR-Runde vereint und anschliessend per Agarose-Gelelektrophorese überprüft. In der dritten Runde wurde aus je einem Mikroliter von zwei in der Sequenz benachbarten Ansätzen ein Fusionsprodukt von circa 240 bp hergestellt und per Gelelektrophorese dargestellt. In der vierten Runde wurden alle Ansätze der dritten Runde zur finalen Fusions-PCR vereint und per Gelelektrophorese nachgewiesen. Alle Reaktionen wurden im Thermocycler Flexcycler von Analytik Jena parallel sowohl mit einer Taq- als auch mit einer Pfu-Polymerase oder einer Mischung von beiden (Taq:Pfu 16:1) ³¹² durchgeführt. Die Bande des vermuteten Gens wurde aus dem Gel ausgeschnitten und per Gelextraktionskit von Qiagen extrahiert. Die DNA wurde in den pCR4-Topo-Vektor von Invitrogen nach Angaben des Herstellers ligiert. Die Codon-optimierten Konstrukte H5co, M1co und H1cosw, M1cosw und NPcosw wurden von GeneArt® basierend auf den Stämmen A/VietNam/1194/2004 (Bezeichnung co) und A/MexikoCity/4603/2009 (Bezeichnung cosw) erzeugt.

Tabelle 3 – PCR-Ansatz der Fusions-PCR

Pipettierschema	Fusions PCR	Temperaturprofil	Touchdown	Zyklus
Top-Oligonukleotid	1 µl	120 sek.	95°C	1
Bot- Oligonukleotid	1 µl	15 sek.	95°C	2-21
dNTP	1 µl	20 sek.	70°C -0,5°C/Zyklus	2-21
Taq-Puffer	2,5 µl	20 sek.	95°C	22-50
Taq-Polymerase	1 µl	20 sek.	58°C	22-50
Aq.dest.	ad 25 µl	90 sek.	72°C	22-50
		600 sek.	72°C	51
		Unendlich	4°C	51

Erzeugung der Gene per „Gradient-cycle PCR“

Die „Gradient-cycle PCR“ (GCPCR) ist eine im Verlauf dieser Arbeit entwickelte Variante der Fusions-PCR, bei der ebenfalls alle Fusionen simultan im selben Reaktor ablaufen. Hierbei werden alle Oligonukleotide in der ersten Runde vereint, mit Dimethylsulfoxid (6% Endkonzentration) ^{313 314 315} zur Denaturierung der DNA versetzt und in jedem PCR-Zyklus wird ein Temperaturgradient von 0,2°C/sek. angelegt. Der Gradient beginnt nach der Schmelzphase bei 95°C und verläuft bis zur niedrigsten „Annealing“-Temperatur, etwa 2°C unterhalb der niedrigsten Schmelztemperatur im Pool der Oligonukleotide. In einer zweiten Reaktion werden die Produkte erst mit außenliegenden Primern amplifiziert. Dadurch reduziert sich der Aufwand auf zwei konsekutive PCR-Reaktionen und eine Subklonierung in einen TOPO-Vektor entfällt, wodurch die Gensynthese *de novo* in einem Tag durchgeführt werden kann.

Es wurde dazu ein Pool aller überlappenden Oligonukleotide, in parallelen Ansätzen steigender Verdünnung von 0,25 µM eines jeden Oligonukleotids ausgehend, die Primer Top1 und den letzten Bot-Primer hinzugefügt, sowie die üblichen Bestandteile einer PCR verwendet. Nach den konsekutiven Runden der GCPCR und PCR in parallelen Ansätzen mit variierenden „Template“-Konzentrationen war die erwünschte Bande im Agarosegel vorhanden. Die Bande des vermuteten Gens wurde aus dem Gel ausgeschnitten, per Gelextraktionskit von Qiagen extrahiert und restringiert oder in einer PCR mit den Primern Top1 und dem letzten Bot-Primer amplifiziert. Die DNA wurde restringiert und in den Vektor pTH ligiert.

Tabelle 4 – PCR-Ansatz der GCPCR

Pipettierschema	GCPCR, 1.Runde	Temperaturprofil		Zyklus
Top-Pool	1 µl verdünnt	300 sek.	95°C	1
Bot-Pool	1 µl verdünnt	120 sek.	95°C	2-35
dNTP	1 µl	-0,1°C / sek.	Bis 65°C	2-35
DMSO	1,5 µl	60 sek.	72°C	2-35
Taq-Puffer	2,5 µl	Unendlich	4°C	31
Taq-Pfu-Polymerase	1 µl			
Aq.dest.	ad 25 µl			

Tabelle 5 – PCR-Ansatz der GCPCR in der zweiten Runde

Pipettierschema	PCR, 2.Runde	Temperaturprofil		Zyklus
GCPCR-Produkt	1 µl verdünnt	300 sek.	95°C	1
Primer Top1 10 µM	1 µl	120 sek.	95°C	2-30
Primer Bot(Ende)	1 µl	30 sek.	68°C	2-30
dNTP	1 µl	60 sek.	72°C	2-30
DMSO	1,5 µl	Unendlich	4°C	31
Taq-Puffer	2,5 µl			
Taq-Pfu-Polymerase	1 µl			
Aq.dest.	ad 25 µl			

Primerverlängerung der Wildtyp-Sequenzen

Die cDNA vom des Influenzastammes A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14) des Hämagglutinin-Wildtypgens wurde einer Primerverlängerungs-PCR (PE-PCR oder Linker-Extension-PCR) unterzogen, um Restriktionsschnittstellen an das Gen zur späteren Ligation in den pTH-Vektor anzufügen, eine BamHI-Schnittstelle am 5'-Ende sowie ein V5-Tag und eine HindIII-Schnittstelle am 3'-Ende des Gens. Nach der Verlängerung wurden 4 gleiche PCR-Ansätze zur weiteren Bearbeitung vereint und per PCR-Purification-Kit von Qiagen aufgereinigt.

Die Gene M1wt, M2wt und NPwt wurden per RT-PCR inklusive Primerverlängerung mit dem OneStep PCR Kit von Qiagen aus viraler RNA erzeugt, welche wir von Dr. Thorsten Wolff am Robert Koch-Institut erhalten hatten.

Tabelle 6 – PCR-Ansatz der PE-PCR

Pipettierschema	PE-PCR	Temperaturprofil		Zyklus
KlonPrimer F	1 µl	120 sek.	95°C	1
KlonPrimer R	1 µl	20 sek.	95°C	2-30
Miniprep DNA 1:100 verdünnt	1 µl	20 sek.	55°C	2-30
dNTP	1 µl	120 sek.	72°C	2-30
Taq-Puffer	2,5 µl	600 sek.	72°C	31
Taq-Pfu-Polymerase	1 µl	Unendlich	4°C	31
Aq.dest.	ad 25 µl			

Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse des Molekulargewichts und der Reinheit der Produkte wurden 8 µl DNA zu einem Fünftel des Endvolumens mit DNA-Probenpuffer versetzt und in eine Tasche des Gels eingebracht. Das Gel bestand aus 10 g/l SeaKem-LE-Agarose von Biozym in TAE-Puffer und wurde nach dem Aufkochen mit einer wässrigen Ethidiumbromidlösung ad 0,5 mg/l versetzt. Alternativ wurde zur DNA-Färbung 40 µl/l Gelstar von Cambrex zugefügt, welches grün fluoresziert im Gegensatz zur orangenen Fluoreszenz des Ethidiumbromids. Die Elektrophorese erfolgte über 1 h bei 100 V mit einem BioRad PowerPac 200 in einer BioRad Gelkammer mit anschließender visueller Darstellung und Fotodokumentation per UV-Transilluminator von Phase.

Gelextraktion

Die DNA wurde per „freeze and squeeze“ aus der Agarose extrahiert, indem das ausgeschnittene Gelstück 20 min. bei -20 °C oder für 10 sek. in flüssigem Stickstoff eingefroren wurde. Das gefrorene Gelstück wurde in Parafilmfolie eingeschlagen und mit Fingern zerdrückt, um die freigesetzte Flüssigkeit in ein Reaktionsgefäß zu überführen. Nach Zugabe von 3 Volumen an Ethanol (96% V/V) und einem Drittel Volumen an eines 3 M Natriumacetatpuffers mit pH 5,2 wurde die Lösung invertiert und 30 min. einer Sedimentation

bei 16000 g unterworfen. Der entstandene Niederschlag wurde mit Ethanol (70% V/V) versetzt und 5 min bei 16.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen. Nach einer zweiten Waschung wurde der Niederschlag an der Luft getrocknet und in 30 μ l nukleasefreiem Aq.dest. aufgenommen. Die Ausbeute an DNA (circa 50% bei 200 - 2000bp Länge) war mit dem Gel Extraction Kit von Qiagen vergleichbar, die Konzentrationen wurden auf einem Nanodrop-Photometer von PeqLab bei $\lambda = 260$ nm gemessen.

Restriktion und Ligation

Die extrahierte DNA wurde mit einem Zehntel Volumen an BamHI-Restriktionspuffer, BSA-Lösung sowie mit je einem Mikroliter der Restriktionsendonukleasen BamHI und HindIII von Fermentas versetzt und 60min. bei 30°C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde anschließend mit einem PCR-Cleanup-Kit von Qiagen aufgereinigt, um die Enzyme zu denaturieren und zu entfernen. Der geschlossene Vektor pTH-Empty wurde ebenfalls restringiert und nach elektrophoretischer Trennung von Vektor- und herausgeschnittener DNA-Sequenz aus dem Gel extrahiert, 10 min. bei 95 °C denaturiert und bis zur Ligation bei 4 °C gelagert. Das stöchiometrische Verhältnis von Gen zu Vektor (20 ng Vektor) betrug 6 bei der Ligation in Ligasepuffer mit T4-DNA-Ligase von Fermentas. Nach einstündiger Ligation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz 10 min. bei 95 °C denaturiert und bis zur Elektroporation auf Eis gekühlt.

Elektroporation von Prokaryonten

Ein Mikroliter des Ligationsansatzes im pTH-Vektor wurde mit einer Spannung von 2500V, einer Kapazität von 25 μ F und einem Widerstand von 200 Ω mit 55 μ l elektrokompetenter *E.coli* Top10 von Invitrogen in einer auf Eis gekühlten Küvette mit 2mm Elektrodenabstand auf einem GenePulser2 von BioRad elektroporiert. Die elektroporierten Zellen wurden mit 250 μ l SOC-Medium in ein 10ml Kulturröhrchen von Falcon aufgenommen und eine Stunde bei 37°C und 250Rpm auf dem c24-Orbitalschüttel-Inkubator von New Brunswick Scientific inkubiert. Danach wurden von jedem Ansatz je 30 μ l und 100 μ l auf verschiedene LB+Amp-Agarplatten ausplattiert und 20 h bei 37°C in einem Heraeus B6060 Brutschrank inkubiert.

Bakterielle Kultur

Isolierte Klone der Elektroporation wurden zur Übernachtskultur in 5 ml LB+Amp bei 37°C unter 250Rpm Agitation inkubiert. Nach 16-18 Stunden wurden die Bakterien 15min. bei 3345g in einer Heraeus Megafuge 1.0R sedimentiert. Aus dem Niederschlag wurde die Plasmid-DNA nach Angaben von Qiagen mit dem Plasmid Miniprep Kit isoliert und deren Konzentration auf einem Nanodrop-Photometer von PeqLab gemessen oder das Sediment wurde mit 100 µl Glycerol und 900 µl LB+Amp resuspendiert und bei -20°C gelagert. Für Immunisierungsversuche wurde die Plasmid-DNA aus Kulturen von 250ml LB+Amp mit einem EndoFree Plasmid-Maxi-Kit von Qiagen aufgereinigt.

Colony PCR

Zur Identifikation der transgenen Klone wurde eine „Colony-PCR“³¹⁶ mit Ampicillin-resistenten Klonen und zwei Vektorprimern durchgeführt. Die Primer pTHFor und pTHRev binden unterhalb von 54°C an den im Vektor liegenden CMV-Promoter und die bGH-PolyA-Sequenz, respektive. Die Klone wurden per Pipettenspitze in den 25µl PCR-Ansatz und anschließend in 200µl LB-Amp getaucht und jeweils zweifach auf- und abpipettiert. Nach elektrophoretischer Identifikation der korrekten Amplifikatlänge wurden geeignete Klone zur Plasmid-Miniprep kultiviert.

Tabelle 7 – PCR-Ansatz der Colony-PCR

Pipettierschema	Colony-PCR	Temperaturprofil		Zyklus
Primer pTH F	1 µl	600 sek.	95°C	1
Primer pTH R	1 µl	20 sek.	95°C	2-35
dNTP	1 µl	20 sek.	54°C	2-35
Taq-Puffer	2,5 µl	120 sek.	72°C	2-35
Taq-Polymerase	1 µl	600 sek.	72°C	36
DMSO	1,5 µl	Unendlich	4°C	36
Aq.dest.	ad 25 µl			

Sequenzierung

Die Sequenzierungsreaktion basierte auf dem Prinzip der Didesoxynukleotide als Kettenabbruchsubstrate von Sanger³¹⁷, jedoch mit fluoreszenten Terminatoren^{318 319}.

Tabelle 8 – PCR-Ansatz der Sequenzierung

Pipettierschema		Temperaturprofil		Zyklus
Plasmid-DNA (150-300ng)	1-4 µl	120 sek.	95°C	1
Primer 10 µM	1 µl	10 sek.	95°C	2-25
ABI Big Dye 3.1	2 µl	10 sek.	52°C	2-25
ABI Puffer	1 µl	240 sek.	60°C	2-25
Aq.dest.	ad 10 µl	Unendlich	4°C	26

Die Analyse der Sequenzierungsreaktion erfolgte per Kapillarelektrophorese auf einem ABI Prism 3100 Genetic Analyzer durch das Sequenzierlabor des Instituts. Die nachfolgende Bearbeitung und Darstellung der Sequenzen wurde mit dem Programm BioEdit 7 durchgeführt.

Zielgerichtete Mutagenese

Aufgrund von Polymerasefehlern bei der PCR können Punktmutationen entstehen. Hinzu kommen bei der Festphasensynthese Insertionen und Deletionen, die reziprok zum Reinheitsgrad der bestellten Oligonukleotide auftreten. Zur Korrektur der Sequenz wurde eine „Site-Directed Mutagenesis“ (SDM) mit anschließendem DpnI-Verdau der unmutierten und Desoxy-methyladenosylierten bakteriellen DNA-Vorlage nach dem Quikchange® Protokoll von Stratagene durchgeführt. Dabei bleibt das per Polymerase-Kettenreaktion entstandene unmethylierte und mutierte Produkt bei anderthalbstündiger Inkubation bei 37°C aufgrund der Substratspezifität von DpnI unberührt von einer Restriktion.

Tabelle 9 – PCR-Ansatz der Quikchange-Mutagenese

Pipettierschema	SDM Quikchange	Temperaturprofil		Zyklus
Plasmid-DNA (20 ng)	1 µl	120 sek.	95°C	1
Primer F	1 µl	30 sek.	95°C	2-30
Primer R	1 µl	60 sek.	57°C	2-30
dNTP 10 mM	1 µl	660 sek.	65°C	2-30
Pfu-Puffer	5 µl	Unendlich	4°C	31
Pfu-Polymerase	1 µl			
Aq.dest.	ad 50 µl			

Nach der Mutagenese-PCR wurde der Ansatz mit 1 µl DpnI-Endonuclease von New England Biolabs versetzt und 1-2h bei 37°C inkubiert. Aus diesem Ansatz wurde 1µl zur Elektroporation in *E.coli* eingesetzt.

Als alternative Methode bei erfolglosen Mutageneseansätzen wurde das inzwischen aus patentrechtlichen Gründen nicht mehr erhältliche Flip-Flop-Kit® von Bionline verwendet. Dies beruht auf dem gegensätzlichen Prinzip mit Desoxy-Hydroxymethylcytosin-Triphosphat (HMdCTP) anstelle von Desoxy-Cytosin in der PCR. Die Restriktionsenzyme Phol (1/2 U pro Ansatz) und ApeKI (1 U pro Ansatz) schneiden die amplifizierte und mutierte DNA nicht, wenn hydroxymethylierte Desoxy-Cytidine in ihren Erkennungssequenzen vorkommen, während die bakterielle DNA-Vorlage (ohne Desoxy-Hydroxymethylcytosin) hydrolysiert wird. Die dNTPs wurden zu je 3,125 mM in der Stammlösung angesetzt. Hydroxymethylcytosin-Triphosphat ist weiterhin bei Bionline erhältlich und DpnI, Phol und ApeK1 sind bei New England Biolabs erhältlich.

Tabelle 10 – PCR-Ansatz der FlipFlop-Mutagenese

Pipettierschema	SDM FlipFlop	Temperaturprofil		Zyklus
Plasmid-DNA (20 ng)	1 µl	120 sek.	95°C	1
Primer F	1 µl	60 sek.	95°C	2-11
Primer R	1 µl	60 sek.	50°C	2-11
dNTP (mit HMdCTP)	1 µl	600 sek.	68°C	2-11
Pfu-Puffer	5 µl	Unendlich	4°C	12
Pfu-Polymerase	1 µl	Zugabe von Phol und ApeKI		-
Aq.dest.	ad 50 µl	60 sek.	95°C	13-18
		60 sek.	50°C	13-18
		600 sek.	68°C	13-18
		Unendlich	4°C	19

Zellkultur

Die Zellen wurden alle 2-3 Tage geteilt. Die Kultur erfolgte im CO₂-Inkubator BBD6220 von Heraeus mit 5% V/V CO₂ und 100% relativer Luftfeuchte bei 37°C.

Die 150cm²-Zellkulturflasche mit adhärenen Zellen wurde langsam ausgekippt, der Flaschenhals wurde mit einem Sterilium-getränkten Tuch abgewischt. Die Zellen wurden langsam mit 10ml PBS gespült und nach kurzem Schwenken wurde die Flüssigkeit abgesaugt. Nun wurden die Zellen mit 2ml Trypsin-lösung versetzt, nach circa 5min. Inkubation wurden 8ml Medium hinzugegeben. Die Zellen wurden durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. 2,5ml von der Zellsuspension wurden in der Flasche belassen oder in eine neue Flasche überführt, mit 23ml frischen Mediums aufgefüllt und in den CO₂-Inkubator gestellt. Für Immunfluoreszenzversuche wurden Deckgläser in die Vertiefungen der six-well-Platten gelegt, bevor die Zellen hinzugegeben wurden. Von dem Rest der Zellsuspension wurden 0,25ml pro Vertiefung in einer Sechs-Loch-Gewebekulturplatte aliquotiert, mit je 2ml frischen Mediums aufgefüllt und 12-48h in den Brutschrank gestellt, bis die gewünschte Zelldichte erreicht wurde.

Lipofektion mit Polyfect

Zur Überprüfung der Expression *in vitro* erfolgte die Transfektion des Konstrukts in HEK293T- oder NIH3T3-Zellen von einer Konfluenz von 40-80 % mit Hilfe von kationischen Lipiden. Hierzu wurden 2µg der Plasmide mit Serum- & Antibiotika-freiem DMEM auf 100µl aufgefüllt und mit 20µl der Polyfect-Suspension von Qiagen versetzt, durch fünfmaliges Pipettieren vermischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Derweil wurde das Medium von den Zellen in den Sechs-Loch-Gewebekulturplatten entfernt und pro Vertiefung durch 1,5ml frisches Medium ersetzt. Die Plasmid-Liposomen-Suspension wurde mit 600µl DMEM komplett versetzt und tropfenweise auf die Zellen verteilt. Nach 30-50 Stunden wurde das Medium abgenommen. Die Zellen wurden mit 3ml PBS gewaschen. Nachdem das PBS entfernt wurde, konnten die Zellen für den Western Blot in 200µl TritonX100-Lysispuffer aufgenommen oder für die Immunhistochemie mit 2ml eiskalten Methanols fixiert werden.

Transfektion mit Polyethylenimin

Aufgrund der erhöhten Transfektionseffizienz und den deutlich niedrigeren Kosten wurden die Plasmide mit einem partiell hydrolysierten Polyethylenimin (JetPEI® von Polyplus) komplexiert und zu den Zellen gegeben. Hierzu wurden pro Vertiefung einer six-well-Platte 2µg Plasmid mit einer isotonischen NaCl-Lösung (150mM) 1:100 verdünnt und mit 5,2µg PEI versetzt und zügig durchmischt, was 2µl der Pei-Stammlösung entsprach. Während der 10min. Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Medium gewechselt, danach wurde die PEI-DNA-Lösung zu den Zellen getropft. Die Zellen wurden danach bis zur weiteren Verwendung 24-48h im CO₂-Brutschrank inkubiert.

IPA Immunfärbung von Zellkulturen

Der „Immunoperoxidase assay“ (IPA) ist eine Variante der immunhistochemischen Färbung, bei der Antigene in fixierten und permeabilisierten Zellen aus der Zellkultur mit Peroxidasegekoppelten Antikörpern spezifisch angefärbt werden. Dadurch können einzelne transgene Klone ohne Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops identifiziert werden. Dazu wurde nach 10min. Fixierung bei -20°C das Methanol von den lipofizierten Zellen abgesaugt und die Zellen für 30min. mit 2ml ELISA-Blockpuffer versetzt. Nach erneutem Absaugen wurde der Primärantikörper in 1ml ELISA-Blockpuffer 1:1000 verdünnt und für 30min. appliziert. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen wurden viermal mit PBS gewaschen und jede Vertiefung mit Sekundärantikörper-Peroxidase-Konjugat (Anti-Maus-Fc-HRP, 1:1000 verdünnt) in 1ml ELISA-Blockpuffer versehen. Nach 30min. wurde erneut viermal mit je 2ml PBS gewaschen. Für die Bildung von Farbpräzipitaten wurden 4mg 4-Aminoethylcarbazol von Sigma in einem Milliliter Dimethylformamid gelöst und zu 19ml AEC-HRP-Substratpuffer hinzugegeben, mit 20µl konzentriertem H₂O₂ versetzt und auf die Zellen gegeben. Nach 30-60 Minuten konnte die Farbreaktion durch Zugabe von Leitungswasser gestoppt werden. In 500ml/l Glycerol wurden die Zellen bei 4°C gelagert. Die Zellen wurden auf einem Nikon Eclipse E600 Phasenkontrast-Mikroskop photographiert.

Immunfluoreszenzmikroskopie

Das Medium wurde gegen 2ml PBS pro Vertiefung der six-well-Platte ausgetauscht, um die Zellen zu waschen. Nach Entfernen des PBS wurden die Zellen für 30min. mit 2ml IF-Fixierungslösung versetzt und danach erneut mit 2ml PBS gewaschen, mit der Fixierungslösung wurden die Zellen gleichzeitig auch permeabilisiert. Darauf folgte eine 30-minütige Inkubation mit 2ml IF-Blockierungslösung. Der Zellüberstand wurden anschließend mit Antikörper-Konjugat (1:500 in IF-Blockierungslösung und DAPI 1:10.000) ersetzt und 1h stehengelassen. Die Zellen wurden zweimal mit je 2ml PBS gewaschen. Die auf den Deckgläsern gewachsenen Zellen wurden mit einem Tropfen Glycerol für die Fluoreszenzmikroskopie von VWR versetzt und auf Objektträger gelegt. Die Aufnahmen erfolgten auf einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop cLSM510 Meta von Zeiss in Kooperation mit Dr. Madela.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (SDS-PAGE) wurden nach der Anleitung von Laemmli ³²⁰ durchgeführt. Ansatz für 2 Gele mit d = 0,75 mm oder Eines mit d = 1,5 mm:

Tabelle 11 – Pipettierschema der SDS-PAGE

SDS-PAGE	Sammelgel 5% T	Trenngel 12% T
Acrylamid-Lösung	1,7ml	4,0ml
34% (m/V) Acrylamid		
2,6% (m/V) Methylen-Bisacrylamid		
Sammelgelpuffer	2,5ml	-
Trenngelpuffer	-	2,5ml
Aq.dest.	5,7ml	3,4ml
10% (m/V) Natriumlaurylsulfat	0,1ml	0,1ml
Tetraethylmethyldiamin	0,01ml	0,01ml
10% (m/V) Ammoniumperoxodisulfat	0,1ml	0,1ml

Flüssige Proben wurden mit dem gleichen Volumen an 2-fach konzentriertem Probenpuffer versetzt, 5 min. bei 95°C erhitzt und bis zum Probenauftrag auf Eis gehalten. Pro Tasche im Gel wurden 20 µl der vorbehandelten Probe aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 8 min. bei 100 V, gefolgt von 40 min. bei 200 V, mit einem PowerPac200 Netzteil von BioRad.

Bei adhärennten Zellkulturen wurde das Medium abgesaugt und mit 2ml PBS pro Vertiefung einer six-well-Platte ersetzt und erneut abgesaugt. Die Zellen wurden mit 250µl 5x Laemmli-Probenpuffer versetzt und mit kreisend-schabenden Bewegungen mit der Pipette angesaugt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin wurden die Proben 5min. bei 95°C erhitzt und bis zum Probenauftrag auf Eis gehalten.

Das Polyacrylamidgel wurde nach Schagger und von Jagow ³²¹ hergestellt, wenn ausschließlich Proteine kleiner als 30 KDa untersucht wurden.

Gel-Silberfärbung

Für eine maximale Sensitivität wurden die Silberfärbung nach Blum ³²² angewendet, für schnelle Resultate wurde mit colloidalem Coomassie nach Neuhoff ³²³ gefärbt. Die Gele wurden 30min. bei RT oder über Nacht bei 4°C in Gelfixierlösung fixiert, anschliessend bei RT dreimal mit jeweils 20ml Waschlösung (300 ml/l Ethanol) 20min. und einmal mit 20ml dest. während 10min. versetzt, um Salze & Detergenzien zu extrahieren. Anschliessend wurden die Gele in Natriumthiosulfatlösung (200mg/l Na₂S₂O₃) 1min. lang eingelegt, um Reduktionsmittel ins Gel diffundieren zu lassen. Nach dreimaligem Waschen in Aq.dest zu je 20sek. wurden die Gele in Silbernitrat-Lösung (2g/l AgNO₃) überführt und 20min. inkubiert. Hierbei entwickelt sich häufig eine erste Hintergrundtönung, bedingt durch die Silber-Kristallisationskeime. Danach wurden die Gele in Entwicklerlösung (30g/l Na₂CO₃, 4mg/l Na₂S₂O₃, 0,5ml/l Formaldehydlösung) gegeben, um die Reduktion des Silbers durch den hohen pH-Wert zu beschleunigen.

Bei Erscheinen der Proteinbanden wurden die Gele je zweimal eine Minute in Aq.dest. gewaschen und in Stopplösung (5g/l Glycin) 5min. inkubiert. Die Gele wurden bis zur Trocknung in Aq.dest. aufbewahrt. Hierzu wurden die gefärbten Gele 30min. in 100ml/l Glycerol in Aq.dest. bei Raumtemperatur auf dem Schüttler equilibriert, dann blasenfrei zwischen zwei hydratisierte Zellophanfolien gelegt, in einen Doppelrahmen gespannt und 24 h getrocknet.

Western Blot

Nach der Elektrophorese wurden die Gele 30min. in Transferpuffer bewegt. Der Elektrotransfer³²⁴ erfolgte im semi-dry-Verfahren³²⁵ auf PVDF-Membranen³²⁶ bei 20V über einen Zeitraum von 30min. in einem TransBlot SD von BioRad, gefolgt von einer Absättigung unspezifischer Proteinbinungsstellen auf der Membran durch 30-minütige Inkubation in Blockpuffer. Der Primärantikörper wurde 1:2500 in Blockpuffer verdünnt und auf dem Blot unter langsamem Schütteln (50Rpm) eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem zehninütigem Waschen mit PBS-T wurde der Sekundärantikörper in Blockpuffer 1:5000 verdünnt, auf die Membrane gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur agitiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS-T wurde die Blotmembran per Chemilumineszenz von Luminol in Anwesenheit von Iodophenylboronsäure³²⁷ auf Röntgenfilmen von Kodak unter Lichtausschluss fotografiert. Zur einmaligen Wiederverwendung wurde der Blot 15 min. in Denaturierungspuffer geschwenkt und konnte erneut mit Blockpuffer versehen werden, um noch einmal mit anderen Primärantikörpern inkubiert zu werden.

Durchflusszytometrie (FACS)

Die FACS-Analyse der Lipopolysaccharid-Kontamination in Plasmidpräparationen nutzt den Effekt des Rezeptorabbaus und Rezeptorendocytose des TLR4 nach Aktivierung durch das bakterielle Zellwandbestandteil LPS.

Jeweils 10^6 murine Knochenmarksmakrophagen (mBMM)³²⁸ wurden mit verschiedenen Konzentrationen der verschiedenen Plasmide in DMEM für 2h im CO₂-Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen, jeweils bestehend aus einer Zugabe von je 500µl FACS-PBS und 10min. Sedimentation bei 600g, wurden die Zellen mit 200µl FACS-Fix von Becton Dickinson versetzt und 30min. fixiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen mit Antikörperlösung (anti-TLR4/MD2-PE 1:100 verdünnt in 200µl FACS-PBS) resuspendiert und 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden die Zellen dreimal gewaschen und in 500µl FACS-PBS resuspendiert. Als Negativkontrolle wurde CpG zu 20µg/ml (Coley Pharmaceutical Group #10103) und als Positivkontrolle wurde LPS von *E.coli* O55:B5 zu 2µg/ml (Sigma-Aldrich #L6529) eingesetzt. Die Analyse erfolgte auf einem LSRII® von BectonDickinson mit der Auswertungssoftware FlowJo in Kooperation mit Dr. Stefan Kaulfuß.

Herstellung der Gene Gun Munition

Für die Beschichtung der Goldpartikel wurde eine Polyvinylpyrrolidon- (20mg PVP in 1ml absolutiertem Ethanol) und eine Spermidin-Stammlösung (1M Spermidin in Aq.dest.) angesetzt. Aus der PVP-Lösung wurden 8ml einer 1:800 Verdünnung in absolutiertem Ethanol und aus der Spermidinlösung 200µl einer 1:20 Verdünnung in Aq.dest. erstellt.

Zur Herstellung von zwei Tefzel-Schläuchen zu je 100 Schuss wurden 50mg Goldstaub mit den 200µl der Spermidinlösung (50mM) vereinigt und 10sek. im Ultraschallbad RK106 von Bandelin Sonorex beschallt, unter der Sterilwerkbank Herasafe HS15 von Kendro mit 100µg Endotoxin-freier Plasmid-DNA versehen und tropfenweise mit 100µl einer 1M CaCl₂-Lösung in Aq.dest. versetzt. Nach 10min. Inkubation bei Raumtemperatur wurde 1min. bei 5000g zentrifugiert und der Niederschlag in 1ml absolutiertem Ethanol im Ultraschallbad resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde zweifach wiederholt, danach wurde der Niederschlag in mehreren Pipettierschritten in einem Gesamtvolumen von 7ml der PVP-Lösung aufgenommen und unter Ultraschallung homogenisiert.

Parallel wurde der Tefzel-Schlauch 5min. unter N₂-Begasung mit 0,3-0,4L/min getrocknet. Die Hälfte der Suspension wurde in den getrockneten Schlauch gesaugt und 5 min sedimentiert. Das entfernte Ethanol sollte beim Abziehen eine klare Flüssigkeit sein. Der Schlauch wurde mit 30Rpm zuerst 1min. ohne Begasung sowie unter N₂-Begasung 5min. zur Trocknung rotiert und anschliessend in Stücke von 1cm Länge geschnitten, was circa 50 Schuss pro Schlauch ergab, insgesamt also 100 Schuss.

Impfung per Gene Gun

Für die Immunisierungsversuche wurden C57/Bl6-³²⁹ und Balb/c-Mäuse³³⁰ aus dem Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) verwendet. Der ausschließliche Einsatz von weiblichen Mäusen diente der Minimierung des Verbisses und erlaubte, Gruppen von 10 Tieren in Käfigen des Typs 2 zu halten. Die Versuche wurden im Tierstall des RKI im Einklang mit den Tierhaltungsvorschriften des Robert Koch-Instituts (RKI) und des Landesamts für Gesundheit und Soziales Berlin (LAGeSo) im Rahmen des Tierversuchsantrags TVA 0254/06 durchgeführt. Die Blutentnahmen und der Beschuss mit der Gene Gun erfolgten abwechselnd in einem ungefähr 14-tägigen Turnus, wobei die Blutung eine Woche vor der Immunisierung erfolgte. Die Mäuse wurden per Isofluran-Inhalationsnarkose betäubt. Dazu wurde 0,5ml Isoba® von Essex Tierarzneien auf das untere von zwei Zellstofftüchern getropft, in ein Glas mit Deckel gelegt und zur Verdampfung eines Teils des Isoflurans 1min. lang gewartet. Nach etwa 10-15sek. im Glas war eine Maus narkotisiert, der Herzschlag sollte danach noch sichtbar sein und mindestens einmal pro Sekunde erfolgen, bei höheren Dosen oder längerer Einwirkzeit kommt es zum Herzstillstand. Nach Rasur des Bauches wurde die Gene Gun® von BioRad positioniert und zwei- oder viermal betätigt. Die aufwachende Maus wurde in den Käfig überführt. Der Verlauf einer Immunisierungsreihe ist im folgenden Diagramm für die Untersuchung der Immunantwort *in vitro* in grün und für den Impfschutz bei Belastung *in vivo* in rot markiert.

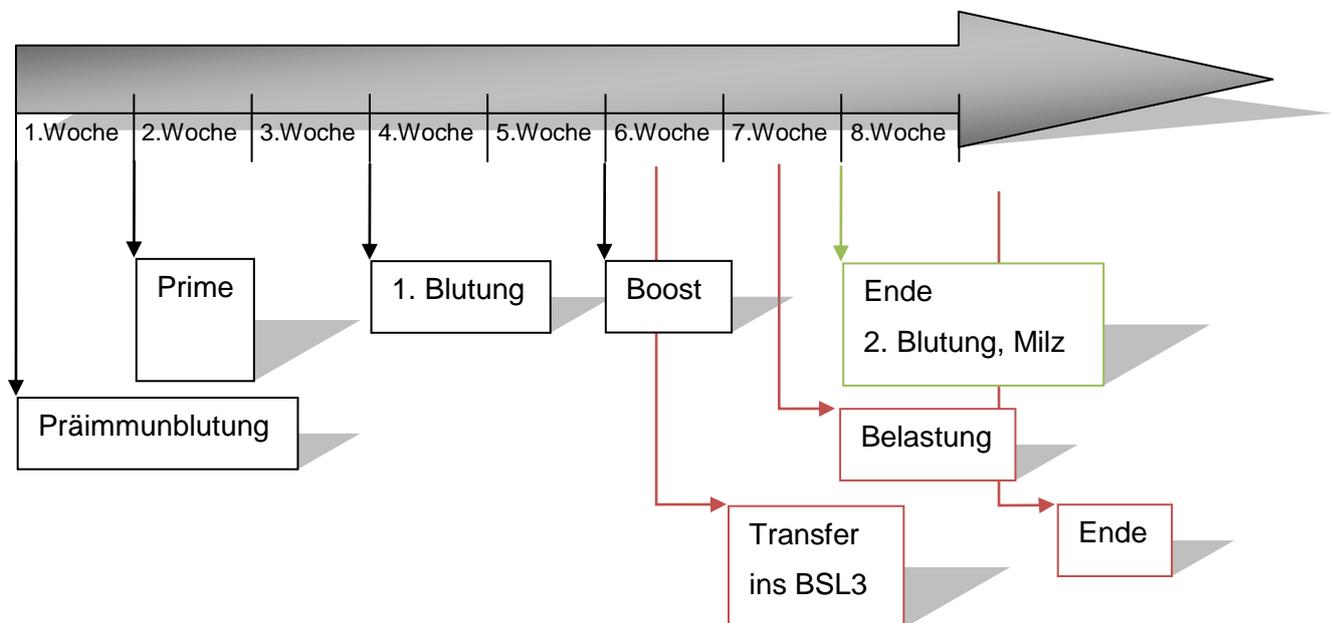


Abbildung 4 - Impfzeitplan

Die Mäuse wurden in folgende Gruppen eingeteilt:

Tabelle 12 – Impfplan

Phase I - Immunogenität Vektor & Gen						
<u>Gruppe</u>	<u>Maus</u>	<u>Immunogen</u>	<u>Immunomodulation</u>	<u>Anzahl</u>	<u>Virus</u>	<u>Kontrolle für</u>
Gruppe I-1	C57Bl	DNA-H5co	M6-M10 : GM-CSF	10	–	
Gruppe I-2	C57Bl	DNA-H5wt	M6-M10 : GM-CSF	10	–	
Gruppe I-3	C57Bl	DNA-M1co	M6-M10 : GM-CSF	10	–	
Gruppe I-4	C57Bl	DNA-M1wt	M6-M10 : GM-CSF	10	–	
Gruppe I-5	C57Bl	DNA-OVA	M6-M10 : GM-CSF	10	–	I-1 bis I-9
Gruppe I-6	C57Bl	DNA-M2co	M6-M10 : GM-CSF	10	–	
Gruppe I-7	C57Bl	DNA-M2wt	M6-M10 : GM-CSF	10	–	
Gruppe I-8	C57Bl	DNA-NPco	M6-M10 : GM-CSF	10	–	
Gruppe I-9	C57Bl	DNA-NPwt	M6-M10 : GM-CSF	10	–	
Gruppe I-10	C57Bl	DNA-Leervektor	M6-M10 : GM-CSF	10	–	I-1 bis I-9
			Anzahl Phase I	100		
Phase II - Immunomodulation						
<u>Gruppe</u>	<u>Maus</u>	<u>Immunogen</u>	<u>Immunomodulation</u>	<u>Anzahl</u>	<u>Virus</u>	<u>Kontrolle für</u>
Gruppe II-1	C57Bl	tetravalente DNA	GM-CSF	10	–	
Gruppe II-2	C57Bl	tetravalente DNA	GM-CSF + IL-21co	10	–	
Gruppe II-3	C57Bl	tetravalente DNA	IL-12	10	–	
Gruppe II-4	C57Bl	tetravalente DNA	IL-21co	10	–	
Gruppe II-5	C57Bl	tetravalente DNA	ohne	10	–	II-1 bis II-4
Gruppe II-6	C57Bl	DNA-OVA	ohne	10	–	II-1 bis II-5
			Anzahl Phase II	60		
Phase III - Konfirmation - Stammesunterschiede						
<u>Gruppe</u>	<u>Maus</u>	<u>Immunogen</u>	<u>Immunomodulation</u>	<u>Anzahl</u>	<u>Virus</u>	<u>Kontrolle für</u>
Gruppe III-1	Balb/c	tetravalente DNA	ohne	10	–	
Gruppe III-2	Balb/c	DNA-Leervektor	ohne	10	–	III-1
Gruppe III-3	Balb/c	tetravalente DNA	GM-CSF	10	–	
Gruppe III-4	Balb/c	DNA-Leervektor	GM-CSF	10	–	III-3
Gruppe III-5	C57Bl	tetravalente DNA	GM-CSF	10	–	III-1, III-3
Gruppe III-6	C57Bl	DNA-Leervektor	GM-CSF	10	–	III-2, III-4
			Anzahl Phase III	60		

Phase IV - Belastung mit 5 MLD ₅₀						
<u>Gruppe</u>	<u>Maus</u>	<u>Immunogen</u>	<u>Immunomodulation</u>	<u>Anzahl</u>	<u>Virus</u>	<u>Kontrolle für</u>
Gruppe IV-1	C57Bl	tetravalente DNA	GM-CSF	10	5 MLD50 PR8	
Gruppe IV-2	C57Bl	DNA-Kontrolle	GM-CSF	10	5 MLD50 PR8	IV-1
Gruppe IV-3	C57Bl	tetravalente DNA	GM-CSF	10	5 MLD50 R65	
Gruppe IV-4	C57Bl	DNA-Kontrolle	GM-CSF	10	5 MLD50 R65	IV-3
Gruppe IV-5	C57Bl	tetravalente DNA	GM-CSF	10	5 MLD50 VN1194	
Gruppe IV-6	C57Bl	DNA-Kontrolle	GM-CSF	10	5 MLD50 VN1194	IV-5
Anzahl Phase IV				60		
Phase V - Belastung mit 50 MLD ₅₀						
<u>Gruppe</u>	<u>Maus</u>	<u>Immunogen</u>	<u>Immunomodulation</u>	<u>Anzahl</u>	<u>Virus</u>	<u>Kontrolle für</u>
Gruppe V-1	C57Bl	tetravalente DNA	GM-CSF	10	50 MLD50 R65	
Gruppe V-2	C57Bl	2x tetravalente DNA	GM-CSF	10	50 MLD50 R65	
Gruppe V-3	C57Bl	DNA-Kontrolle	GM-CSF	10	50 MLD50 R65	V-1, V-2
Gruppe V-4	C57Bl	2x tetravalente DNA	GM-CSF	10	50 MLD50 VN1194	
Gruppe V-5	C57Bl	tetravalente DNA	GM-CSF	10	50 MLD50 VN1194	
Gruppe V-6	C57Bl	DNA-Kontrolle	GM-CSF	10	50 MLD50 VN1194	V-4, V-5
Anzahl Phase V				60		
Phase VI - Belastung mit 10 MLD ₅₀ nach monovalenter Immunisierung						
<u>Gruppe</u>	<u>Maus</u>	<u>Immunogen</u>	<u>Immunomodulation</u>	<u>Anzahl</u>	<u>Virus</u>	<u>Kontrolle für</u>
Gruppe VI-1	C57Bl	DNA-Kontrolle	GM-CSF	10	10 MLD50 R65	VI-2 - VI-6
Gruppe VI-2	C57Bl	DNA-H5co	GM-CSF	10	10 MLD50 R65	
Gruppe VI-3	C57Bl	DNA-M1co	GM-CSF	10	10 MLD50 R65	
Gruppe VI-4	C57Bl	DNA-M2co	GM-CSF	10	10 MLD50 R65	
Gruppe VI-5	C57Bl	DNA-NPco	GM-CSF	10	10 MLD50 R65	
Gruppe VI-6	C57Bl	tetravalente DNA	GM-CSF	10	10 MLD50 R65	VI-2 - VI-5
Anzahl Phase VI				60		
Phase VII - Belastung mit 10 MLD ₅₀ nach H1N1sw-DNA-Immunisierung						
<u>Gruppe</u>	<u>Maus</u>	<u>Immunogen</u>	<u>Immunomodulation</u>	<u>Anzahl</u>	<u>Virus</u>	<u>Kontrolle für</u>
Gruppe VII-1	C57Bl	DNA-Kontrolle	GM-CSF	10	10 MLD50 PR8	VII-2 - VII-5
Gruppe VII-2	C57Bl	DNA-H1coSw	GM-CSF	10	10 MLD50 PR8	
Gruppe VII-3	C57Bl	DNA-M1coSw	GM-CSF	10	10 MLD50 PR8	
Gruppe VII-4	C57Bl	DNA-NPcoSw	GM-CSF	10	10 MLD50 PR8	
Gruppe VII-5	C57Bl	trivalente DNA	GM-CSF	10	10 MLD50 PR8	
Anzahl Phase VII				50		

Serumpräparation

Das Blut wurde retrobulbär unter Narkose entnommen. Die 200µl Vollblut wurden 2h bei Raumtemperatur inkubiert oder über Nacht im Kühlschrank gelagert. Am Tage darauf wurde es 10min. bei 16000g in einer Biofuge 13 von Heraeus zentrifugiert. Hieraus konnten 50-100µl Überstand (Serum) gewonnen werden, die bei -20°C gelagert wurden.

ELISA

Die Bestimmung des Antikörpertiters erfolgte in Anlehnung an die Methode von Engvall und Perlmann³³¹. Das rekombinante Antigen wurde in einer Konzentration von 4µg/ml in Adsorptionspuffer gelöst, zu 50µl pro Vertiefung in eine Mikrotiterplatte aliquotiert und 24h bei Raumtemperatur inkubiert. Alternativ wurden 50µl einer Antigen-Lösung in Aq.dest. unter Ventilation bei Raumtemperatur eingedampft. Am nächsten Tag wurde die Platte auf einem SkaTron Skan Washer 300 B gewaschen und mit 200µl ELISA-Blockpuffer pro Mulde befüllt. Nach einer halben Stunde wurden die Platten erneut gewaschen. Die Seren wurden in einer Ausgangsverdünnung von 1:20 in ELISA-Blockpuffer mit einem Volumen von 50µl pro Mulde auf die Platte aufgebracht. Unter Halbierung der Probenkonzentration wurden Serienverdünnungen erstellt.

Die Platte wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert, gewaschen und zur erneuten Inkubation mit 50µl pro Vertiefung an HRP-konjugiertem Sekundärantikörper versehen, der zuvor 1:1000 in ELISA-Blockpuffer verdünnt wurde. Nach einer weiteren Stunde bei 37°C wurde die Platte gewaschen und mit 50µl OPD-HRP-Substratpuffer pro Loch der Mikrotiterplatte versehen. Die gewünschte Farbentwicklung wurde durch Zugabe von 20µl halbkonzentrierter Schwefelsäure beendet und auf einem Tecan Sunrise Mikrotiterplattenphotometer bei einer Wellenlänge von 495nm mit einer Referenzwellenlänge von 620nm vermessen.

Isolierung und Stimulation von murinen Milzzellen

Die präparierte Milz wurde durch ein Edelstahlsieb passiert, das Sieb wurde mit insgesamt 6ml PBS gespült, die Flüssigkeit wurde auf 5ml Ficoll-Lösung ($\rho = 1,077 \text{ g/cm}^3$) von Biochrom aufgeschichtet und 20min. bei 2000g zentrifugiert. Die trübe Leukozyten-haltige Lösung oberhalb der Ficoll Grenzschicht wurde in einem neuen Gefäß mit 10ml PBS versetzt, 10min. bei 2000g sedimentiert, der Niederschlag wurde mit 10ml PBS resuspendiert und 20min bei 700g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 1ml PBS aufgenommen. Ein $10\mu\text{l}$ Aliquot der Milzzellsuspension wurde 1:50 mit Trypanblaulösung von Invitrogen verdünnt. Die Lebendzellzahl wurde auf einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Zur FACS-Analyse wurden pro Messansatz 10^6 Zellen in $50\mu\text{l}$ eingesetzt, während für den Elispot die Zellen auf 4×10^6 Zellen pro Milliliter verdünnt wurden, sodass in $50\mu\text{l}$ der Zellsuspension circa 200.000 Zellen enthalten waren, welche pro Vertiefung eingesetzt wurden.

Ab der zweiten Impfreihe wurden aufgrund der durchschnittlich dreifachen Zellausbeute die Splenozyten per GentleMACS® von Miltenyi nach Anleitung des Herstellers homogenisiert, dann zweimal gewaschen durch Zugabe von je 10ml PBS mit 30min. Sedimentation bei 650g und 4°C . Der Zelleniederschlag wurde in 1ml komplettem, filtriertem RPMI-Medium resuspendiert und im Coulter Counter Z2 ® von Beckman Coulter ausgezählt. Die Zellen wurden bis zur Verwendung im Elispot im CO_2 -Brutschrank bei 37°C inkubiert und nach dem Herausnehmen mit Medium auf 4×10^6 Zellen pro Milliliter eingestellt und resuspendiert. Bei eingefrorenen Zellen wurde im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, in 50ml Röhrchen umgefüllt, anschließend 20min. bei 650g und 4°C sedimentiert und mit 10ml Medium resuspendiert. Nach erneuter Sedimentation für 20min. bei 650g und 4°C wurden die Zellen in 1ml Medium aufgenommen und bis zur Verwendung im Elispot im CO_2 -Brutschrank bei 37°C inkubiert und nach dem Herausnehmen mit Medium auf 8×10^6 Zellen pro Milliliter eingestellt und resuspendiert.

ELISPOT nach Peptidstimulation

Die Untersuchung der Sekretion von $\text{IFN-}\gamma$ durch Milzzellen nach Stimulation antigen-spezifischer T-Zellen mittels Antigen-abgeleiteter Peptide oder antigen-exprimierender Zellen erfolgte basierend auf der Methode von Czerkinsky et al.³³². Abweichend davon wurden die

Zellen auf Immobilon-P PVDF-Membran-Mikrotiterplatten von Millipore adsorbiert, wodurch eine verbesserte Immobilisierung von Zellen und Antikörpern erzielt wird^{333 334}. Die PVDF-Platten wurden durch Zugabe von 15µl Ethanol (70 % V/V) pro Vertiefung aktiviert und sechsmal mit Aq.dest. gewaschen. Daraufhin wurde der anti-IFN- γ -Adsorptionsantikörper AN18 von Mabtech mit einer Massenkonzentration von 0,5µg in 100µl PBS in jede Vertiefung pipettiert und 16h bei 4 °C inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen mit PBS wurden die Platten mit 200µl komplettem Medium pro Vertiefung versehen und eine Stunde ruhen gelassen. Die Milzzellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, langsam mit 10ml komplettem Medium versetzt und 15min. bei 700g zentrifugiert, um danach in 1ml frischen Mediums aufgenommen und zur Erholung für 2 – 4h in den CO₂-Brutschrank überführt zu werden. Anschließend wurden die Zellen nach Trypanblau-Färbung und Auszählung auf 2 x 10⁶ Zellen / ml verdünnt und mit murinem Interleukin-2 ad 90U/ml versetzt, sodass nach Zugabe der Zellen eine Endkonzentration von 30 U/ml erreicht wurde. Nun wurden 0,3µg des stimulierenden Peptids in 50 µl Medium pro Mulde der entleerten PVDF-Platten aliquotiert. Hierauf wurden 100µl der Zellsuspension gegeben. Als Positivkontrolle wurden pro Vertiefung 10⁵ Zellen mit Pokeweed Mitogen (PWM) ad 2 µg/ml versetzt. Für die Negativkontrolle wurde das immunodominante Epitop des E7-Proteins von HPV-16 eingesetzt. Alle Ansätze wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt. Nach erschütterungsfreien 20 h im CO₂-Inkubator wurden die Platten sechsmal mit PBS gewaschen und jede Vertiefung mit 0,1µg Detektions-Antikörper in 100 µl PBS mit einem 0,5 % Volumenanteil an FKS versehen und 2 h inkubiert. Nach erneutem sechsmaligen Waschen wurde das Avidin-Phosphatase-Konjugat 1:1000 in PBS verdünnt und zu 100 µl der Konjugatlösung pro Vertiefung ausgegeben. Nach einer Stunde wurde wiederum sechsmal mit PBS gewaschen, bevor die NBT-BCIP-Substratlösung nach Angaben von BioRad hinzugegeben wurde. Die Farbentwicklung wurde durch dreimaliges Waschen mit Leitungswasser angehalten. Die Auswertung erfolgte auf einem Elispot-Lesegerät von AID unter Standardeinstellungen.

Virustitration unter BSL3

Die Bestimmung der Virustiter wurde per Plaque-Assay zuerst mit „low-melting Agarose“³³⁵ und später mit Avicel³³⁶ sowie parallel als TCID₅₀-Bestimmung³³⁷ mit der Lyse der Zellen nach 3 Tagen als Kriterium einer vorhandenen Infektion durchgeführt. Verschiedene Virusverdünnungen wurden auf konfluent gewachsene MDCK-Zellen in Six-well-Platten

ausgebracht. Die Korrelationen von „Tissue Culture infectious Dose of 50% infection“ (TCID₅₀) bzw. „Plaque forming Units“ (PFU) und der letalen Dosis für 50% der Mäuse (MLD₅₀) stammten von Dr. Thorsten Wolff, Robert Koch-Institut, und Dr. Donata Kalthoff, Friedrich Löffler-Institut Riems.

Belastungsversuche unter BSL3

Belastungsversuche erfolgten im BSL3-Labor des RKI. Die Mäuse waren nach dem Transfer in einem Tecniplast Isocage in Käfigen des Typs 2 in Gruppen von fünf Tieren untergebracht. Die Empfehlungen der Berliner Tierschutzbeauftragten und die Vorgaben des Landesamtes für Gesundheit und Soziales unter TVA 0254/06 (für H5N1-basierte Impfstoffe) und TVA 0292/07 (für H1N1-basierte Impfstoffe) wurden eingehalten³³⁸. Die Viren wurden den Mäusen nach Isoflurannarkose intranasal in 50µl PBS verabreicht (siehe Tabelle 12 bezüglich Dosis). Die Inspektion erfolgte täglich mit Gewichtsbestimmung. Bei Erreichen eines Gewichtsverlusts von 20% zum Präinfektionsgewicht oder bei schwerwiegender Erkrankung (zu den Kriterien siehe Anhang) wurden die Mäuse mittels Isofluran eingeschläfert, gefolgt von einer zervikalen Dislokation.

Ergebnisse

De novo Synthese der Codon-optimierten Gene

M2co, NPco, und IL21co wurden parallel per Fusions-PCR und per Gradient-cycle PCR angesetzt, jedoch aufgrund der raschen Ergebnisse entstammten alle 3 verwendeten Konstrukte der GC-PCR. Die Konstrukte wurden mit BamHI und Hind III restringiert und in den Vektor pTH²⁴⁰ ligiert. Die durchschnittliche Mutationshäufigkeit lag bei circa 3 Mutationen pro Kilobase DNA, welche nach Auswahl von Klonen mit den geringsten Mutationen (meistens 2) pro Kilobase DNA per Mutagenese korrigiert wurden. Die daraus folgenden und in der Sequenzierung fehlerfreien Sequenzen wurden zur Transfektion freigegeben.

Klonierung und Expression

Die Klonierung der Impfgene H5, M1, M2, NP in Wildtypsequenz erfolgte über die BamHI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen aus den PCR-Amplifikaten der cDNA des Influenzastammes A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14 vom NIBSC London oder cDNA von Dr. Thorsten Wolff) in das Plasmid pTH²⁴⁰ zur eukaryotischen Expression. Sukzessive wurde das Protokoll ausgehend von Sambrook et al.³³⁹ angepasst, um aktuellere Forschungsergebnisse (siehe Material und Methoden) umzusetzen. So wurde routinemäßig eine Mischung aus Taq- und Pfu-Polymerase³¹² in Kombination mit 6% DMSO eingesetzt, um die Fehlerrate zu minimieren und maximale Ausbeute bei niedrigen Kosten zu erhalten.

Die Transfektion erfolgte ursprünglich mit Calcium-präzipitierter DNA mit Transfektionsraten im niedrigen einstelligen Prozentbereich, dann mit Polyfect von Qiagen®, wodurch bis zu 30% transient-transgene Zellen erreichbar waren. Eine höhere Effizienz, aber mit deutlicher Abrundung und Ablösung der Zellen als Folge der Zytotoxizität kationischer Lipide wurde erreicht, wenn die DNA-Lipid-Emulsion die ganze Zeit auf den Zellen gelassen wurde. Aufgrund von höherer Effizienz (30-60%) bei vernachlässigbaren Kosten und gleichzeitig zur besseren Vergleichbarkeit mit der Expression der mit einem ähnlichen kationischem Polymer (PVP) beschichteten GeneGun Munition, wurden alle Transfektionen mit JetPEI von

Polyplus® durchgeführt. Dieses Polyethylenimin führte erst in höheren Konzentrationen von 12,5 µg PEI / ml Medium zu mikroskopischen Anzeichen der Zytotoxizität wie das Abrunden und Ablösen der Zellen, Blasenbildung an der Zellmembran („Blebbing“) und – seltener zu sehen – die Auflösung der Kernmembran.

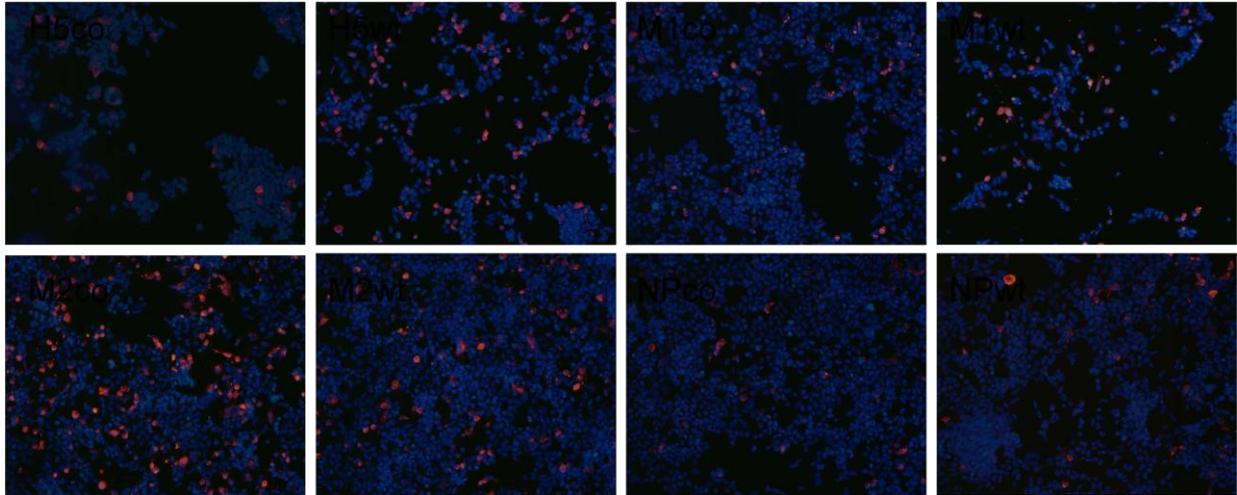


Abbildung 5 – Transfektion von Plasmid-DNA der prospektiven Immunogene in 293T-Zellen mit Polyfect zur Darstellung der Expression, nach 2d wurde mit 4% PFA und 1% Tween20 fixiert und permeabilisiert, mit fetalem Kälberserum blockiert, mit den jeweils entsprechenden monoklonalen Antikörpern inkubiert und mit Cy3-markiertem Sekundäntikörper behandelt (rote Färbung), durch die Fixierung und Permeabilisierung wurden alle Zellen bei Zugabe von DAPI blau gegengefärbt.

Die Expression der 8 erzeugten, H5N1-basierten Immunogene – H5, M1, M2 und NP, jeweils codon optimiert oder Wildtyp – wurde durch Transfektion in Zellkultur nachgewiesen (Abb.5).

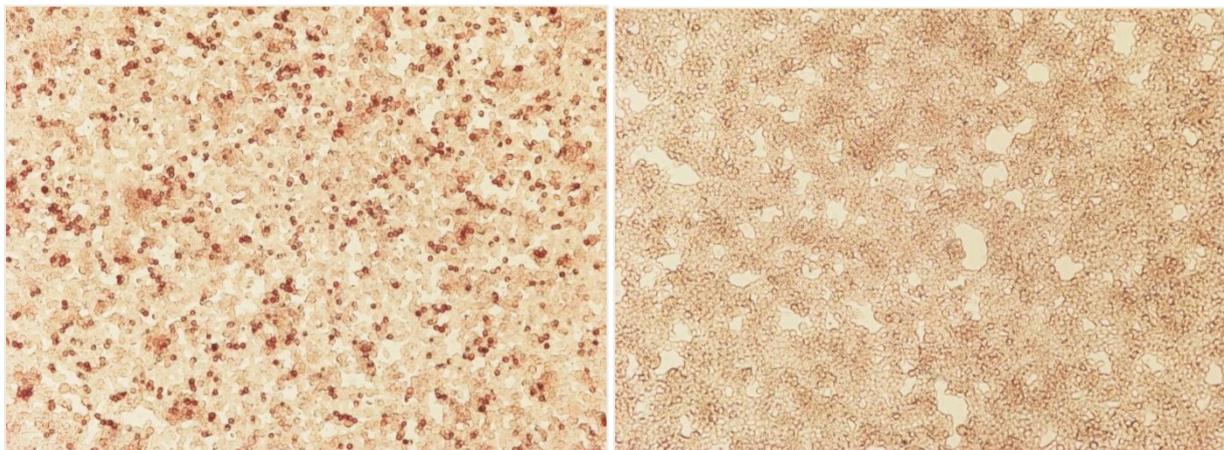


Abbildung 6 – Transfektion von pTH-H5wt in 293T-Zellen mit Polyfect, nach Inkubation mit Anti-H5N1-Serum angefärbt mit AEC durch Peroxidase-gekoppelten anti-IgY-Antikörper

Da zu Beginn der Arbeit keine funktionierenden monoklonalen Antikörper gegen das Oberflächenprotein H5 zur Verfügung standen, wurde die Expression der ersten beiden fertigen Konstrukte, H5wt und M2co, per Immunoperoxidase-Immunfärbung (IPA) mittels eines anti-H5N1-Hühnerserums nachgewiesen (Abb. 6). Das Serum stammte von Ilaria Capua, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie in Legnaro, Italien. Während das H5 mit diesem Serum darstellbar war, enthielt es vermutlich keine Antikörper gegen M2, was durch das seltene Auftreten von anti-M2-Antikörpern wegen der kurzen extrazellulären Domäne von nur 24 Aminosäuren erklärt werden kann. Mikroskopische Nachweise erlauben neben dem Nachweis der Expression eines Transgens auch eine visuelle Abschätzung der Zytotoxizität durch das Transgen unter der hohen Expressionrate des CMV-Promoters.

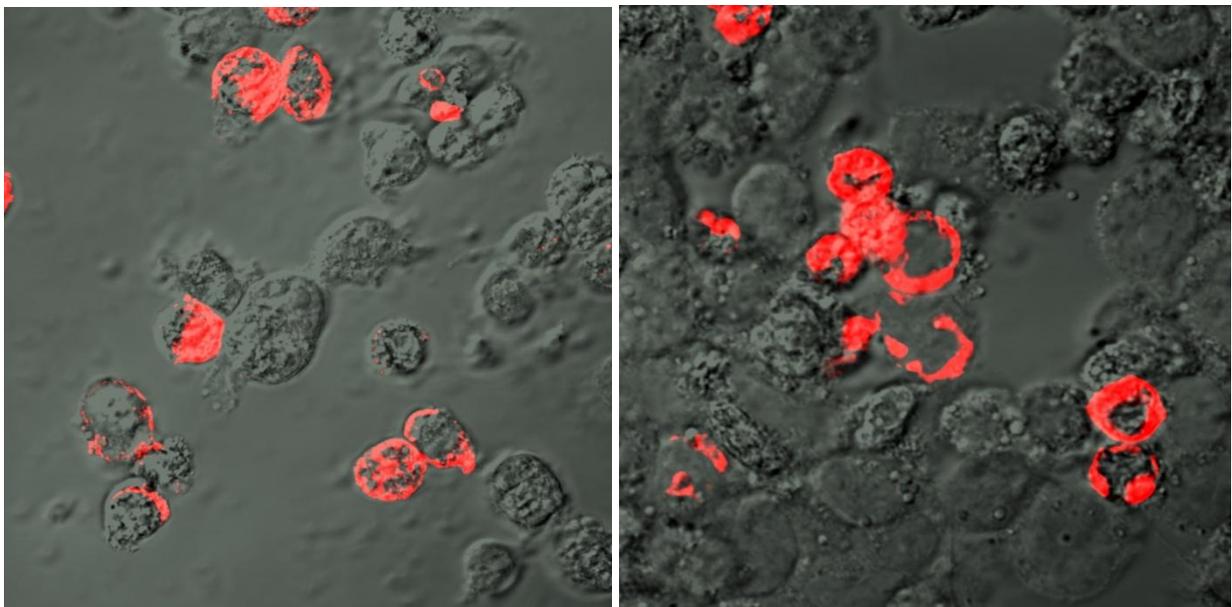


Abbildung 7 – Darstellung der Expression der Membranproteine H5wt (links) und M2co (rechts) per Immunfluoreszenz mit anti-V5-Tag-Cy3 (rot) in der Zellmembran nach Polyfect-Transfection von 293T-Zellen

Die Darstellung der Expression der Membranproteine per Immunfluoreszenzmikroskopie erlaubt eine Überprüfung der Lokalisation des Transgens im gewünschten Zellkompartiment, da durch das Anfügen des C-terminalen V5-Tags die Konformation eines Transgens und dessen Lokalisation beeinflusst werden kann (Abb. 7). Man erkennt die Färbung der Zellmembran durch Akkumulation des jeweiligen Membranproteins.

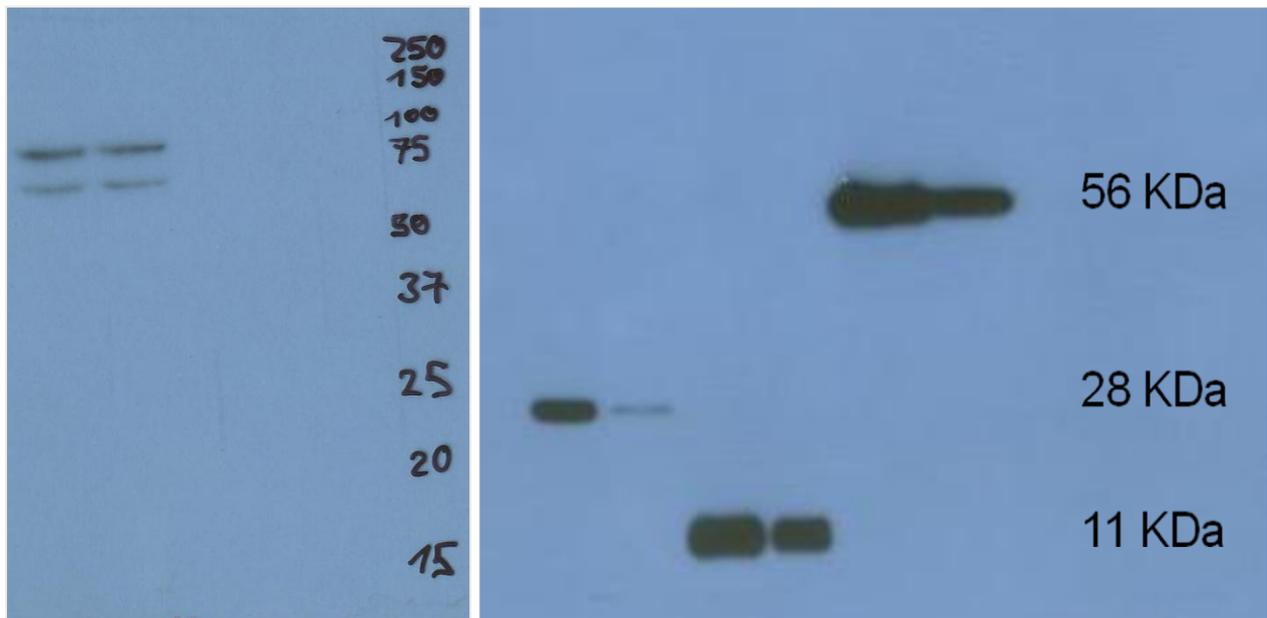


Abbildung 8 – Antigen-Expression der transfizierten HEK293T-Zellen im Western Blot mit Anti-V5-HRP-Sekundärantikörpern von H5co und H5wt im linken Bild, im rechten Bild M1co, M1wt, M2co, M2wt, NPco und NPwt

Die Expressionsstärke und mögliche Abbauprodukte der Transgene wurden per Western Blot untersucht. Bei H5co und H5wt erkennt man die Bande des Spaltprodukts einer Proteolyse der „multi-basic cleavage site“ unterhalb der Bande des Hämagglutinins voller Länge (Abb. 8), welche charakteristisch ist für H5N1-Influenzaviren. Durch die Proteolyse wird erst die Bereitstellung der Fusionsdomäne des Hämagglutinins ermöglicht, die nachfolgende Ansäuerung im Endosomen leitet daraufhin den Fusionsvorgang des Influenzavirus-Zelleintritts ein. Die codon-optimierte Variante der jeweiligen Influenzogene ist stärker exprimiert. Die Expression der beiden Varianten des Hämagglutinins (co & wt) ist im Vergleich zu den anderen Expressionskonstrukten relativ gering, daher wurde der linke Western Blot 5 min. belichtet, während der rechts abgebildete Western Blot 5 sek. belichtet wurde. Die Chemilumineszenz der Bande des M2co konnte in der Dunkelkammer mit dem Auge gesehen werden.

Expression der codon-optimierten Immunogene der Schweinegrippe H1N1

Die Expression der Immunogene in Zellkultur wurde bei M1cosw und NPcosw im Western Blot überprüft. Das H1cosw wurde als Membranprotein per Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen (Abb.9). Man erkennt beim H1cosw eine verstärkte vesikuläre Anreicherung im Bereich der Zellmembran. Der Western Blot wurde 10 Sekunden belichtet.

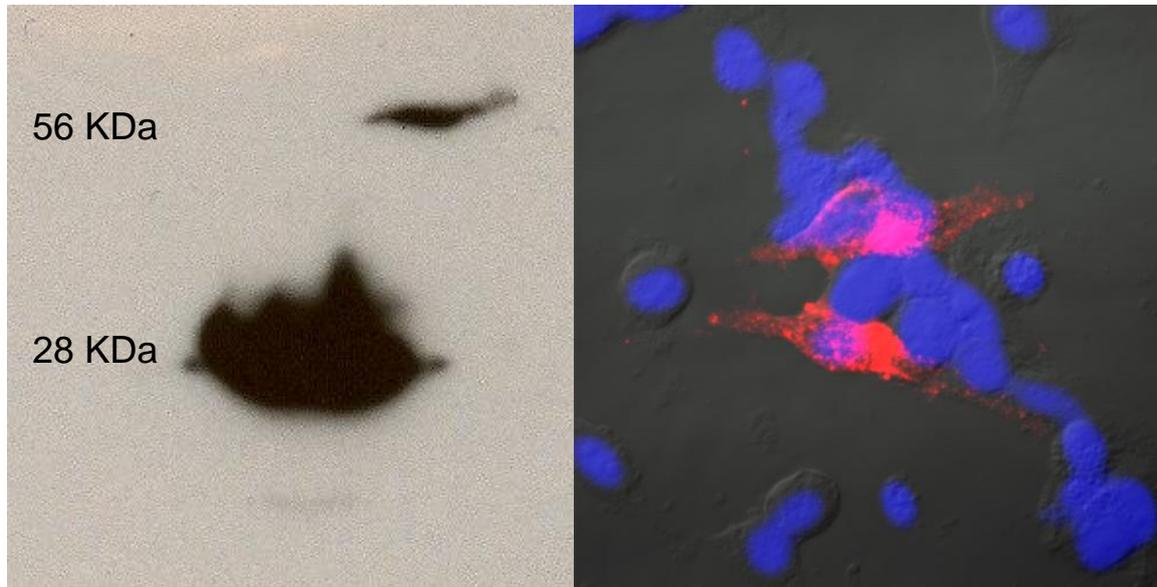


Abbildung 9 – Western Blot der Expression von M1cosw und NPcosw im linken Bild und Immunfluoreszenz des H1cosw (rot); Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (blau) im rechten Bild

Expression des IL-21co im Western Blot

Man erkennt im Western Blot die Bande des IL-21co bei 15 KDa und darüber das Propeptid mit 17 KDa (Abb.10). Der Western Blot wurde 10 sek. belichtet. Die Immunfluoreszenz des sekretorischen Proteins IL-21 zeigt eine vesikuläre Verteilung.

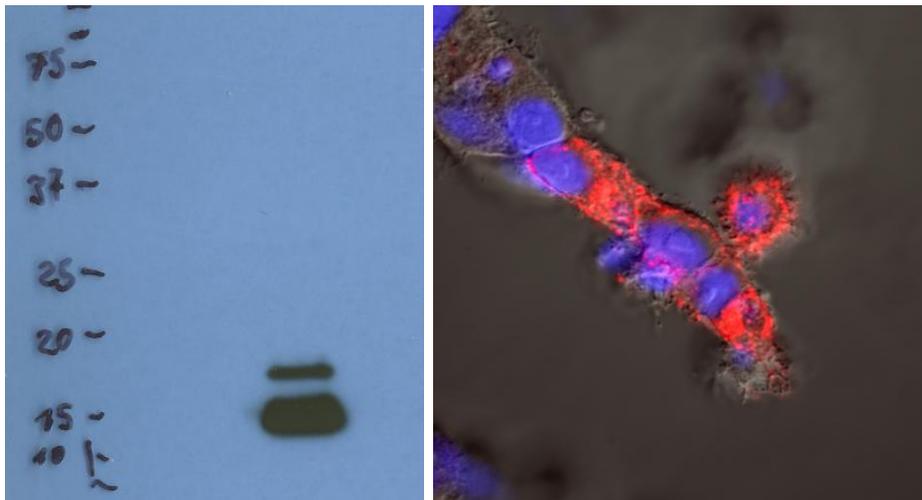


Abbildung 10 – Expression von IL21co aus HEK293T-Zellkultur im Western Blot (links) und Immunfluoreszenz (rechts) des IL21co (rot), Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (blau)

Plasmid-Reinheit

Zur Bestimmung des Lipopolysaccharid-Gehaltes (LPS) in einer Plasmidpräparation wurde die Eigenschaft von Makrophagen genutzt, nach einer Aktivierung des TLR4 diesen zu endozytieren. Nach 2h Inkubation mit LPS ist der TLR4 in geringerem Umfang auf der Zelloberfläche im FACS detektierbar (Abb. 11).

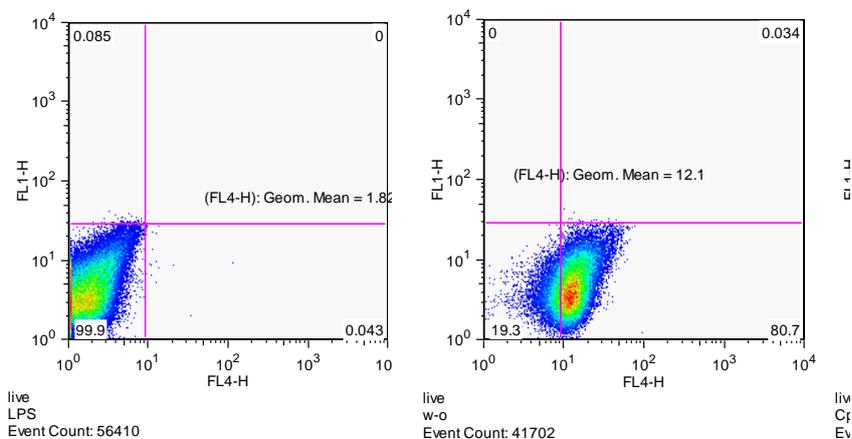


Abbildung 11 – TLR4-Oberflächenmarkierung mit 1,5 mg/ml LPS (links) oder ohne Zusätze (rechts) zum Medium

Die TLR4-positive Zellpopulation betrug im Normalzustand ohne Zugabe von LPS oder LPS-enthaltenden Plasmidpräparationen 80,7% der isolierten murinen Knochenmarksmakrophagen (Abb. 12). Nach Zugabe von 1,5mg/ml LPS in RPMI1640-Medium verschwand der Rezeptor innerhalb von 5h im CO₂-Inkubator fast vollständig (auf 0,04%) von der Zelloberfläche. Es wurden pro Ansatz 200.000 Zellen gemessen.

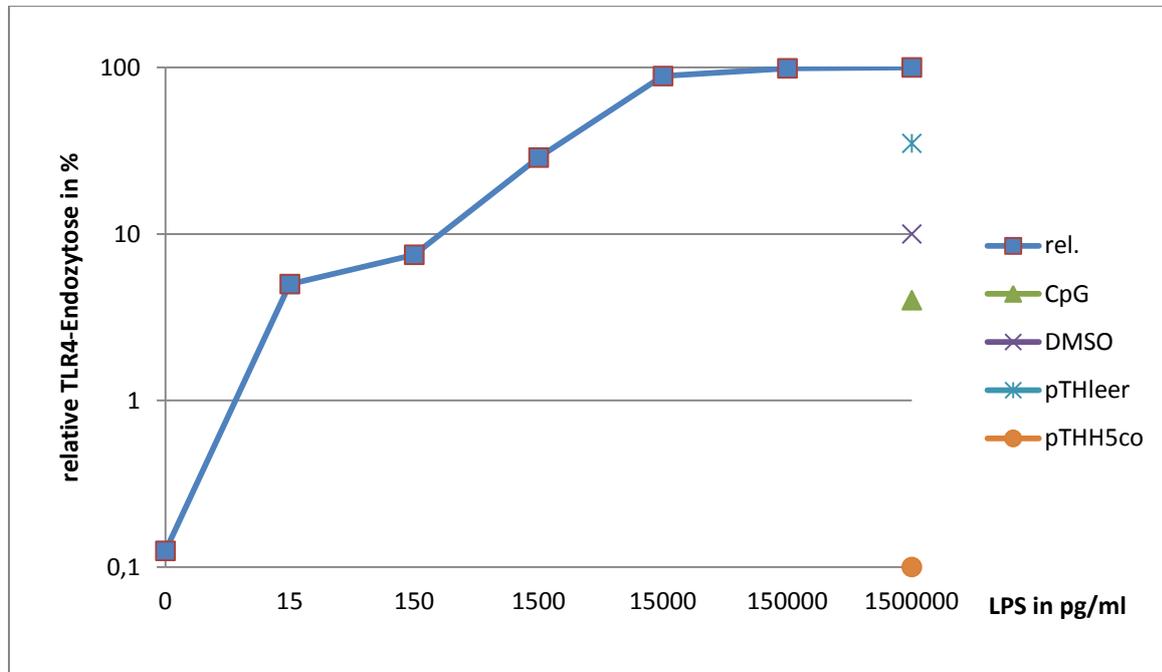


Abbildung 12 – LPS-Bestimmung mit Standardkurve über die Endozytose des TLR4 5h nach Inkubation mit unterschiedlichen LPS-Konzentrationen oder Plasmidpräparationen

Die Sensitivität dieses Nachweises lag zwischen 15 und 150 Pikogramm pro Milliliter. Unterhalb von 15µg/ml LPS scheint es einen logarithmischen Zusammenhang zu geben, mit dem man eine Standardkurve erstellen könnte. Die mittels des Qiagen® Endofree Maxiprep Kit gewonnenen Präparationen lagen bezüglich der LPS-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze, während per Qiagen® Maxiprep Kit gereinigte Plasmid-DNA (pTH-leer) noch zwischen 1,5 und 15µg/ml an LPS enthielten. Als Kontrolle der Einflüsse durch Apoptose wurde DMSO verwendet, als Kontrolle der Plasmid-eigenen immunostimulatorischen und TLR9-aktivierenden CpG-Motive wurde CpG eingesetzt. Der TLR4-Signalweg kreuzt den TLR9-Signalweg, trotzdem ist bei der hohen eingesetzten CpG-Konzentration nur eine minimale Stimulation des TLR4-Signalwegs messbar, vergleichbar mit der niedrigsten eingesetzten LPS-Konzentration von 15pg/ml.

Für Immunisierungszwecke wurden daher ausschließlich Endofree-Präparationen verwendet.

Phase I - Immunogene

Die vier Gene H5, M1, M2 und NP von Influenza H5N1 A/Vietnam/1194/2004 wurden hinsichtlich ihrer zellulären Immunantwort in C57Bl/6-Mäusen per ELISpot mit den korrespondierenden publizierten MHCI-präsentierten Peptiden untersucht (s. Anhang). Hierbei wurde auch der Effekt der Codon-Optimierung in 10 Gruppen zu je 10 Tieren untersucht. Die ersten 5 Tiere jeder Gruppe wurden mit je einem einzelnen Antigen immunisiert. Bei den Mäusen 6-10 wurden zusätzlich zum Antigen ein GM-CSF-codierendes Plasmid verimpft, während die ersten 5 Tiere stattdessen ein Plasmid ohne Transgen (pTH-Leer) erhielten, um die Masse der DNA und auch die Anzahl der darin enthaltenen immunmodulierenden CpG-Motive konstant zu halten.

ELISPOT-Ergebnisse der Einzelgenimmunisierungen

Die zytotoxische T-Zell-Antwort in Mäusen nach Immunisierung mit beiden Varianten des H5-Gens war gering oder abwesend (Abb. 13).

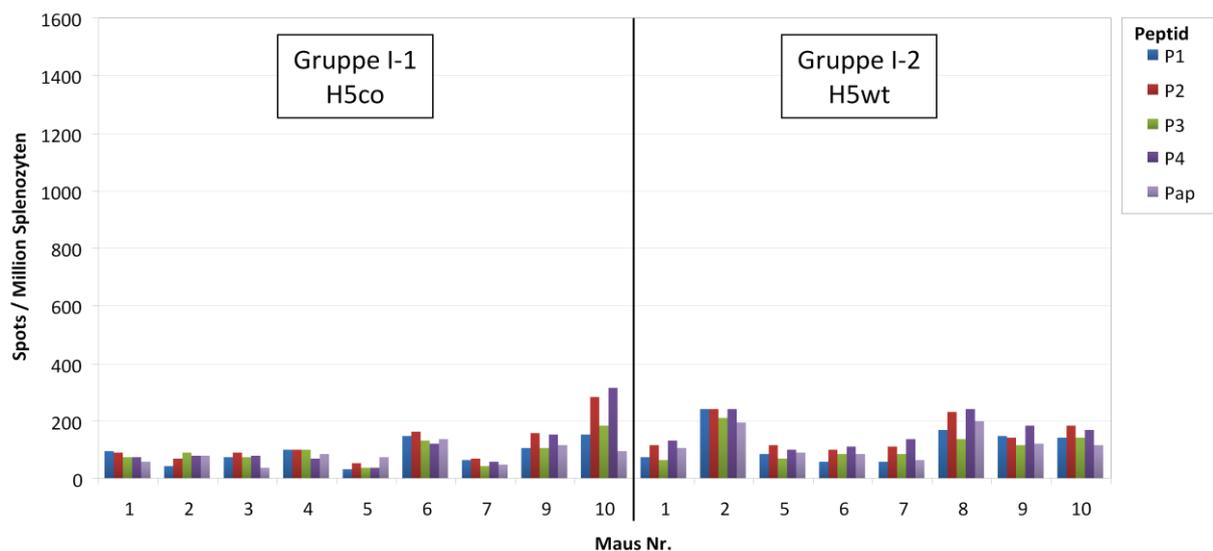


Abbildung 13 – Induktion Interferon- γ -sezernierender Splenozyten durch Immunisierungen mit Codon-optimiertem H5 (H5co, G1) oder dem Wildtypgen (H5wt, G2), nach Stimulation der Splenozyten im ELISpot mit publizierten Peptiden (im Anhang) oder einem PapE7-Kontrollpeptid

Gegen das immunodominante Peptid des M1 waren jedoch Reaktionen mittleren Ausmaßes messbar. In der Gruppe des Codon-optimierten M1 (Abb. 14) zeigten mit 5 von 10 Mäusen gegenüber 4 von 10 Mäusen in der Gruppe des Wildtyp-M1 eine höhere Anzahl von Mäusen, welche über 200 Spots pro Million Splenozyten aufwiesen.

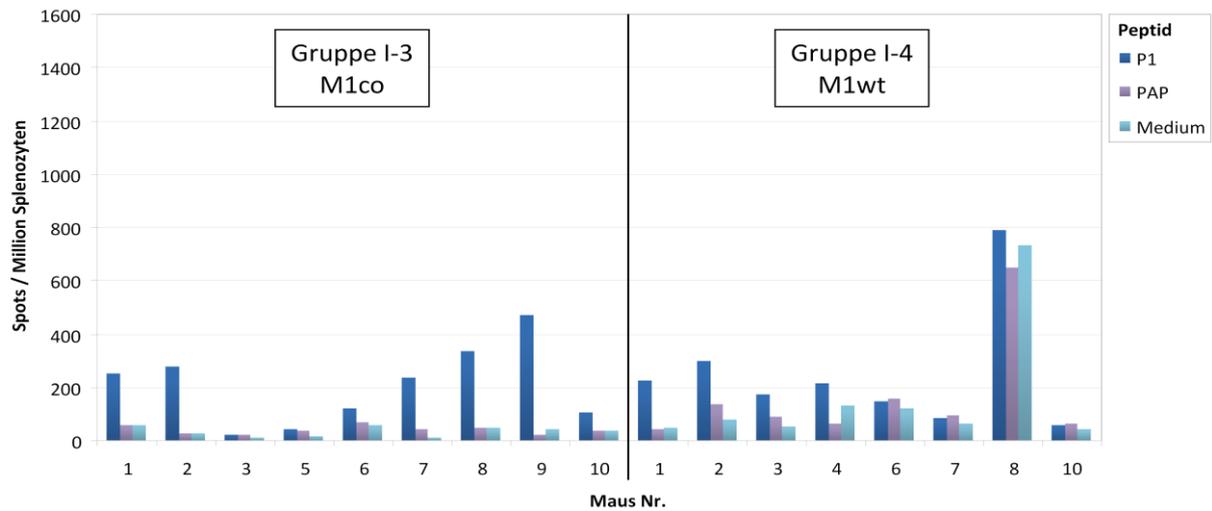


Abbildung 14 – Induktion Interferon- γ -sezernierender Splenozyten durch Immunisierungen mit Codon-optimiertem M1 (M1co, G3) oder dem Wildtypgen (M1wt, G4), nach Stimulation der Splenozyten im ELISpot mit einem publizierten Peptid (im Anhang), einem PapE7-Kontrollpeptid oder ohne Stimulation

Beim M2, bei dem Peptide des gesamten Proteins (15-mere mit einer Überlappung von 5 Aminosäuren) untersucht wurden, waren in beiden Varianten Interferon- γ -sezernierende Zellen abwesend (Abb.15). Eine SYFPEITHI-Vorhersage der Bindung von Peptiden des M2 an H2b bestätigt die Vermutung, dass kein M2-Peptid an MHCI in C57Bl/6-Mäusen präsentiert werden kann.

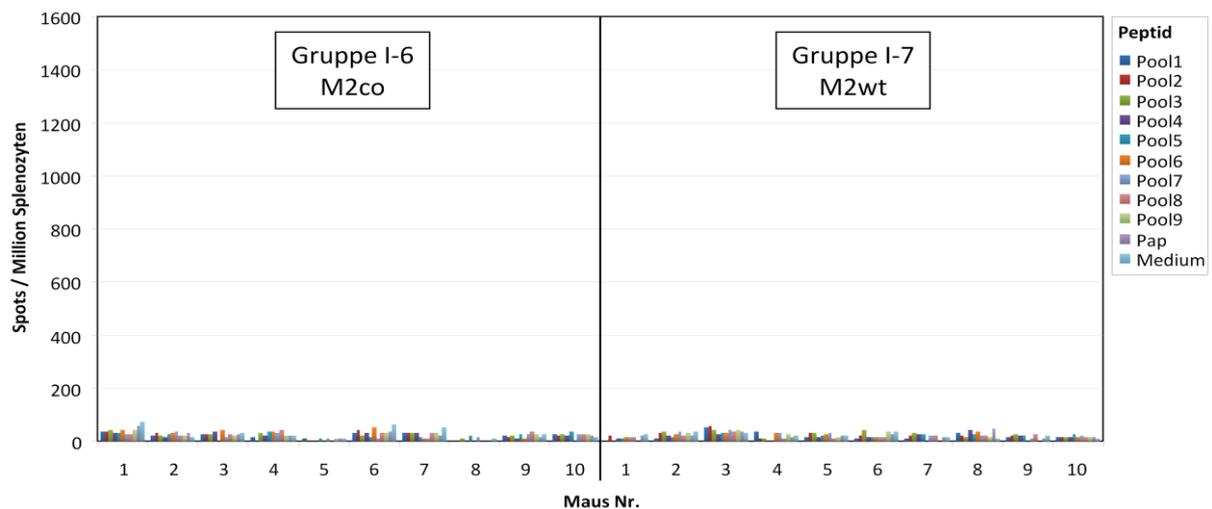


Abbildung 15 – Induktion Interferon- γ -sezernierender Splenozyten durch Immunisierungen mit Codon-optimiertem M2 (M2co, G6) oder dem Wildtypgen (M2wt, G7), nach Stimulation der Splenozyten im ELISpot mit einer Peptidpools aller M2-Peptide (im Anhang), einem PapE7-Kontrollpeptid oder ohne Stimulation

In beiden Gruppen des NP (co und wt) waren die höchsten Reaktionen zu verzeichnen (Abb. 16), bei dem immunodominanten Peptid NP₃₆₆₋₇₄ (P4: ASNENMDAM) wurde in den meisten Fällen die obere Nachweisgrenze des ELISpot erreicht. In allen Fällen lag die Anzahl Interferon- γ -sezernierender Zellen über 0,8 % der Splenozyten. In der mit dem Wildtyp immunisierten Gruppe war ein zweites CTL-Epitop P5 (RLIQNSITI) in 4 von 10 Mäusen über 200 Spots pro Million Splenozyten und ein drittes CTL-Epitop P1 (SVQRNLPDRTTVMAAFTGNTEG) in 3 von 10 Mäusen messbar. In der Codon-optimierten Gruppe zeigten dagegen 2 von 10 Mäusen eine Reaktion gegen das Peptid RLIQNSITI und eine Maus gegen das Peptid P2 (ARSALILRGSVAHKSLPACVYGP).

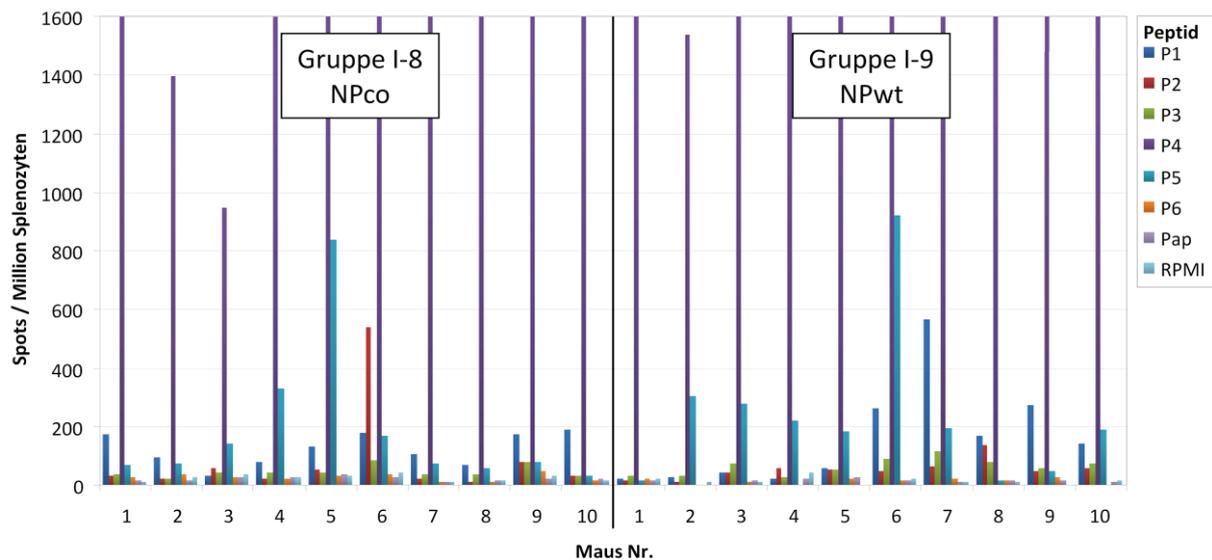


Abbildung 16 – Induktion Interferon- γ -sezernierender Splenozyten durch Immunisierungen mit Codon-optimiertem NP (NPco, G8) oder dem Wildtypgen (NPwt, G9), nach Stimulation der Splenozyten im ELISpot mit publizierten Peptiden (im Anhang), einem PapE7-Kontrollpeptid oder ohne Stimulation

Die Gruppe 5 mit dem Ovalbumin-exprimierenden Kontrollvektor zeigte trotz Wiederholungsversuch hohe unspezifische Reaktionen (Abb. 17 und 18), vermutlich gab es eine akute Infektion bei den Tieren in diesem Käfig. Als Kontrollgruppe existierte noch die mit Leervektor immunisierten Mäuse (Abb.19). Ab Phase III wurde daher ausschließlich mit dem Leervektor als Kontrolle gearbeitet.

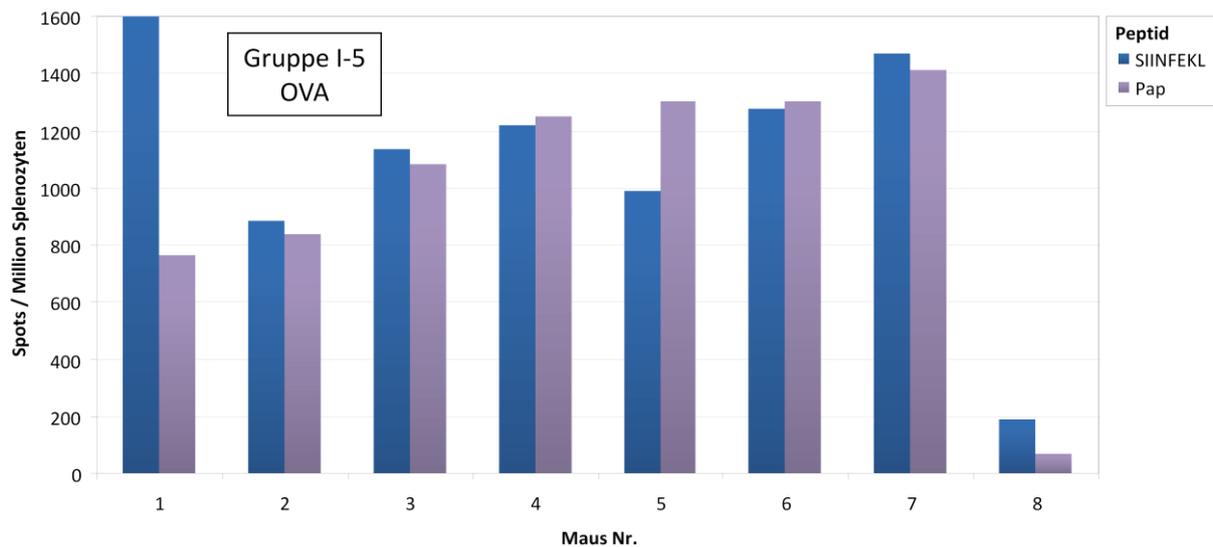


Abbildung 17 – Induktion Interferon- γ -sezernierender Splenozyten durch Immunisierungen mit OVA-exprimierenden Kontrollvektor (G5), nach Stimulation der Splenozyten im ELISpot mit einem publizierten Peptid (SIINFEKL) oder einem PapE7-Kontrollpeptid

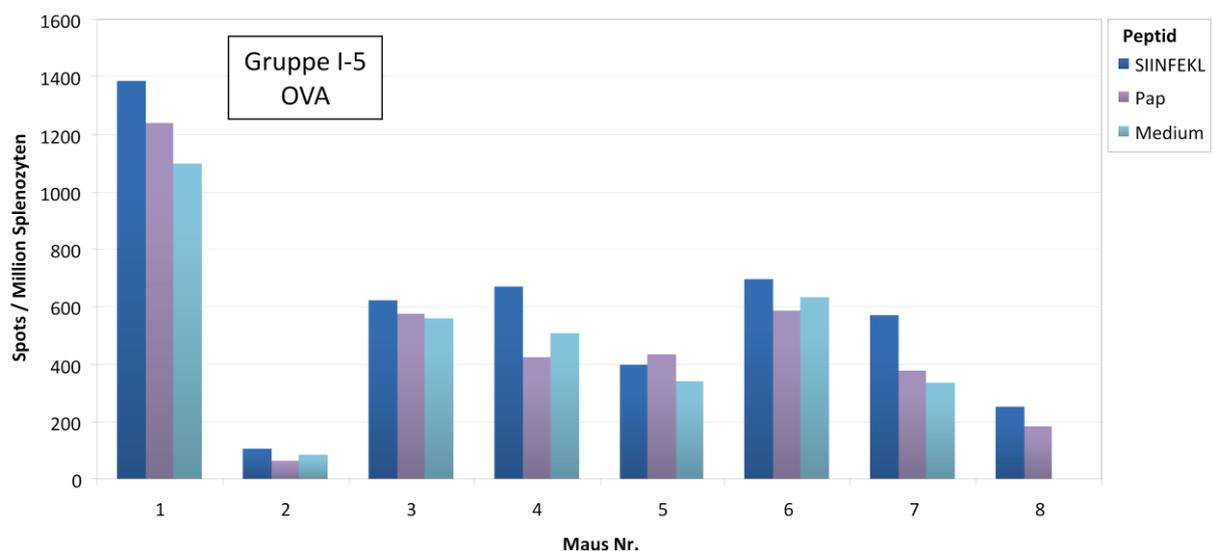


Abbildung 18 – Induktion Interferon- γ -sezernierender Splenozyten durch Immunisierungen mit OVA-exprimierenden Kontrollvektor (G5), nach Stimulation der Splenozyten im ELISpot mit einem publizierten Peptid (SIINFEKL), einem PapE7-Kontrollpeptid oder ohne Stimulation, ELISpot-Wiederholungsversuch wegen Reaktionen auf das Kontrollpeptid PapE7

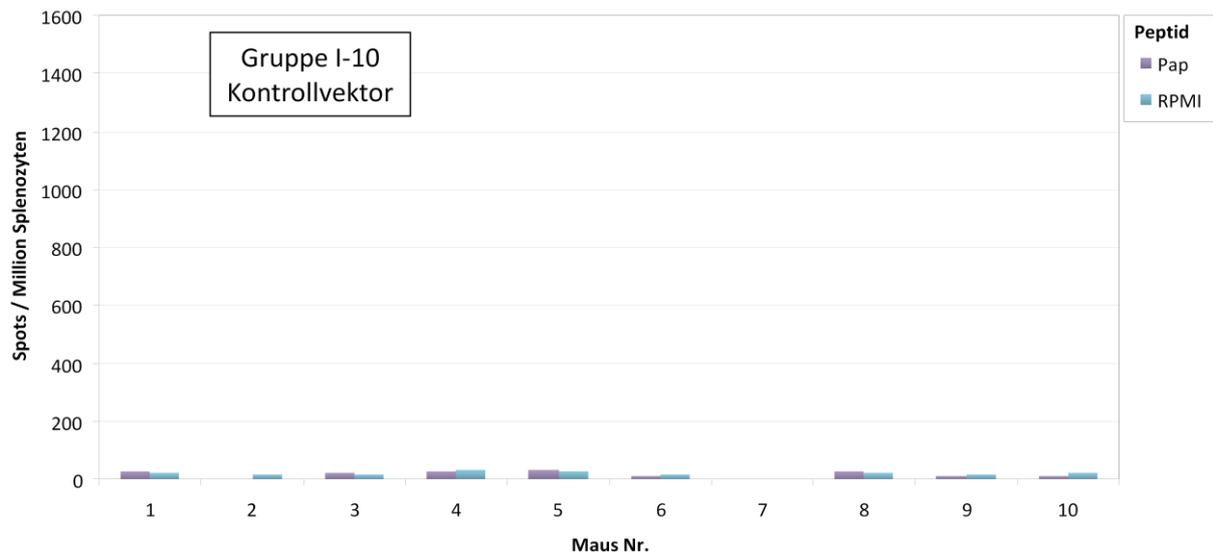


Abbildung 19 – Induktion Interferon- γ -sezernierender Splenozyten durch Immunisierungen mit leerem Kontrollvektor (G10), nach Stimulation der Splenozyten im ELISpot mit einem PapE7-Kontrollpeptid oder ohne Stimulation

ELISA-Zeitverläufe der Einzelgen-Immunisierungen

Die Induktion von Antikörpern erreichten bei beiden H5 Konstrukten (H5co und H5wt) in fast allen Tieren hohe Werte, beim M1co (Abb. 22) war die Ansprechrate höher als bei M1wt (Abb. 23). Auch beim NPco (Abb. 24) war die Ansprechrate höher, jedoch war die Höhe der erreichten Antikörpertiter gegen das Codon-optimierte NP niedriger als bei der Wildtypvariante (Abb. 25). Man erkennt in allen ELISA-Zeitverläufen den Anstieg der Antikörpertiter nach Erst- und Zweitimmunisierung.

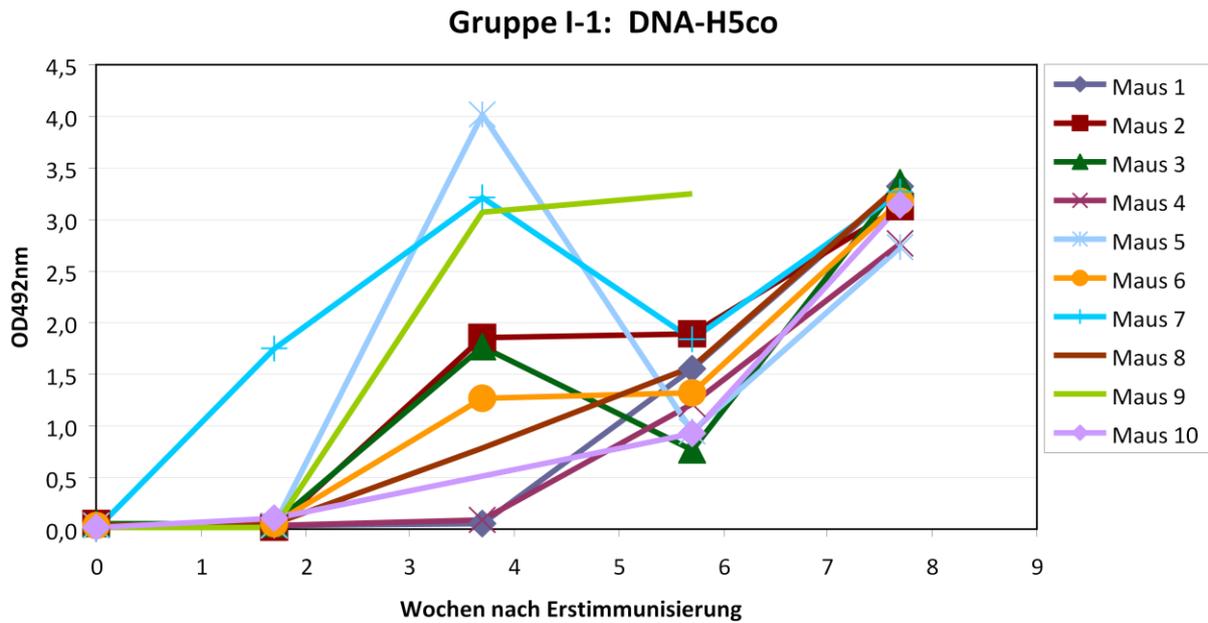


Abbildung 20 – Induktion von Antikörpern durch Immunisierungen mit Codon-optimiertem H5 (H5co, G1), Seren immunisierter Mäuse von unterschiedlichen Zeitpunkten wurden im ELISA auf Antikörperbindung an H5-Antigen untersucht

Die Antikörpertiter von H5co waren aufgrund der stärkeren Expression höher als die Titer des H5wt. Die anti-H5-Antikörper zeigten erwartungsgemäß höhere Titer als bei den cytosolischen Antigenen M1 und NP.

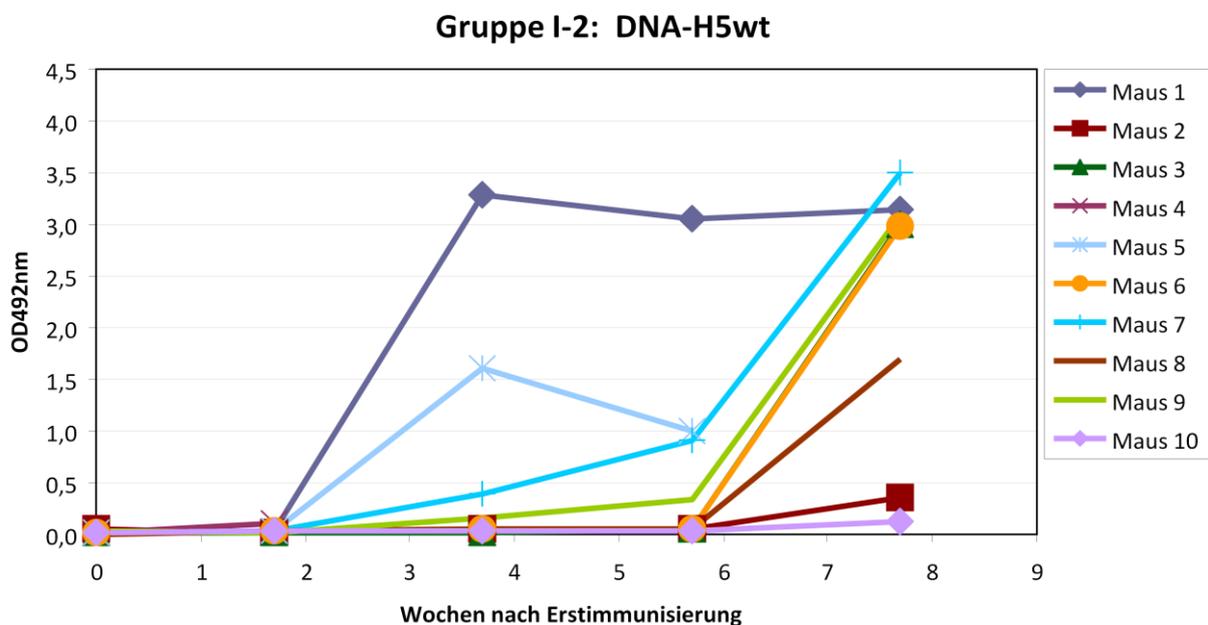


Abbildung 21 – Induktion von Antikörpern durch Immunisierungen mit wildtyp H5 (H5wt, G2), Seren immunisierter Mäuse von unterschiedlichen Zeitpunkten wurden im ELISA auf Antikörperbindung an H5-Antigen untersucht

Gruppe I-3: DNA-M1co

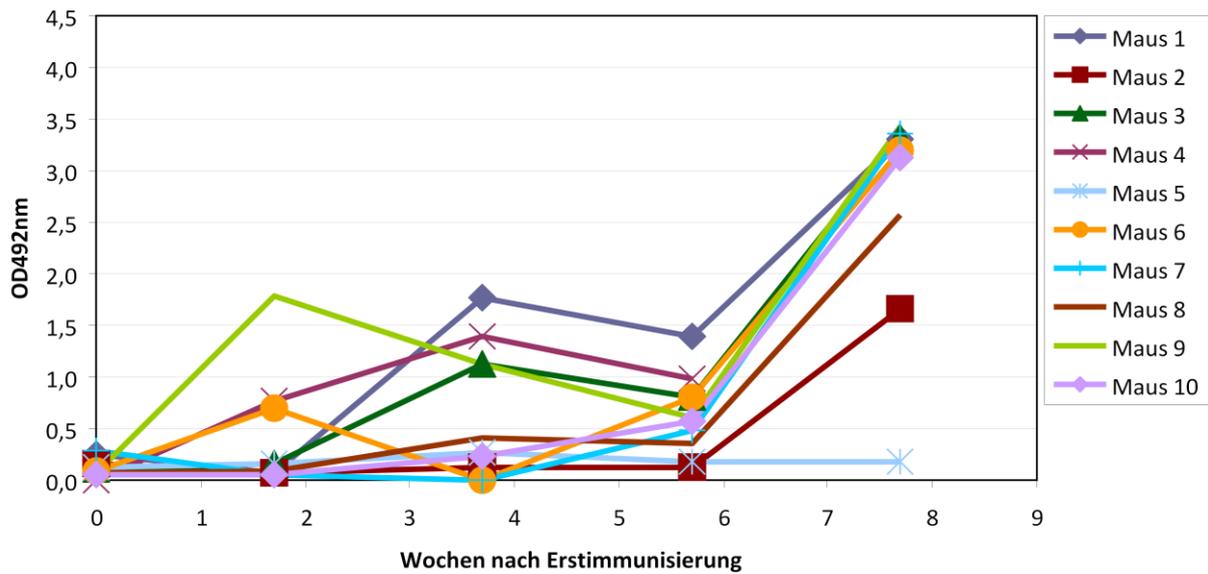


Abbildung 22 – Induktion von Antikörpern durch Immunisierungen mit Codon-optimiertem M1 (M1co, G3), Seren immunisierter Mäuse von unterschiedlichen Zeitpunkten wurden im ELISA auf Antikörperbindung an M1-Antigen untersucht

Auch bei M1 zeigten sich höhere Titer beim Codon-optimierten Konstrukt M1co im Vergleich zu M1wt, welches eine schwache Wirkung der Erstimmunisierung aufweist.

Gruppe I-4: DNA-M1wt

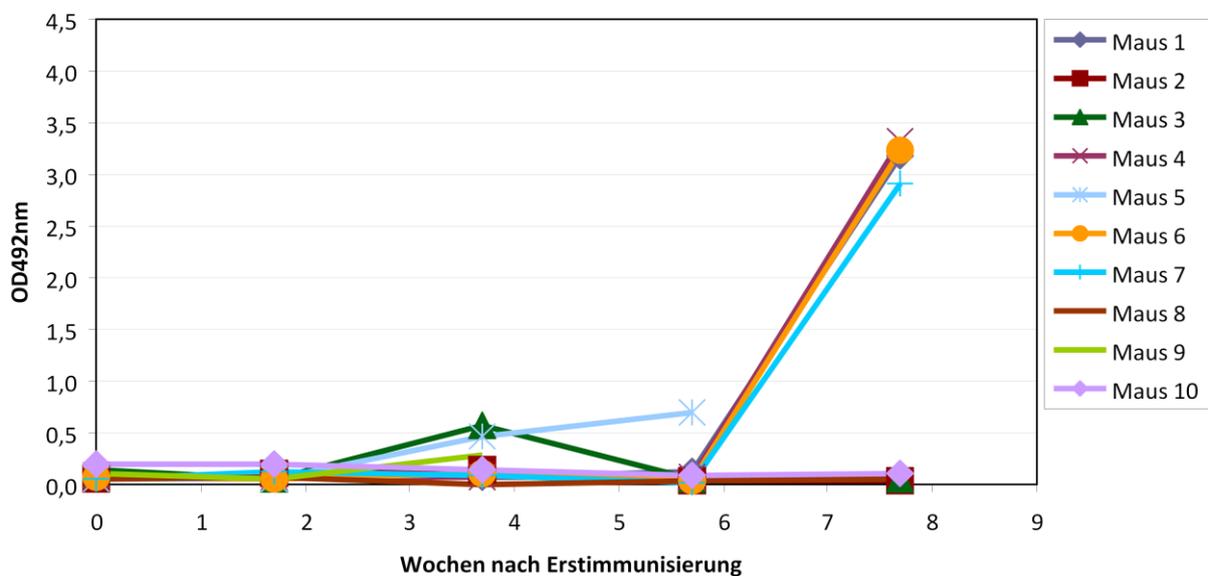


Abbildung 23 – Induktion von Antikörpern durch Immunisierungen mit wildtyp M1 (M1wt, G4), Seren immunisierter Mäuse von unterschiedlichen Zeitpunkten wurden im ELISA auf Antikörperbindung an M1-Antigen untersucht

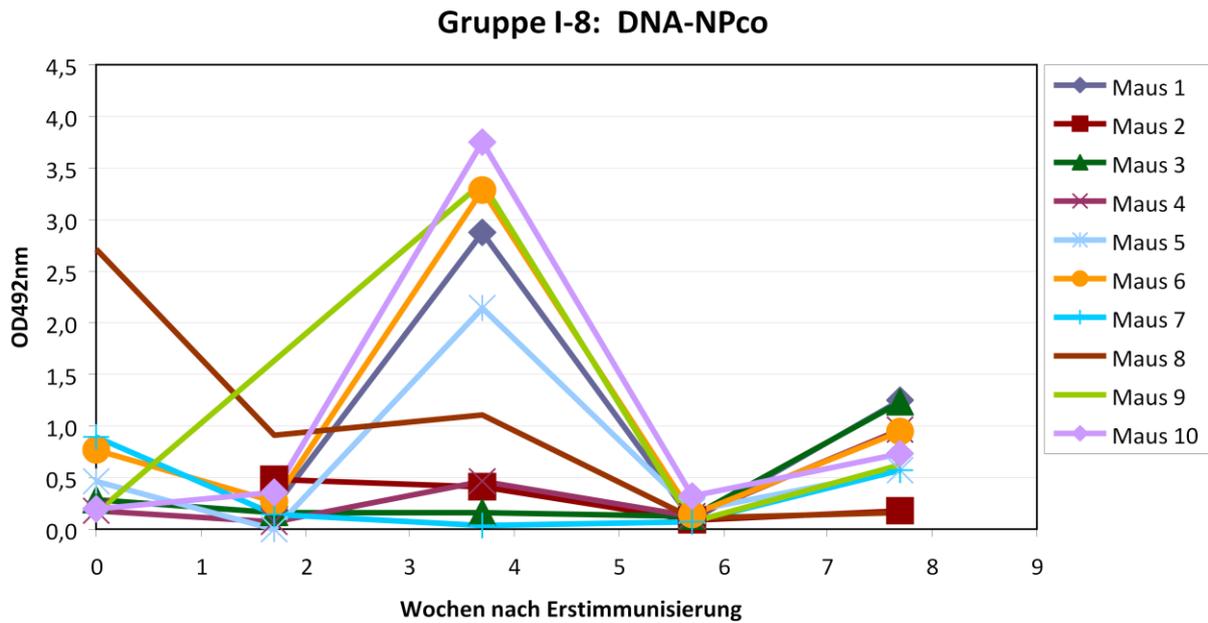


Abbildung 24 – Induktion von Antikörpern durch Immunisierungen mit Codon-optimiertem NP (NPco, G8), Seren immunisierter Mäuse von unterschiedlichen Zeitpunkten wurden im ELISA auf Antikörperbindung an NP-Antigen untersucht

Beim NPco zeigten sich vermutlich aufgrund der stärkeren Expression höhere Titer nach Erstimmunisierung, jedoch wurde eine Inhibition der Wirkung der Zweitimmunisierung beobachtet. Das NPwt wies niedrigere Titer der Erstimmunisierung auf, erreichte aber höhere Endtiter.

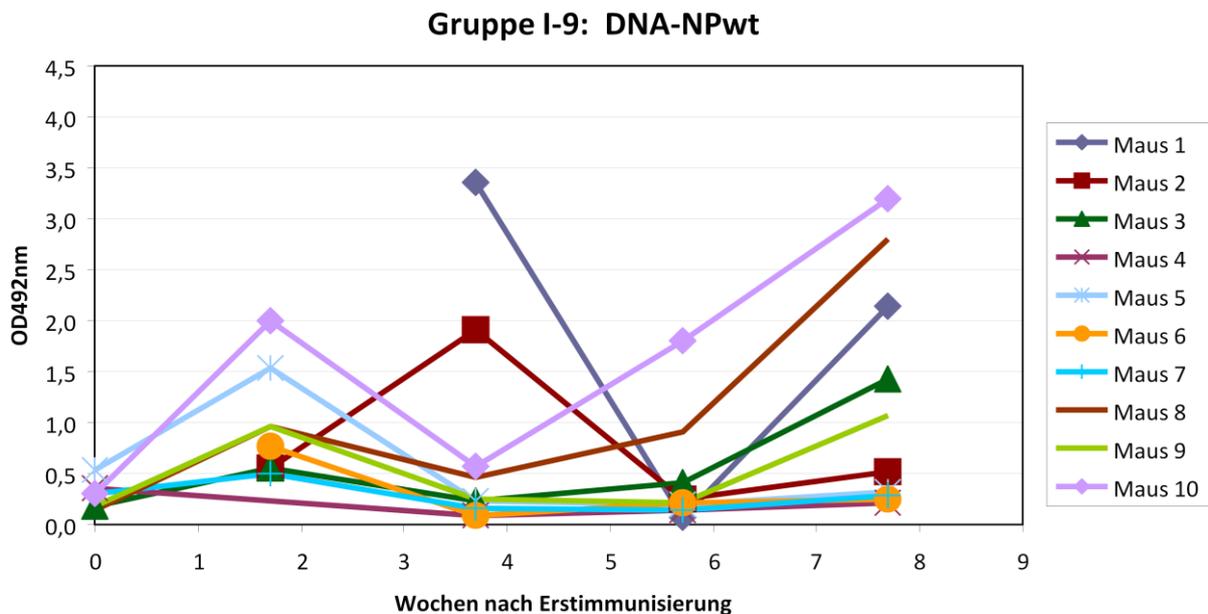


Abbildung 25 – Induktion von Antikörpern durch Immunisierungen mit wildtyp NP (NPwt, G9), Seren immunisierter Mäuse von unterschiedlichen Zeitpunkten wurden im ELISA auf Antikörperbindung an NP-Antigen untersucht

ELISA-Endpunkte der Einzelgen-Immunisierungen

Die Antikörpertiter gegen H5- und M1-Antigen waren in den Immunisierungsgruppen der Codon-optimierten Konstrukte des H5co und M1co höher als bei den Wildtypvarianten (Abb. 26).

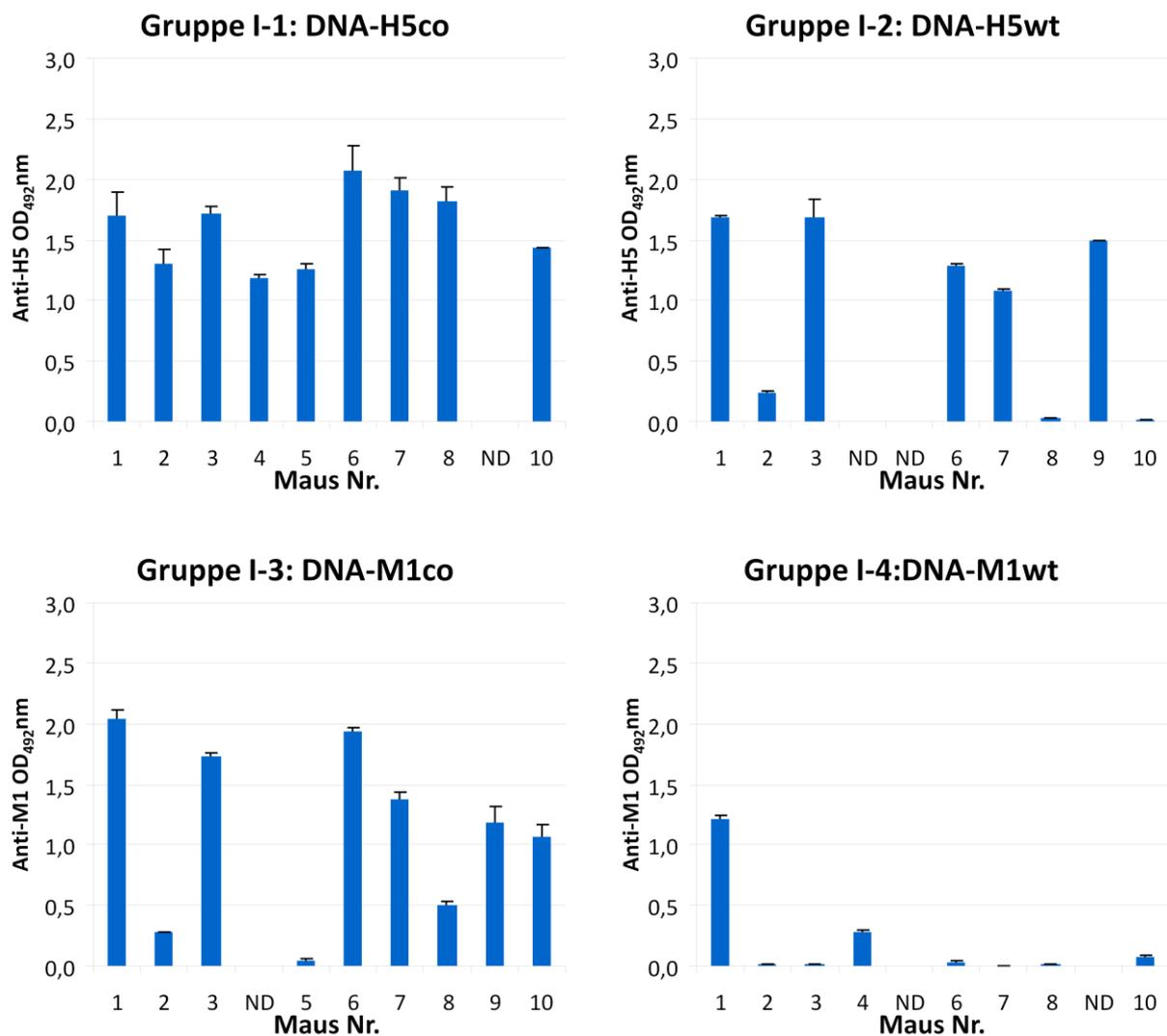


Abbildung 26 – Endpunkte der Antikörperinduktion mit H5- oder M1-beschichteten ELISA-Platten, Seren immunisierter Mäuse wurden im ELISA auf Antikörperbindung an adsorbiertes Antigen untersucht

Bei der NP-Immunsierung war die Induktion von anti-NP-Antikörpern trotz der stärkeren Expression des NPco höher bei NPwt-immunisierten Mäusen (Abb. 27).

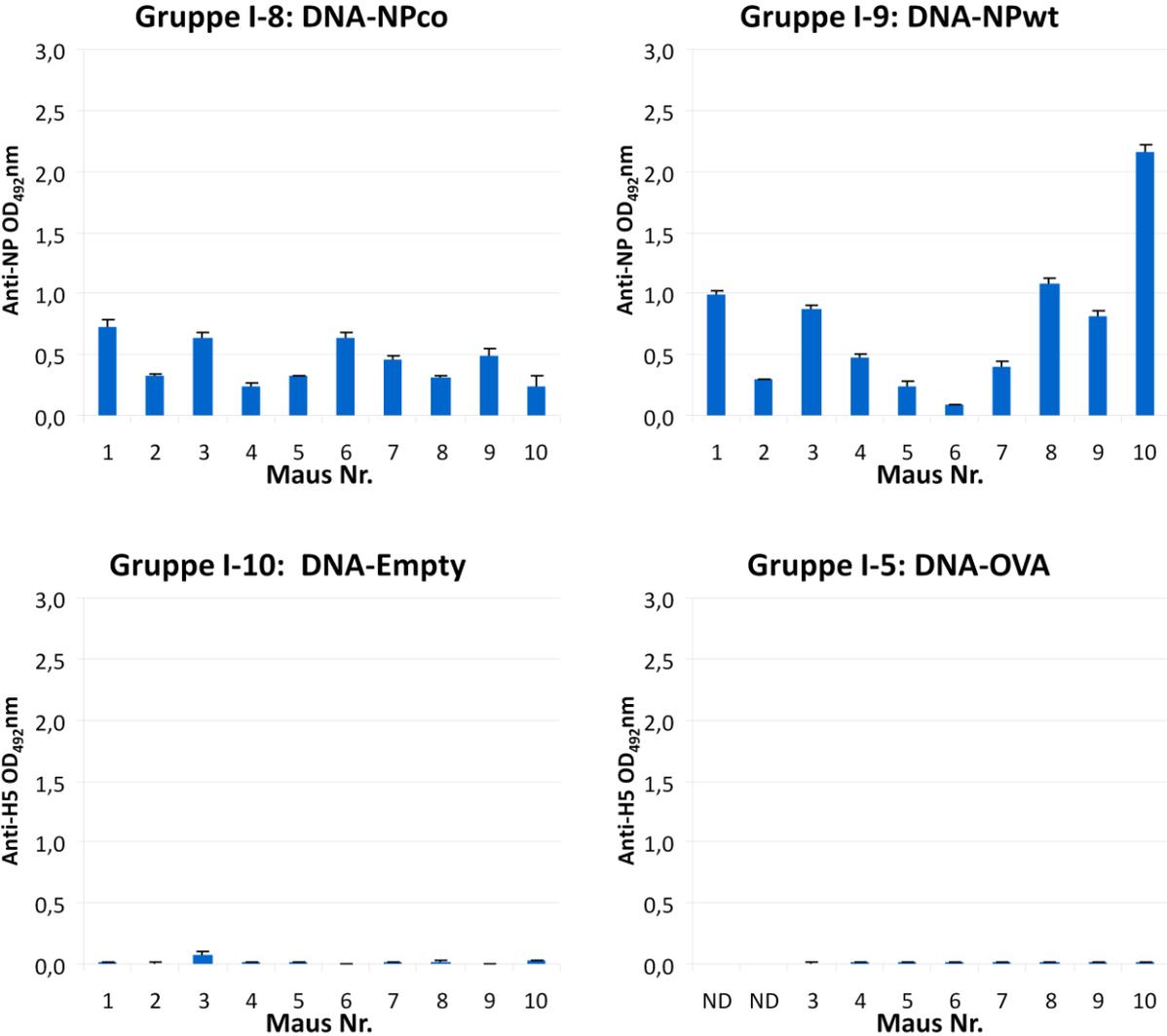


Abbildung 27 – Endpunkte der Antikörperinduktion mit NP- oder H5-beschichteten ELISA-Platten, Seren immunisierter Mäuse wurden im ELISA auf Antikörperbindung an adsorbiertes Antigen untersucht

Phase II - Adjuvantien

In der zweiten Impfreihe wurden verschiedene Kombinationen an Adjuvantien angewendet, um eine Steigerung der T_{H1} -vermittelten Immunreaktion in C57Bl/6 unter Beibehaltung der Verträglichkeit der Impfung zu erreichen. Die drei zur Verfügung stehenden Adjuvantien waren Plasmide mit den Genen für mL-12, mGM-CSF sowie das *de novo* per GC-PCR erzeugte Codon-optimierte murine Interleukin-21 (mIL21co). Da in der ersten Phase die Untersuchung der immundominanten CTL-Epitope abgeschlossen wurde, wurde in dieser Phase für jedes Antigen jeweils das ermittelte dominante Peptid eingesetzt. Für H5 wurden mit verbliebenen Zellen die dominanten Peptide (H5-peptide 82&83) bestimmt, für M1, M2 und NP wurden respektive die Peptide M1 b1, ein Pool aller M2-Peptide und NP b4 eingesetzt.

ELISPOT-Ergebnisse der Adjuvantienuntersuchungen

Auch in Phase II blieb die Tendenz ersichtlich, dass kaum eine zelluläre Reaktion auf H5co (Abb. 28) und M2co (Abb. 30) erfolgte, die Reaktion gegen M1co sporadisch und von mittlerer Stärke und die Reaktion gegen NPco mit Werten an der oberen Nachweisgrenze in allen NP-immunisierten Gruppen mit oder ohne Immunomodulatoren ausfiel. In der GM-CSF-behandelten Gruppe war die Ansprechrate am höchsten mit 100% der Werte an der oberen Nachweisgrenze des ELISpot, gefolgt von IL-12 mit 90% der Mäuse mit ELISpot-Werten an der Nachweisgrenze.

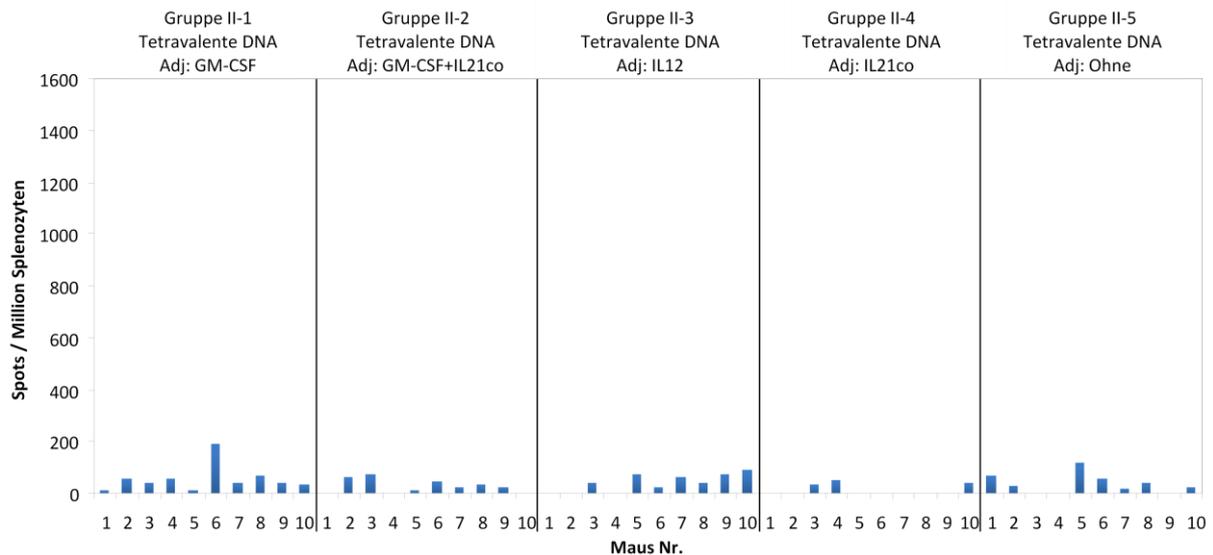


Abbildung 28 – Interferon- γ -Sekretion der Splenozyten immunisierter Mäuse nach Reaktivierung mit dem immunodominanten H5-Peptid im ELISpot, mit unterschiedlichen Immunomodulatoren im Impfstoff

In der Gruppe der M1co-immunisierten Mäuse war die Reaktion auf das immunodominante M1-Peptid sporadisch (Abb. 29), mit jeweils einer Maus mit Spots über dem Schwellenwert von 200 Spot/Million Splenozyten in der unmodulierten, der GM-CSF-, der GM-CSF+IL-21- und der IL-21-behandelten Gruppe. Einzig in der Gruppe des IL-12-modulierten Impfstoffs reagierten 3 von 10 Mäusen auf das immunodominante M1-Peptid.

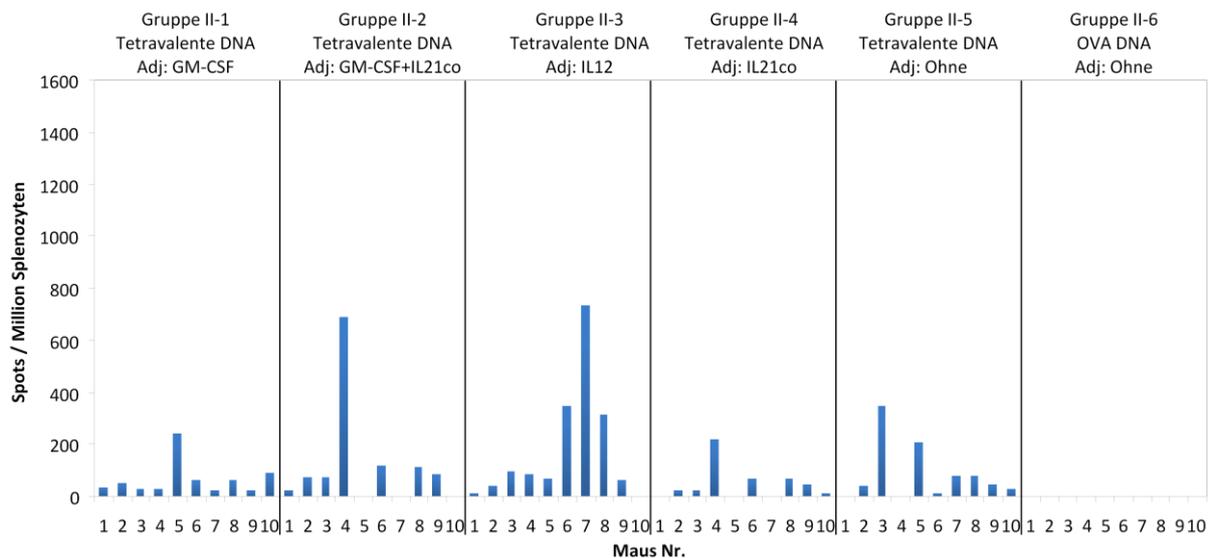


Abbildung 29 – Interferon- γ -Sekretion der Splenozyten immunisierter Mäuse nach Reaktivierung mit dem immunodominanten M1-Peptid im ELISpot, mit unterschiedlichen Immunomodulatoren im Impfstoff

Der ELISpot mit einer Mischung aller M2-Peptide (Abb. 30) bestätigte die Beobachtung aus Phase I, dass M2-abgeleitete Peptide nicht an den MHC-I-Komplexen des Haplotyps H2b von C57Bl/6-Mäusen präsentiert werden.

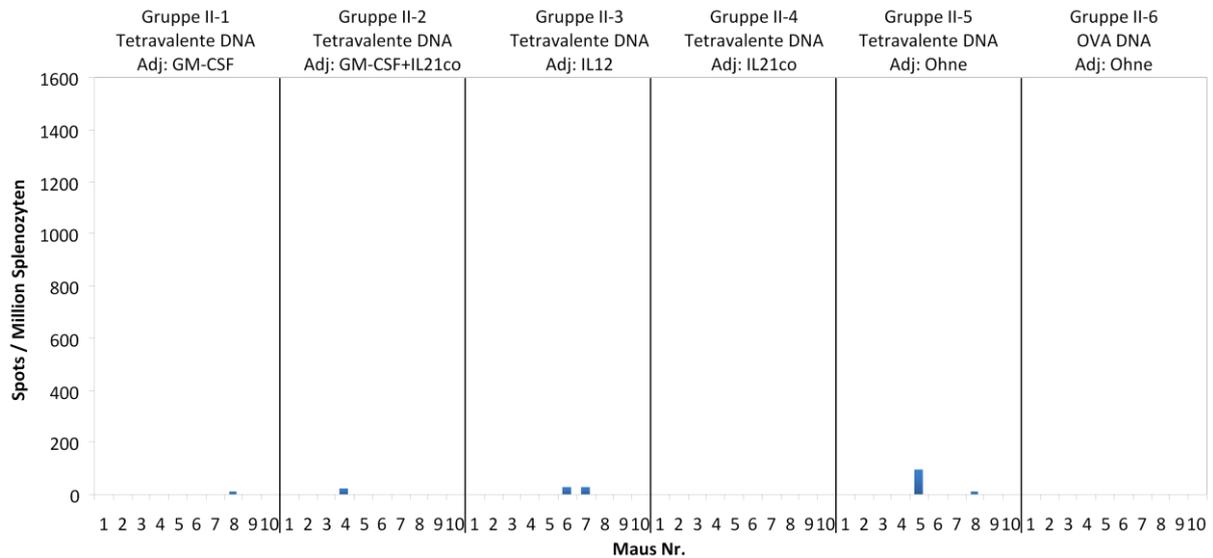


Abbildung 30 – Interferon- γ -Sekretion der Splenozyten immunisierter Mäuse nach Reaktivierung mit allen M2-Peptiden im ELISpot, mit unterschiedlichen Immunomodulatoren im Impfstoff

Die Reaktionen auf NP-abgeleitete Peptide im ELISpot war auch in Phase II bei allen Mäusen stark (Abb. 31). Bei der GM-CSF-Immunomodulation zeigten sich in allen Mäusen Werte an der oberen Nachweisgrenze von 1600 Spots pro Million Splenozyten, bei IL-12 reagierten 9 von 10 Mäusen und bei GM-CSF+IL21 noch 8 von 10 Mäusen. Daneben sind die IL-21-modulierte und die unmodulierte Gruppe mit nur einer Maus mit einer Spot-Anzahl an der oberen Nachweisgrenze.

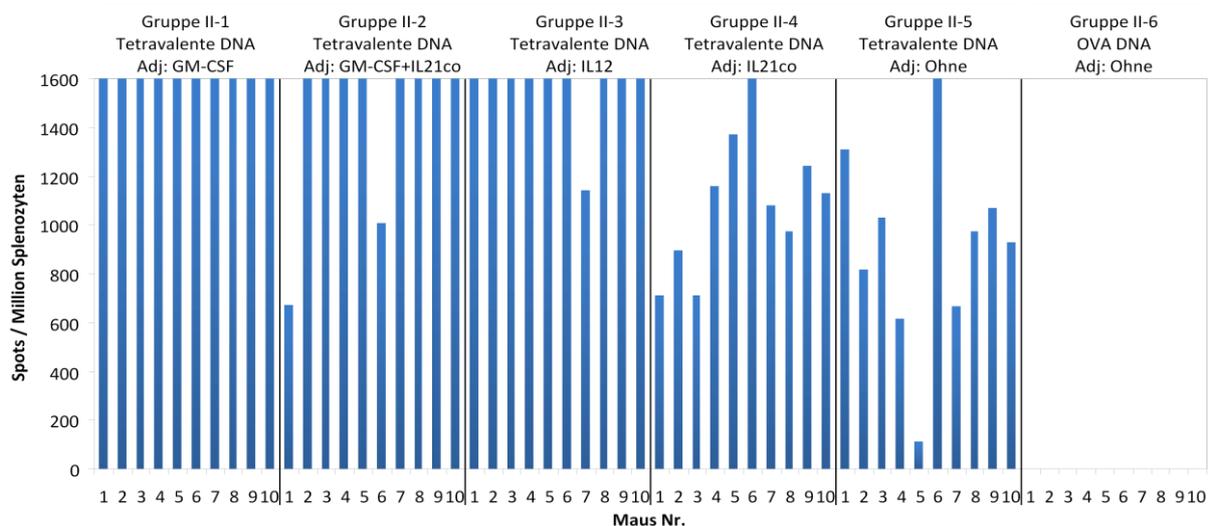


Abbildung 31 – Interferon- γ -Sekretion der Splenozyten immunisierter Mäuse nach Reaktivierung mit dem immunodominanten NP-Peptid im ELISpot, mit unterschiedlichen Immunomodulatoren im Impfstoff

ELISA-Ergebnisse der Adjuvantienuntersuchungen

Die Induktion von Antikörpern litt erwartungsgemäß unter dem Einsatz T_{H1} -polarisierender Immunomodulatoren (Abb. 32), bei H5co gab es auch nur ohne Immunomodulation eine Maus mit einer Extinktion im ELISA von über 0,5. Nur zwei Mäuse in der Gruppe ohne Immunomodulator reagierten im ELISA auf NP-Antigen, in der IL-21-verstärkten Gruppe reagierten zwei Mäuse.

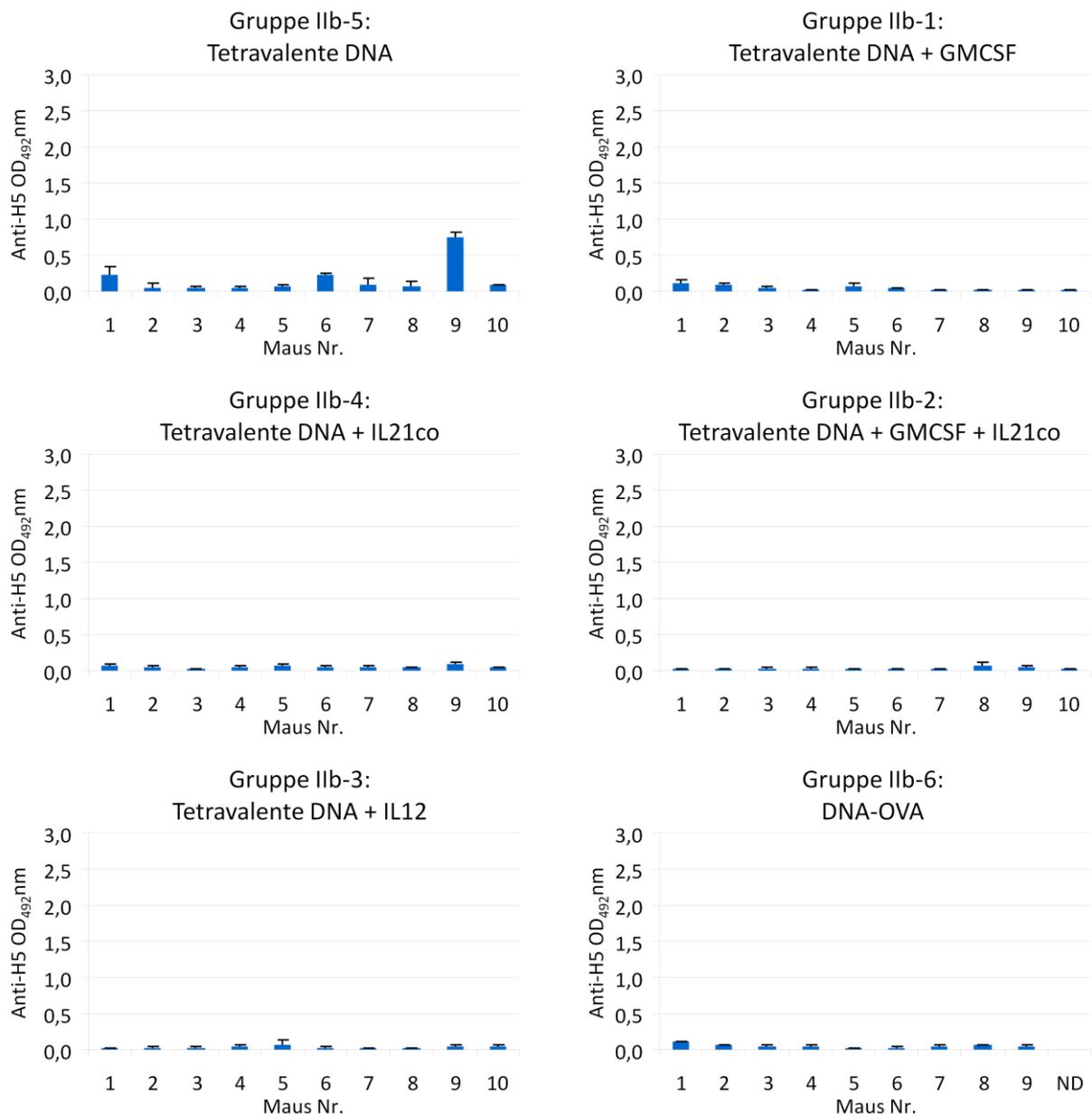


Abbildung 32 – anti-H5-Antikörperinduktion nach Immunisierung mit verschiedenen Immunomodulatoren, Endpunkte der Mäuseseren im ELISA mit adsorbiertem H5-Antigen

Eine Induktion von anti-M1-Antikörpern zeigte sich erwartungsgemäß nur in der unmodulierten Gruppe in 5 von 10 Tieren (Abb. 33), die T_{H2} -abhängigen Antikörpertiter sanken unter dem Einfluß T_{H1} -polarisierender Immunomodulatoren in T_{H1} -polarisierten C57Bl/6-Mäusen mit T_{H1} -polarisierenden Gene Gun-applizierten Plasmidimpfstoffen.

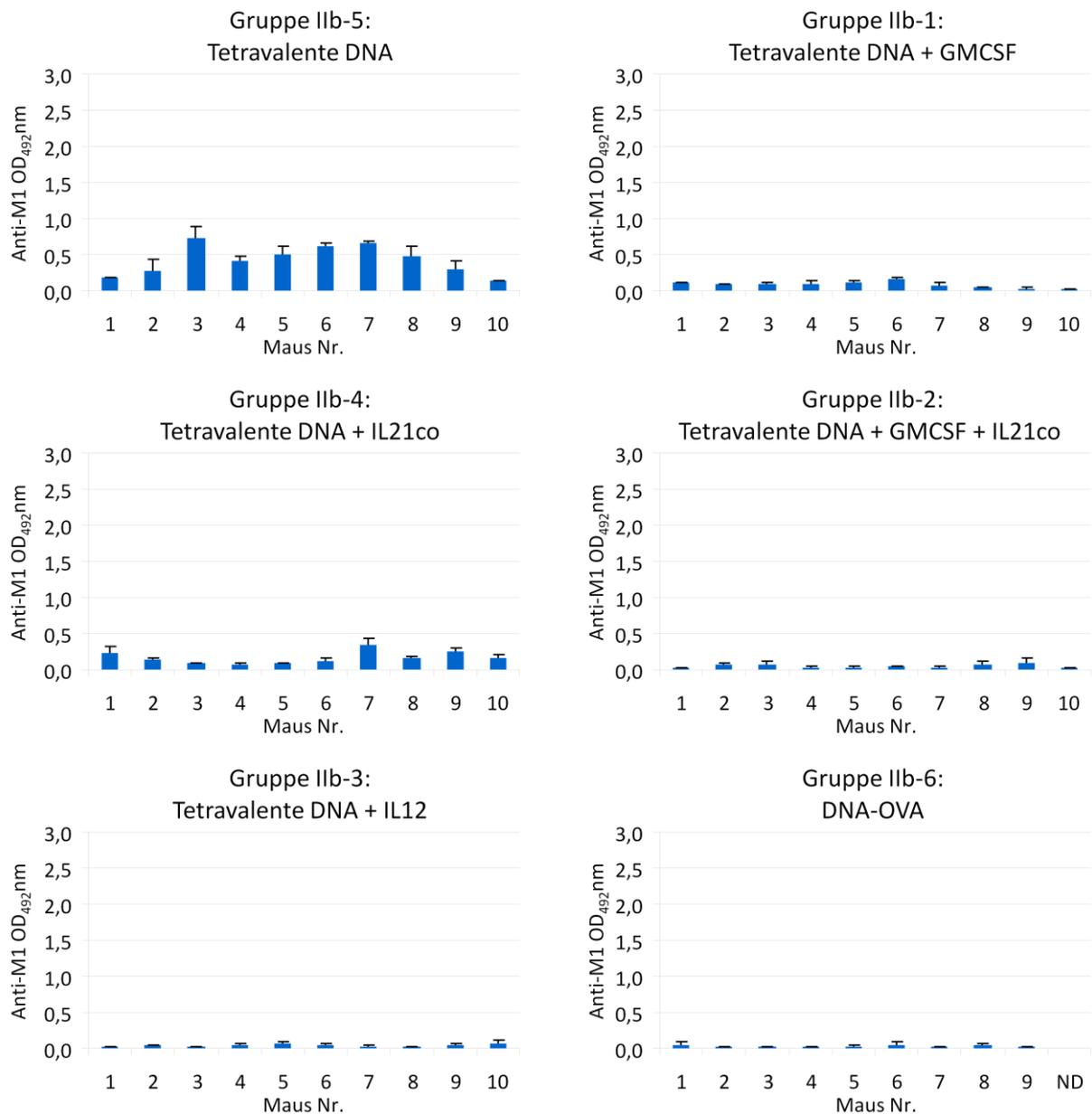


Abbildung 33 – anti-M1-Antikörperinduktion nach Immunisierung mit verschiedenen Immunomodulatoren, Endpunkte der Mäuseseren im ELISA mit adsorbiertem M1-Antigen

Anti-NP-Antikörper (Abb. 34) zeigten sich bei zwei von zehn Mäusen in der Gruppe ohne Immunomodulation, in der Gruppe mit einer IL-21co-Immunomodulation reagierte das Serum einer Maus auf NP-Antigen im ELISA.

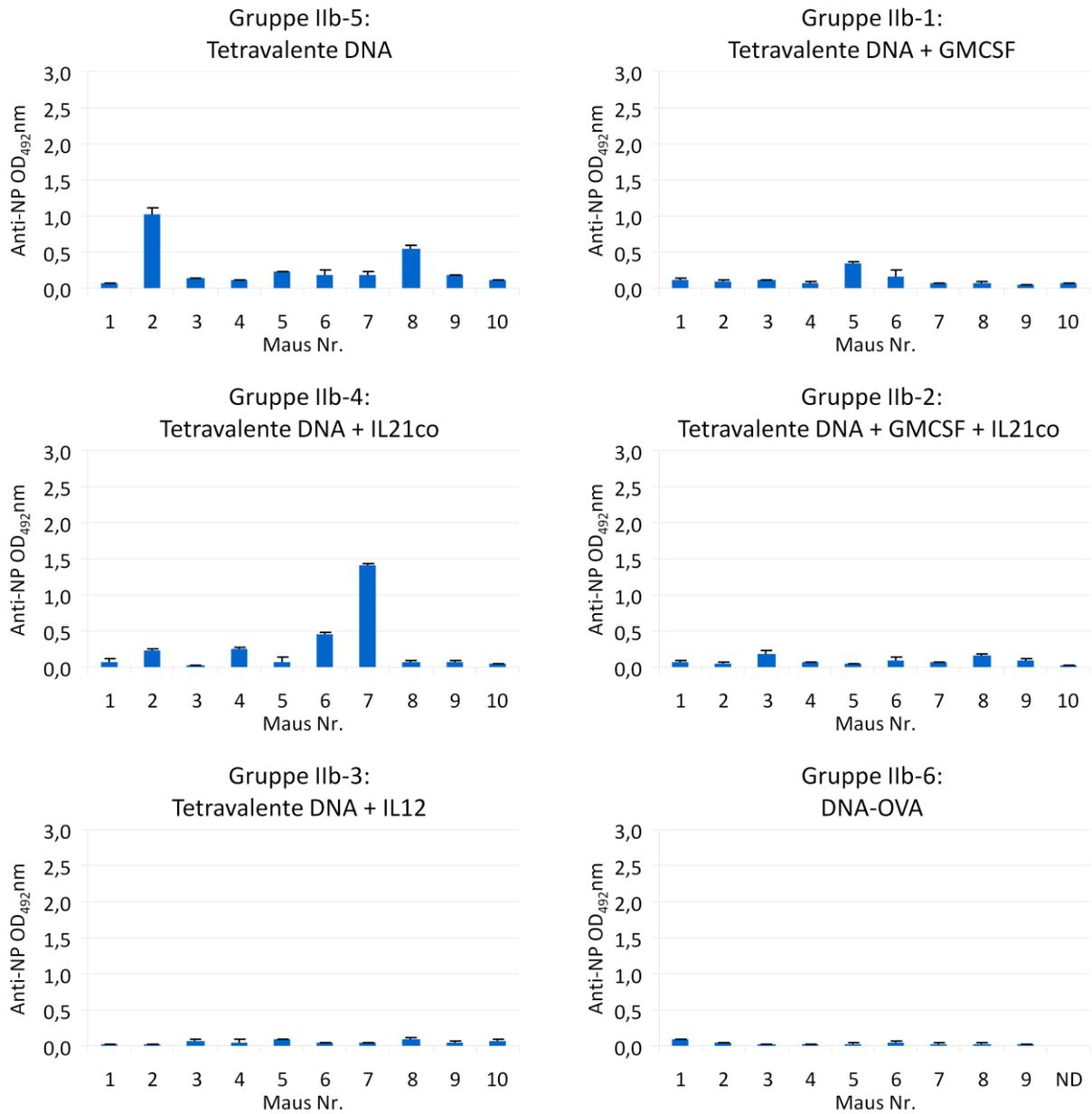


Abbildung 34 – anti-NP-Antikörperinduktion nach Immunisierung mit verschiedenen Immunomodulatoren, Endpunkte der Mäuseseren im ELISA mit adsorbiertem NP-Antigen

Phase III - Stammvergleich

In der dritten Phase der Tierversuche wurde die Impfreaktion in C57Bl/6- mit der in Balb/C-Mäusen verglichen, um stammspezifische Effekte zu beleuchten. Da C57Bl/6-Mäuse genetisch bedingt eine T_{H1}-polarisierte Immunantwort aufweisen^{340 341 342 343 344 345}, wurden die Impfreihen zur Untersuchung der zellulären (T_{H1}-polarisierten) Impfreaktion vorwiegend in diesen Mäusen durchgeführt, während zur besseren Untersuchung der humoralen (T_{H2}-polarisierten) Immunantwort in Phase III auch Balb/C-Mäuse (Gruppen 1-4) vakziniert wurden. Die beiden zusätzlich mitgeführten C57Bl/6-Gruppen (Gruppen 5 und 6) dienten zur Positivkontrolle im ELISpot, zur Negativkontrolle im ELISA und der Bestätigung vorheriger Ergebnisse der Immunomodulation mit GM-CSF (Phase II).

ELISPOT-Ergebnisse des Stammesvergleichs

Die Reaktion der zytotoxischen Immunantwort war auch in Phase III erwartungsgemäß am stärksten auf das NPco, insbesondere in der C57Bl/6-Maus-Gruppe mit dem Immunomodulator GM-SCF, aber auch bei Balb/c-Mäusen wurde eine Zunahme der Reaktion durch GM-CSF erreicht.

Das H5co (Abb. 35) erzeugte mittlere Reaktionen vor allem in Kombination mit GM-CSF, die in C57Bl/6-Mäusen höher ausfielen als bei den Balb/c-Mäusen.

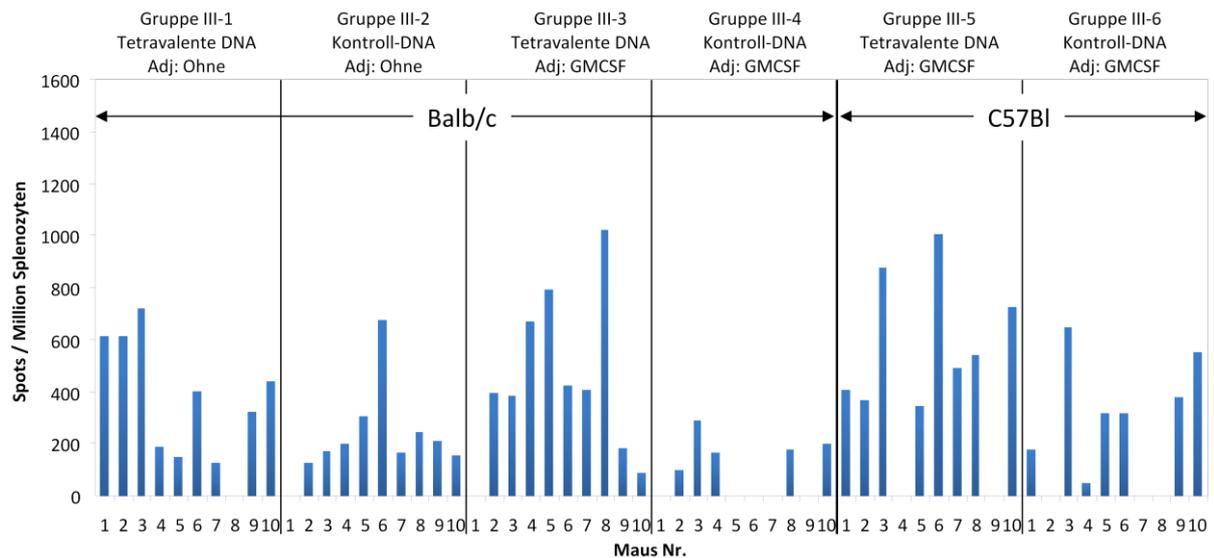


Abbildung 35 – Stimulation von Interferon- γ -sezernierenden Splenocyten mit dem jeweiligen immunodominanten H5-Peptid nach tetravalenter Immunisierung von Balb/c-Mäusen (die ersten vier Gruppen) und C57Bl/6-Mäusen (die letzten zwei Gruppen)

Die M1-spezifischen Splenocyten der tetravalent immunisierten Mäuse (Abb. 36) zeigte keine Reaktionen auf das immundominante CTL-Epitop, wie sie für das M1 in Phase I und II gemessen wurden. Aufgrund mittlerer Reaktionen in der Kontrollgruppe der C57Bl/6-Mäuse wurden in folgenden Phasen PCR-basierte Kontaminationskontrollen der Plasmidpräparation eingeführt.

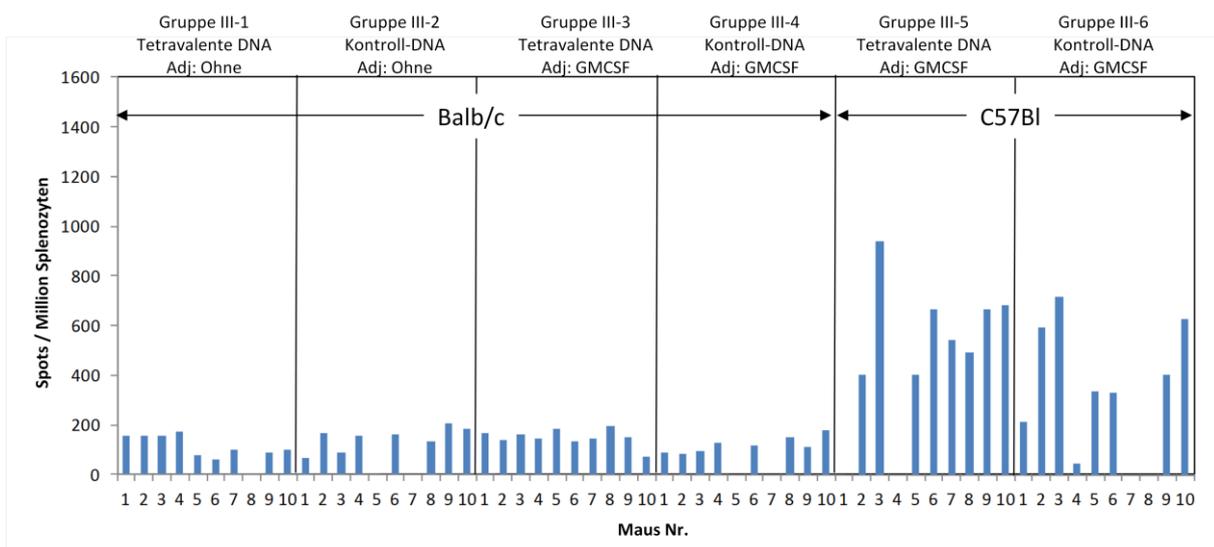


Abbildung 36 – Stimulation von Interferon- γ -sezernierenden Splenocyten mit dem jeweiligen immunodominanten M1-Peptid nach tetravalenter Immunisierung von Balb/c-Mäusen (die ersten vier Gruppen) und C57Bl/6-Mäusen (die letzten zwei Gruppen)

Die Reaktion auf das publizierte M2-Peptid, welches von Balb/c-Mäusen an MHCI-Komplexen (H2d) präsentiert werden kann, war trotz der starken *in vitro* Expression des Plasmids pTH-M2co abwesend (Abb. 37). In C57Bl/6-Mäusen (MHCI-Haplotyp H2b) wurde die Mischung aller neunzehn M2-abgeleiteten Peptide erwartungsgemäß nicht erkannt, da sie nicht präsentiert werden können.

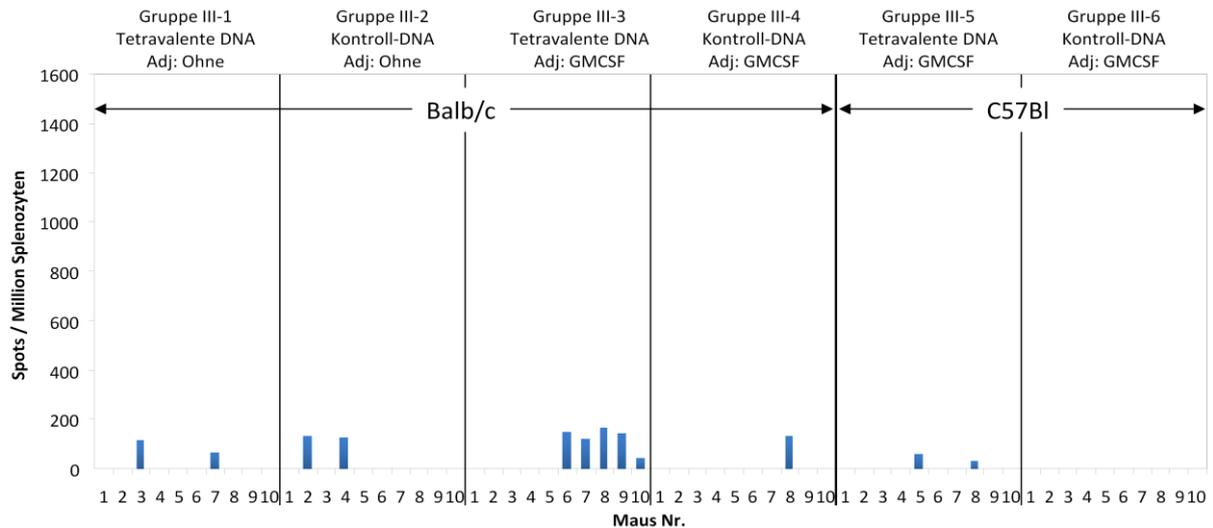


Abbildung 37 – Stimulation von Interferon- γ -sezernierenden Splenozyten mit dem immunodominanten M2-Peptid bei Balb/c-Mäusen (die ersten vier Gruppen) oder mit der M2-Peptidmischung bei C57Bl/6-Mäusen (die letzten zwei Gruppen) nach tetravalenter Immunisierung

Die Impfreaktionen auf das immunodominante MHCI-präsentierte NP-Peptid im ELISpot (Abb. 38) waren erwartungsgemäß am größten in der GM-CSF-modulierten Gruppe, gefolgt von der unmodulierten Gruppe.

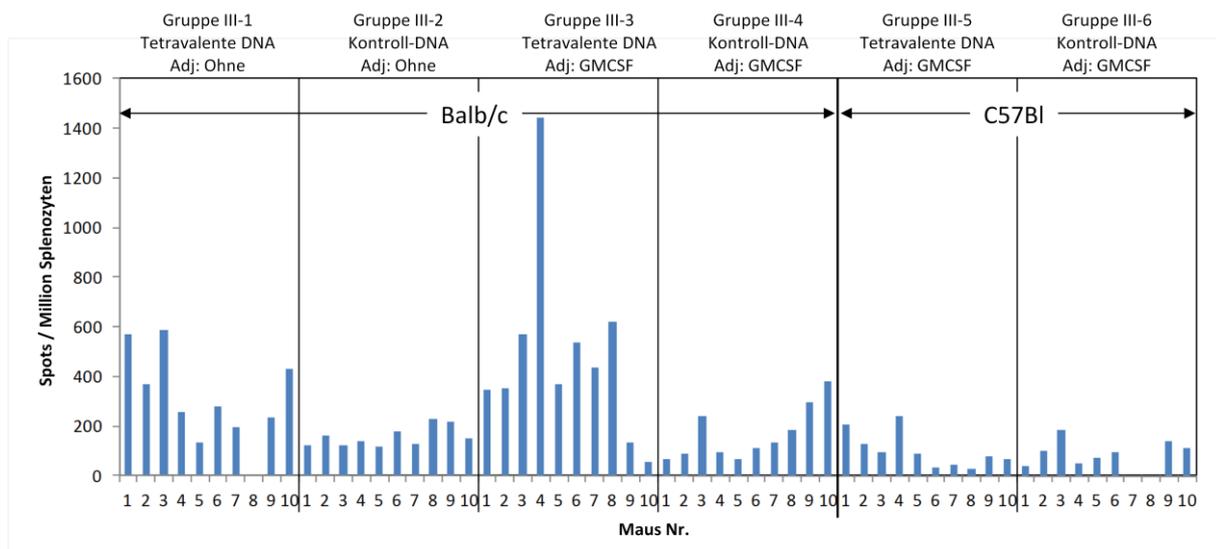


Abbildung 38 – Stimulation von Interferon- γ -sezernierenden Splenozyten mit dem jeweiligen immunodominanten NP-Peptid nach tetravalenter Immunisierung von Balb/c-Mäusen (die ersten vier Gruppen) und C57Bl/6-Mäusen (die letzten zwei Gruppen)

ELISA-Ergebnisse des Stammesvergleichs

Nicht nur scheint es in Balb/c eine stärkere Polarisierung hin zur humoralen, Antikörper-abhängigen Immunantwort zu geben, auch in der humoralen Immunodominanz der Antigene unterscheiden sich beide Stämme, in Balb/c war die Antikörperreaktion gegen M1 im Gegensatz zu C57Bl/6-Mäusen stärker ausgeprägt als gegen NP und H5 (Abb. 39). Die Induktion von Antikörpern gegen H5co fiel auch in Balb/c-Mäusen gering aus, was vermutlich an der geringen Expressionsstärke des H5-Gens lag.

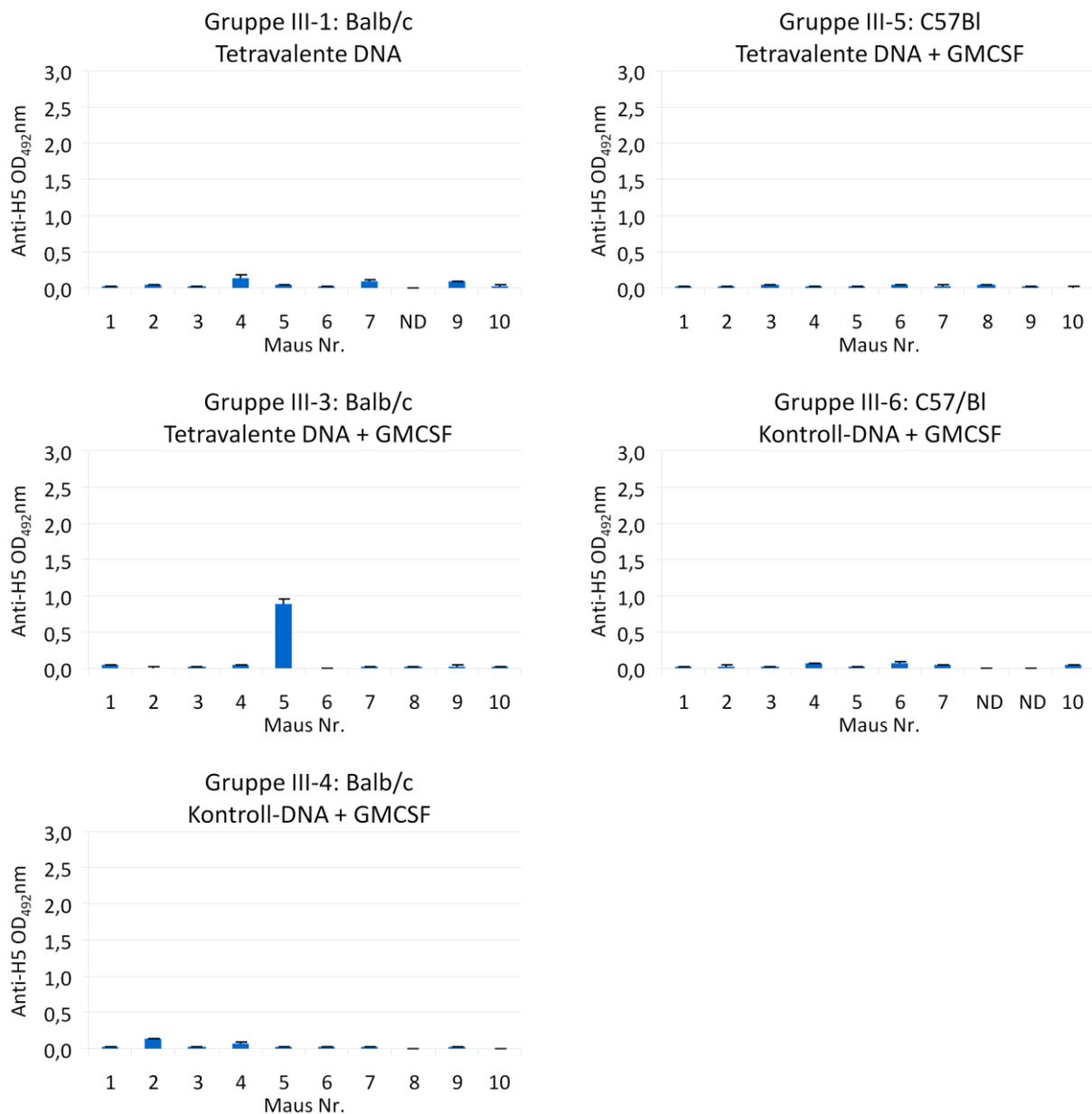


Abbildung 39 – Induktion von Anti-H5-Antikörpern nach Immunisierung von Balb/c-Mäusen und C57Bl/6-Mäusen, Endpunkte der Seren im ELISA mit adsorbiertem H5-Antigen

Die Antikörper gegen M1co (Abb. 40) in der unmodulierten Gruppe erreichten eine Ansprechrate von 100% mit hohen Titern und mit GM-CSF noch eine Ansprechrate von 80%.

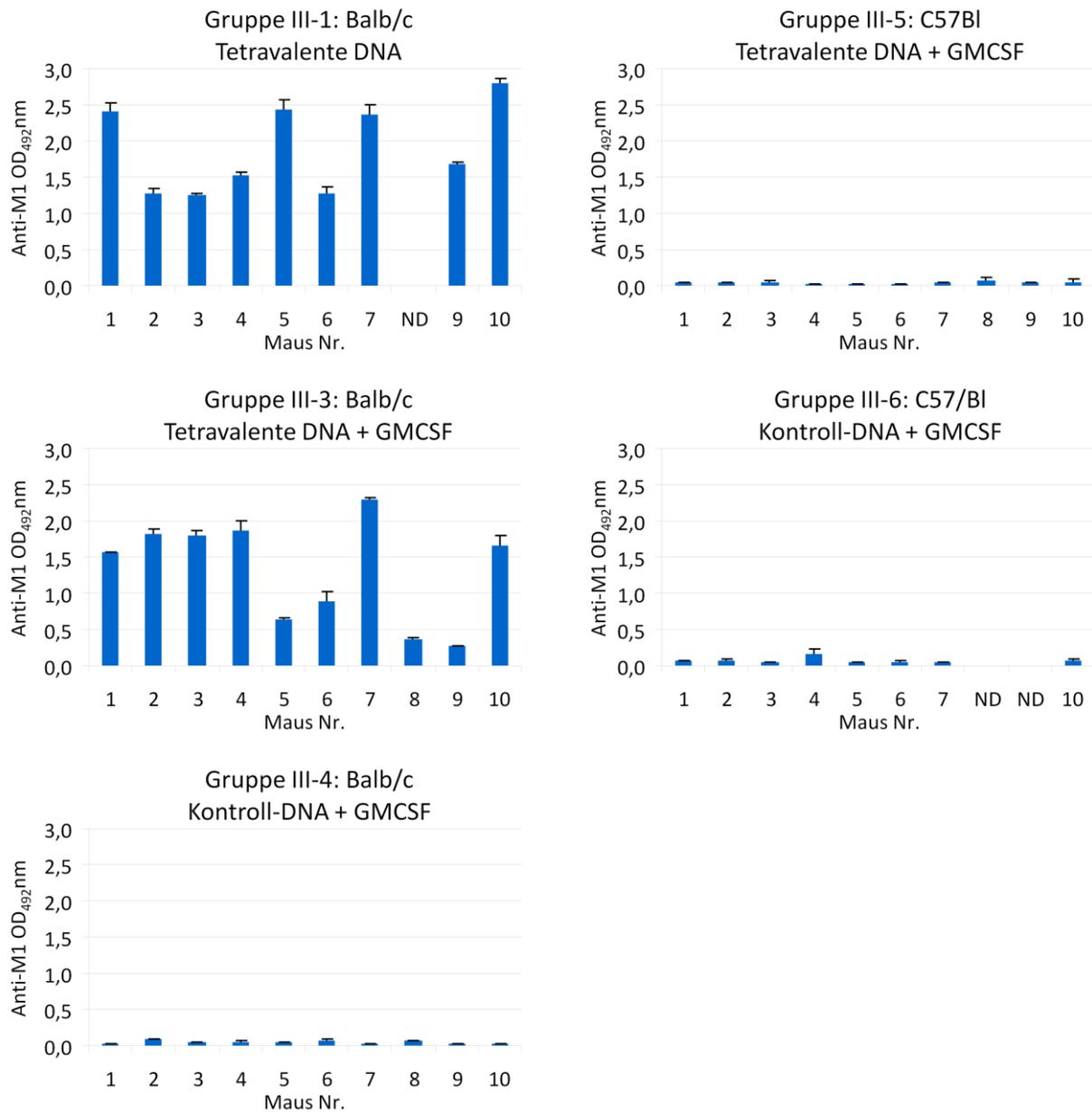


Abbildung 40 – Induktion von Anti-M1-Antikörpern nach Immunisierung von Balb/c-Mäusen und C57Bl/6-Mäusen, Endpunkte der Seren im ELISA mit adsorbiertem M1-Antigen

NPco (Abb. 41) induzierte in der GM-CSF-modulierten Gruppe eine Ansprechquote von 40% bezüglich der Induktion von Antikörpern mit einer Extinktion von über 0,5 im ELISA. Dagegen fielen die Titer gegen NP nach Immunisierung mit dem unmodulierten tetravalenten Impfstoff gering aus, obwohl eine T_{H1} -Polarisierung durch Koapplikation von GM-CSF fehlte.

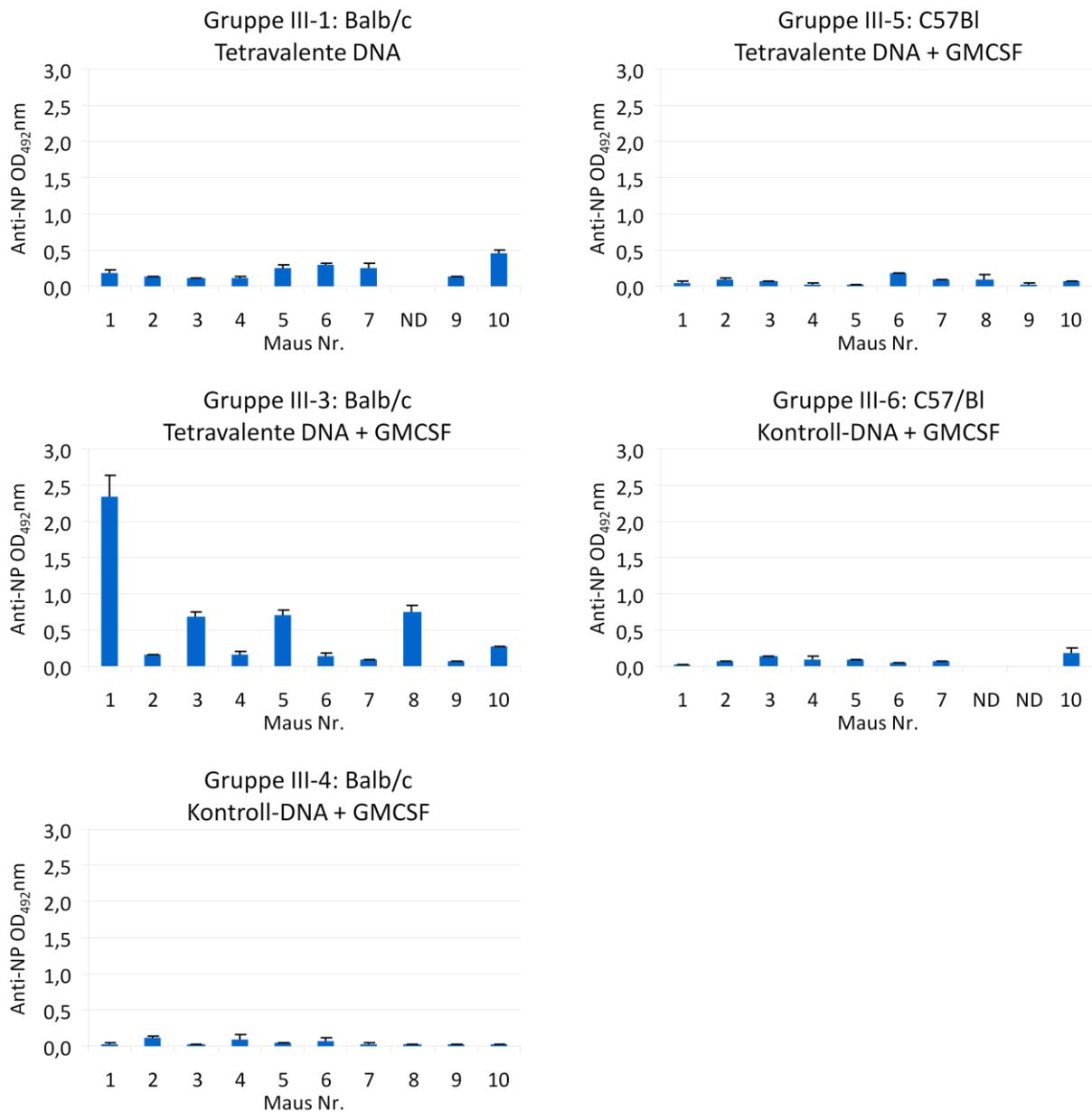


Abbildung 41 – Induktion von Anti-NP-Antikörpern nach Immunisierung von Balb/c-Mäusen und C57Bl/6-Mäusen, Endpunkte der Seren im ELISA mit adsorbiertem NP-Antigen

Phase IV – Belastung mit 5 MLD₅₀ von drei Stämmen

In der vierten Phase folgte der zweifachen Immunisierung eine intratracheale/intranasale Infektion mit einer niedrigen, aber letalen Dosis (5 MLD₅₀) an Influenzaviren dreier unterschiedlicher Stämme, um nach den in vorigen Phasen bereits nachgewiesenen Immunreaktionen auch noch einen Impfschutz bei Infektion zu zeigen und gleichzeitig einen heterosubtypischen Schutz gegen drei Stämme (H5N1/VietNam/1194/2004, H5N1/Germany/R65/2006 und H1N1/PuertoRico/8/1934) zu untersuchen, mit sinkender Verwandtschaft zum Impfstoff (basierend auf H5N1/VietNam/1194/2004). Die drei Belastungsstämme waren zuerst der identische Stamm des Impfstoffs, dann der in Deutschland vorkommende nächste Verwandte desselben Serotyps H5N1 und zuletzt der klassische, Maus-adaptierte H1N1-Laborstamm. Bei Verlust von 20% des initialen Körpergewichts wurden die Mäuse nach Anweisung des LAGeSo eingeschläfert.

Die Belastung mit 5 MLD₅₀ an Influenza A H1N1/PR/8/34 zeigte keinen heterosubtypischen Impfschutz (Abb. 42), während die Mäuse vor homosubtypischer Belastung mit H5N1/Germany/R65/2006 zu 80% oder vor autologer Belastung mit H5N1/VietNam/1194/2004 zu 90% geschützt waren.

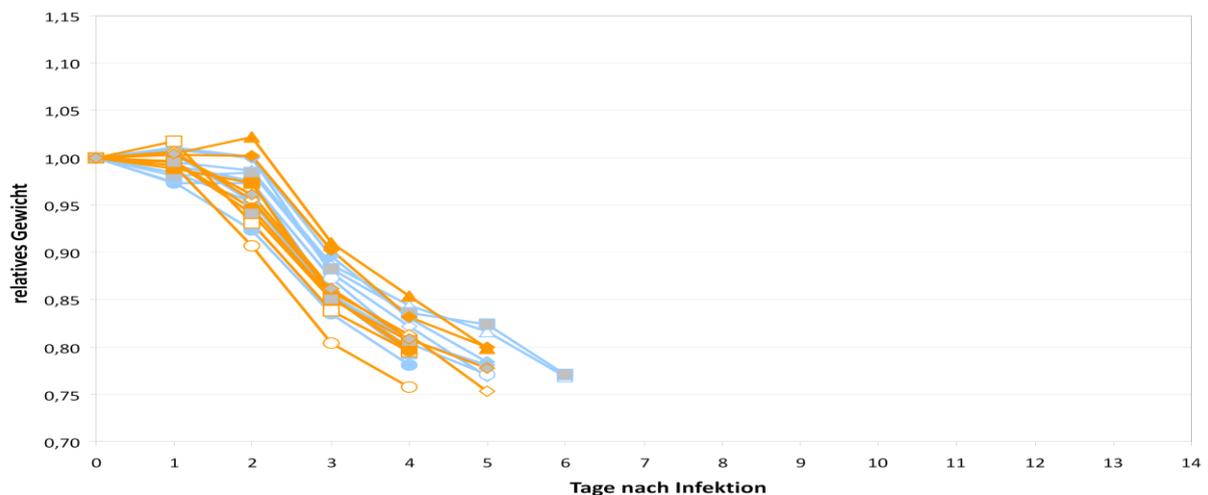


Abbildung 42 – Relative Gewichtsentwicklung nach Belastung von Mäusen mit 5 MLD₅₀ des heterosubtypischen Influenzavirus A/PuertoRico/8/34 (H1N1), welche mit tetravalentem, GM-CSF-moduliertem Impfstoff (blau) oder GM-CSF-moduliertem Kontrollvektor (gelb) geimpft wurden

Sowohl die tetravalent immunisierte Gruppe als auch die Kontrollgruppe verstarben nach heterosubtypischer Infektion mit dem Stamm PR8 vollständig (Abb. 42), bei Erreichen von 80% ihres Initialgewichts wurden die Mäuse eingeschläfert.

In der tetravalent immunisierten Gruppe waren 80% der Mäuse vor homosubtypischer Belastung mit dem Stamm R65 geschützt (Abb. 43), in der Kontrollgruppe überlebten 10% der Mäuse.

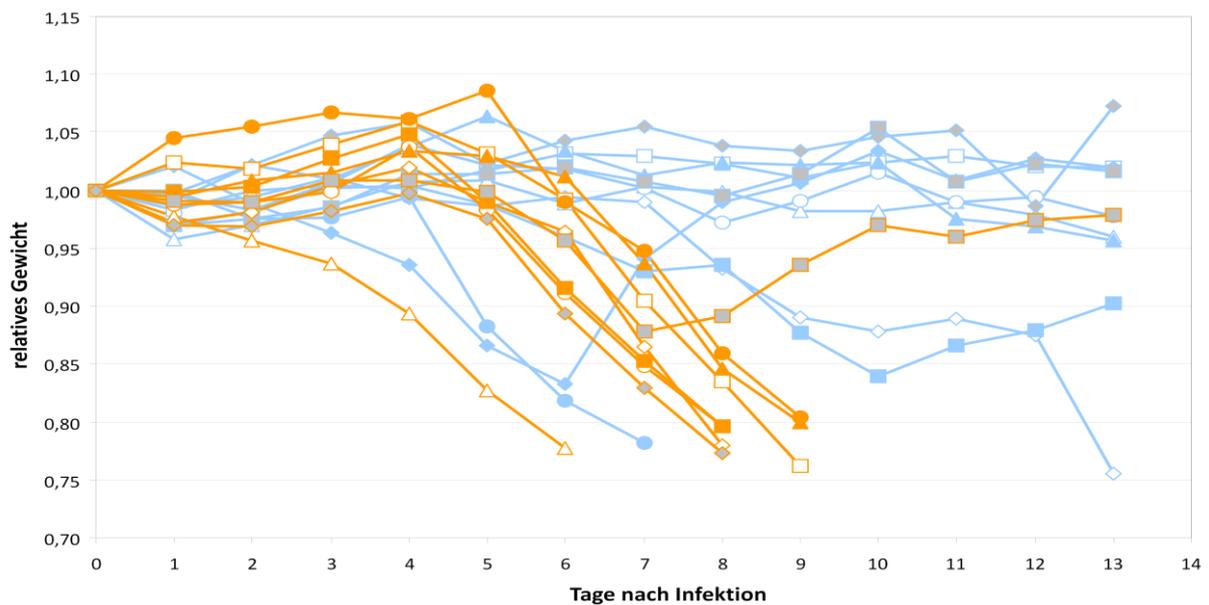


Abbildung 43 – Relative Gewichtsentwicklung nach Belastung von Mäusen mit 5 MLD₅₀ des homosubtypischen Influenzavirus A/Germany/R65/2005 (H5N1), welche mit tetravalentem, GM-CSF-moduliertem Impfstoff (blau) oder GM-CSF-moduliertem Kontrollvektor (gelb) geimpft wurden

Bei der autologen Belastung mit dem Stamm VN1194 überlebten 90% der Tiere (Abb. 44), während die Mäuse der Kontrollgruppe ungeschützt waren und vollständig verstarben.

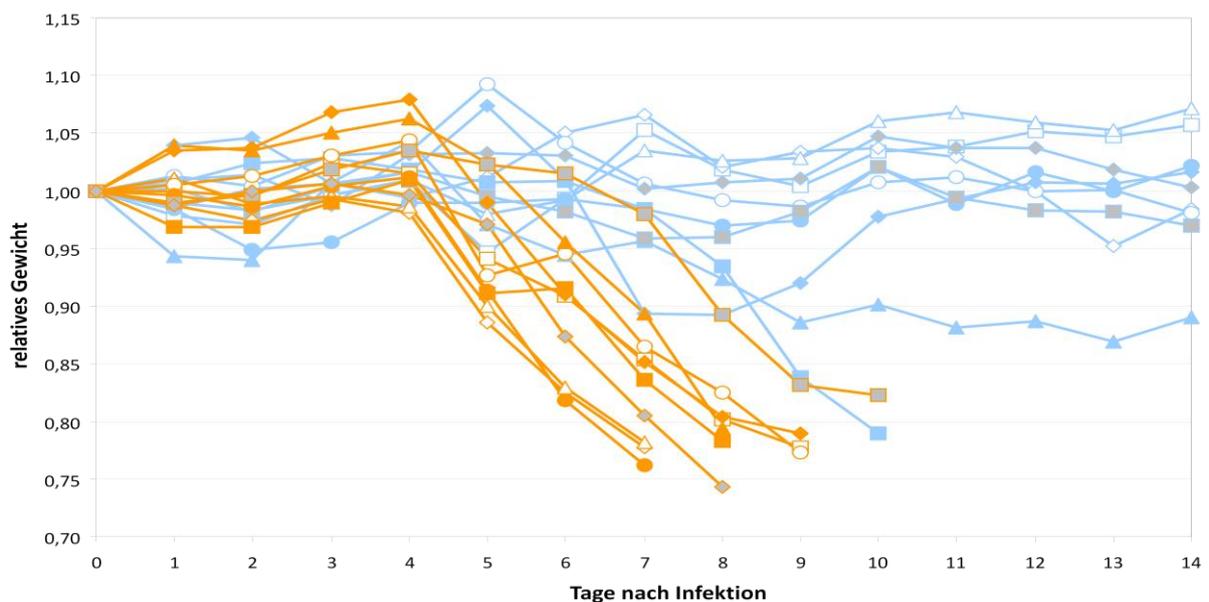


Abbildung 44 – Relative Gewichtsentwicklung nach Belastung von Mäusen mit 5 MLD₅₀ des autologen Influenzavirus A/VietNam/1194/2004 (H5N1), welche mit tetravalentem, GM-CSF-moduliertem Impfstoff (blau) oder GM-CSF-moduliertem Kontrollvektor (gelb) geimpft wurden

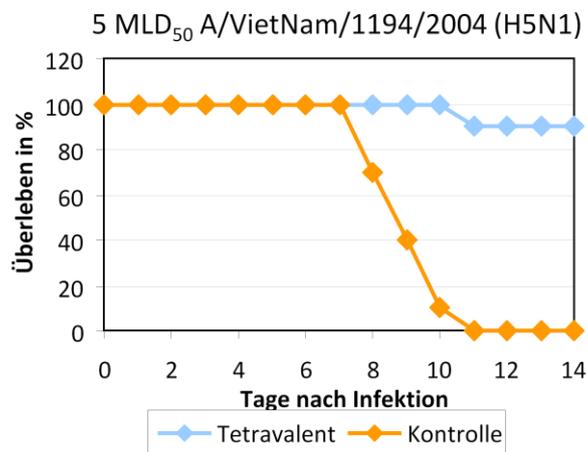
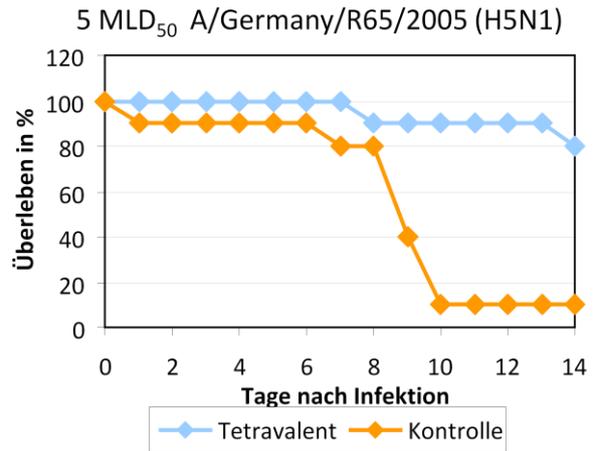
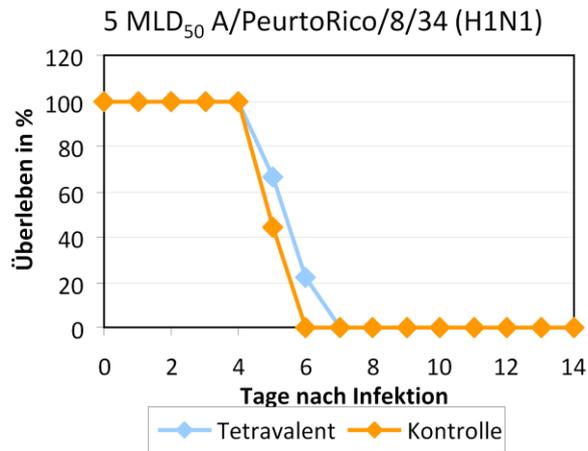


Abbildung 45 – Überlebensraten im Zeitverlauf nach Infektion mit 5 MLD₅₀ der Influenzaviren A/PuertoRico/8/1934, A/Germany/R65/2006 oder A/VietNam/1194/2004, bei Erreichen eines Gewichtsverlusts von 20% wurden die Mäuse eingeschläfert

Phase V - Impfdosissteigerung und Belastung mit 50 MLD₅₀ von zwei Stämmen

Phase V beinhaltete die Eskalation der Belastungsdosis von Influenzaviren. Als zweite Variable diente hierbei eine Steigerung der Impfdosis. Es wurde nur gegen zwei H5N1-Stämme immunisiert (H5N1/VietNam/1194/2004, H5N1/Germany/R65/2006), da in Phase IV kein Schutz gegen H1N1/PR8/1934 gezeigt werden konnte. Bei gleichbleibender Gruppenanzahl wurde daher eine Eskalation der Impfdosis durchgeführt, um die Tragweite des Impfschutzes und die Verbesserung des Impfschutzes nach Dosissteigerung zu untersuchen.

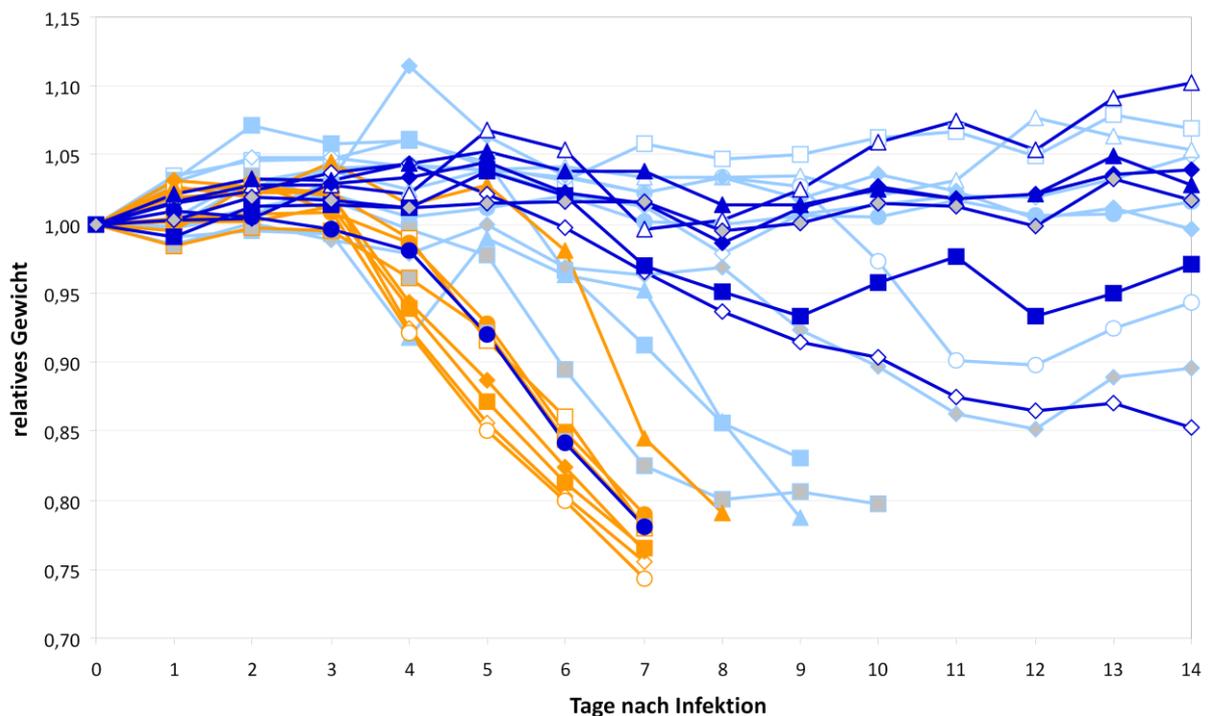


Abbildung 46 – Relative Gewichtsentwicklung nach Belastung von Mäusen mit 50 MLD₅₀ des homosubtypischen Influenzavirus A/Germany/R65/2006 (H5N1), welche mit tetraivalentem, GM-CSF-moduliertem Impfstoff (hellblau), mit der doppelten Impfdosis (dunkelblau) oder GM-CSF-moduliertem Kontrollvektor (gelb) geimpft wurden

Die Belastung mit 50 MLD₅₀ zeigte einen maximalen homosubtypischen Impfschutz von 88% (Abb. 46), und einen maximalen autologen Impfschutz von 70% (Abb. 47), während in der R65-infizierten Kontrollgruppe keine Maus überlebte. In der VN1194-infizierten Kontrollgruppe verblieb eine Maus. Bei Verdoppelung der Impfdosis auf 4 Schuss pro Impfung stieg der Impfschutz vor homologer Belastung von 67% auf 86% und der Schutz vor autologer Belastung sank von 70% auf 22%. Der autologe Belastungsstamm ist im

Gegensatz zum homosubtypischen Belastungsstamm (isoliert aus Höckerschwänen) ein Isolat aus Säugetieren (Humanisolat), vermutlich rührt die höhere Pathogenität in Mäusen daher. Dies zeigt sich auch in den Infektionsdosen, denn eine MLD_{50} umfaßt beim homosubtypischen Stamm R65 161 „plaque-forming units“ (pfu) und bei dem Stamm VN1194 nur 1 pfu. In der Gruppe mit doppelter Impfdosis überlebten 86% (dunkelblau), bei normaler Impfdosis waren 70% geschützt (hellblau), die R65-infizierte Kontrollgruppe verstarb vollständig (Abb. 46, gelb).

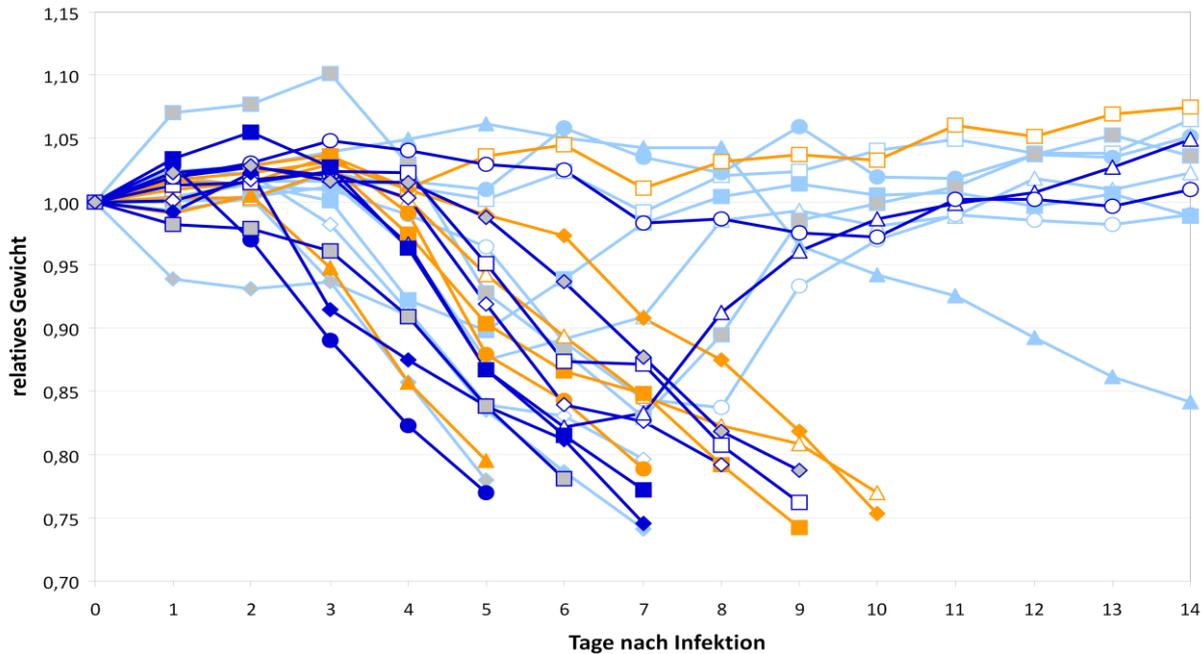


Abbildung 47 – Relative Gewichtsentwicklung nach Belastung von Mäusen mit $50 MLD_{50}$ des autologen Influenzavirus A/VietNam/1194/2004 (H5N1), welche mit tetraivalentem, GM-CSF-moduliertem Impfstoff (blau) mit doppelter Impfdosis (dunkelblau) oder GM-CSF-moduliertem Kontrollvektor (gelb) geimpft wurden

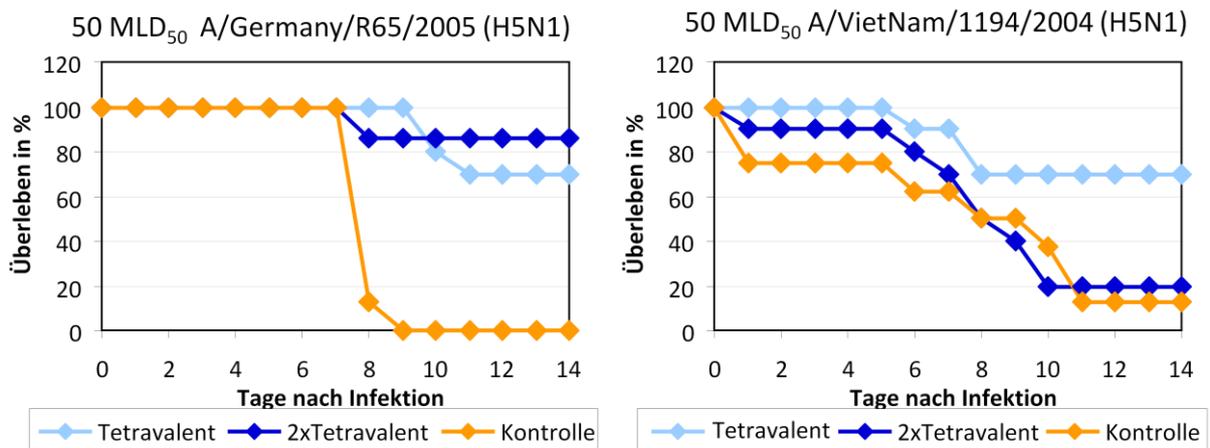


Abbildung 48 – Überlebensraten im Zeitverlauf nach Infektion mit $50 MLD_{50}$ der Influenzaviren A/Germany/R65/2006 oder A/VietNam/1194/2004, bei Erreichen eines Gewichtsverlusts von 20% wurden die Mäuse eingeschläfert

Phase VI – Einzelgen-Immunisierungen und homosubtypische Belastung mit 10 MLD₅₀

Die Korrelation des Impfschutzes mit einzelnen Genen im Vergleich zur polygenen oder Leervektor-Immunsierung im Belastungsfall war das Ziel dieser Phase. Die intranasale homosubtypische Belastung erfolgte mit 10MLD₅₀ an H5N1/Germany/R65/2006.

Der in den vorangegangenen Phasen aufgezeigte Impfschutz des tetragenen Impfkonstrukts ließ sich in Phase VI auf NP und H5 eingrenzen, denn in der Gruppe der Immunsierung gegen NPco überlebten 30% und in der H5co-immunisierten Gruppe überlebten 20% die Belastung mit 10 MLD₅₀. Die tetragen immunisierte Gruppe überlebte zu 60% (Abb. 49 bis 54).

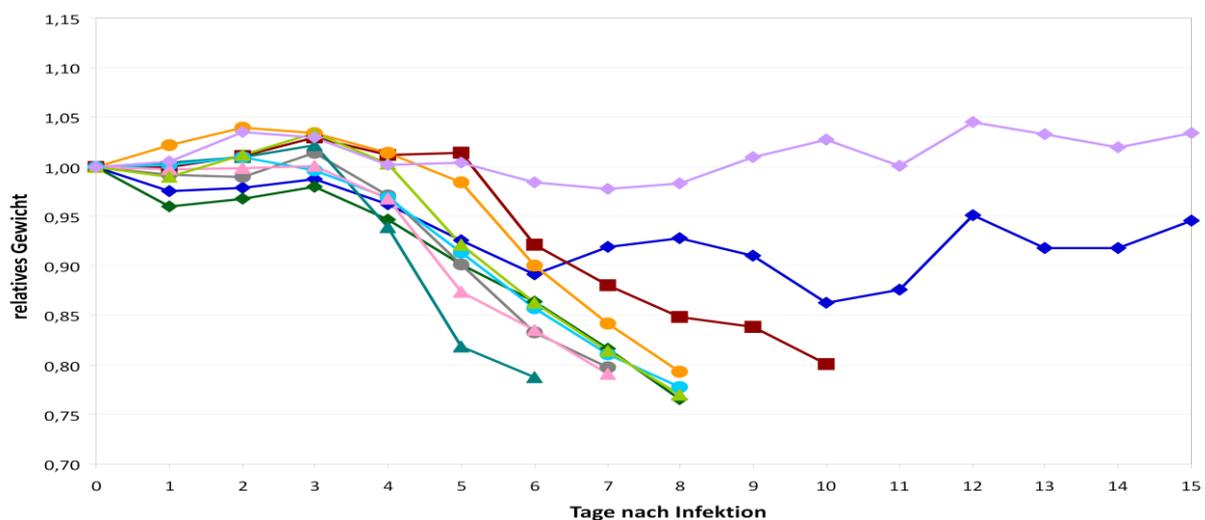


Abbildung 49 – Relative Gewichtsentwicklung nach Belastung von Mäusen mit 10 MLD₅₀ des homosubtypischen Influenzavirus A/Germany/R65/2006 (H5N1), welche mit dem GM-CSF-modulierten Plasmid pTH-H5co geimpft wurden

Die Immunsierung mit H5co führte zu einer Überlebensrate von 20% (Abb. 49). Die Immunsierung mit M1co erbrachte trotz messbarer Werte an Interferon- γ -sezernierender Splenozyten wie auch Antikörpern keinen Impfschutz, da alle Tiere verstarben (Abb. 50).

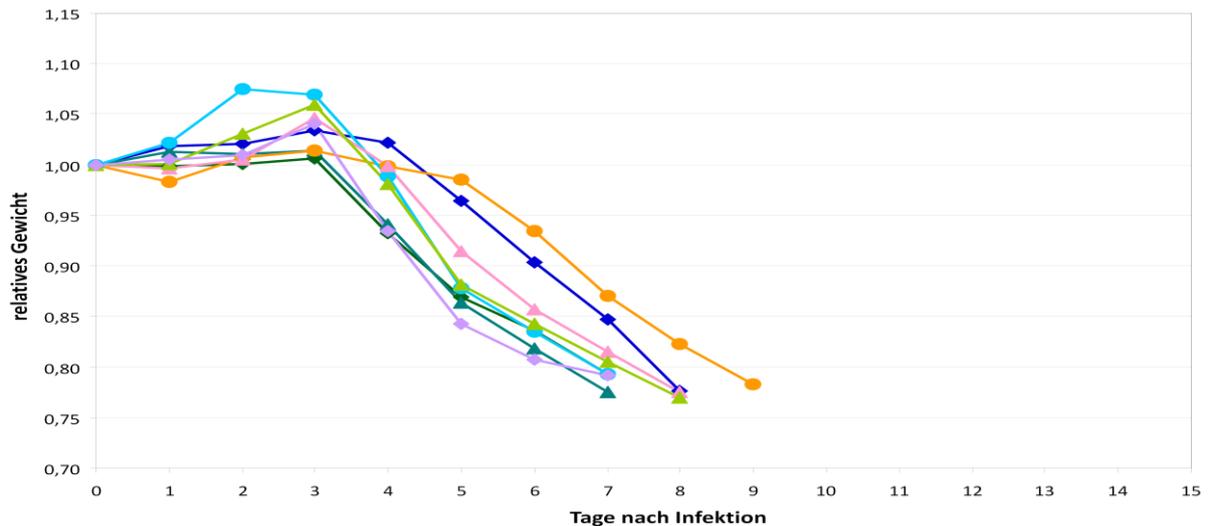


Abbildung 50 – Relative Gewichtsentwicklung nach Belastung von Mäusen mit 10 MLD₅₀ des homosubtypischen Influenzavirus A/Germany/R65/2006 (H5N1), welche mit dem GM-CSF-modulierten Plasmid pTH-M1co geimpft wurden

Die Gruppen der M2-Immunsierung waren aufgrund der in Phase I, II und III bereits abwesenden zytotoxischen T-Zellen erwartungsgemäß ungeschützt gegen eine homosubtypische Infektion (Abb. 51).

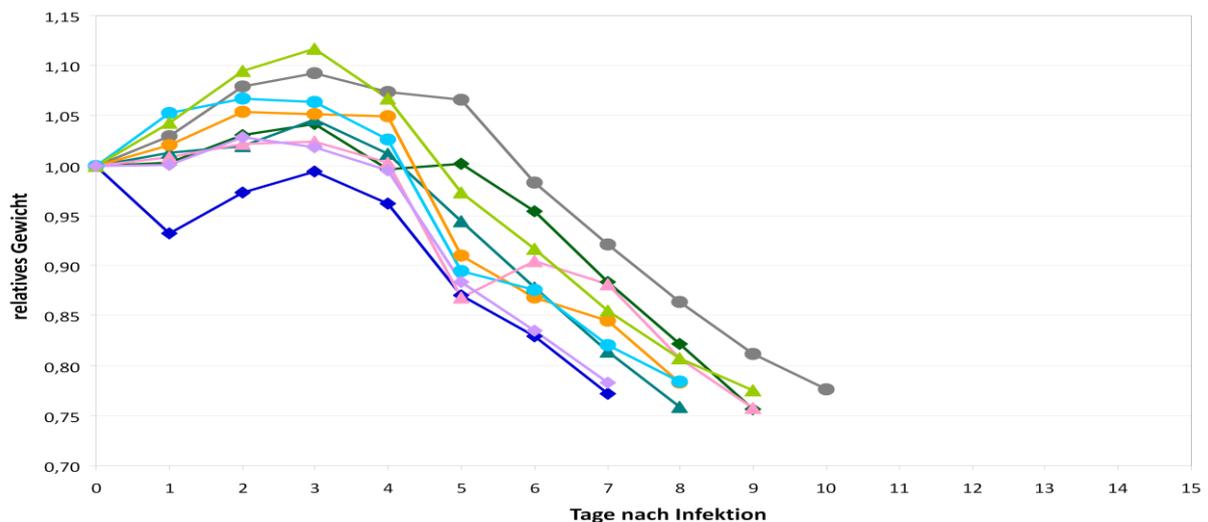


Abbildung 51 – Relative Gewichtsentwicklung nach Belastung von Mäusen mit 10 MLD₅₀ des homosubtypischen Influenzavirus A/Germany/R65/2006 (H5N1), welche mit dem GM-CSF-modulierten Plasmid pTH-M2co geimpft wurden

Die NP-immunisierte Gruppe (Abb. 52) zeigte mit einem Überleben von 30% unter allen Immunsierungen mit einem einzelnen Influenzagen den umfangreichsten Impfschutz. Dieser Befund korreliert mit der Anwesenheit von Interferon- γ -sezernierender Splenozyten in den ELISpots der Phasen I, II und III. Selbst die ungeschützten Mäuse in der NP-Gruppe hatten einen um zwei Tage verzögerten Todeszeitpunkt im Vergleich zu den Gruppen des M1, M2 oder des Kontrollvektors.

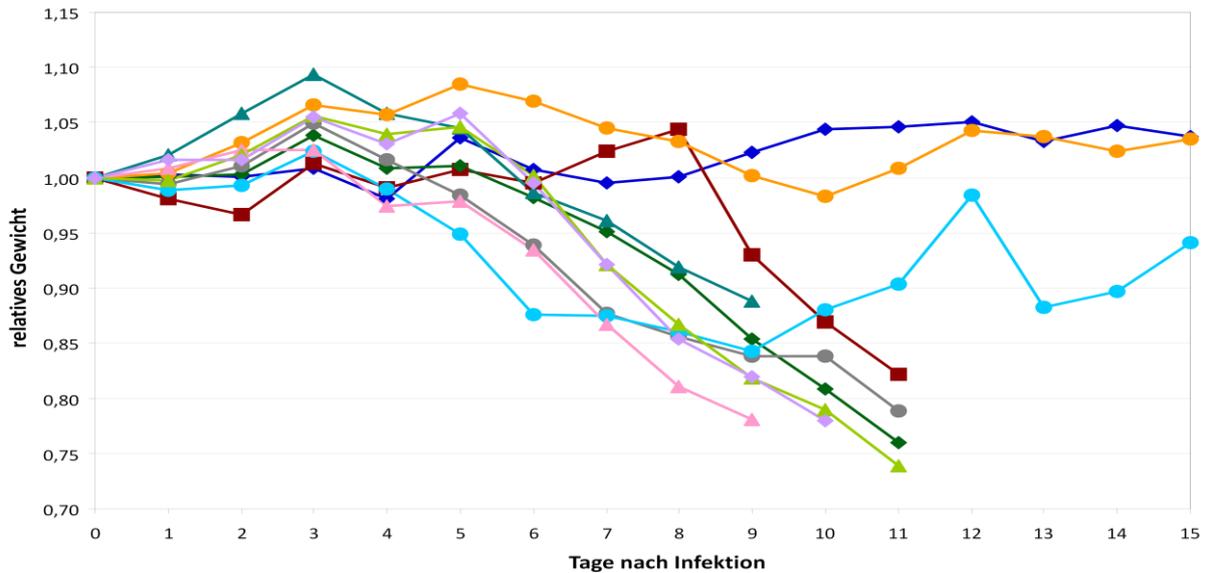


Abbildung 52 – Relative Gewichtsentwicklung nach Belastung von Mäusen mit 10 MLD₅₀ des homosubtypischen Influenzavirus A/Germany/R65/2006 (H5N1), welche mit dem GM-CSF-modulierten Plasmid pTH-NPco geimpft wurden

Der tetravalente, GM-CSF-verstärkte Impfstoff diente in diesem Versuch als Positivkontrolle (Abb. 53). In dieser Impfgruppe waren 60% der Mäuse geschützt. Bei den ungeschützten Mäusen verschob sich der Todeszeitpunkt in der tetravalent immunisierten Gruppe (wie beim NP) im Vergleich zu M1, M2 oder dem Kontrollvektor.

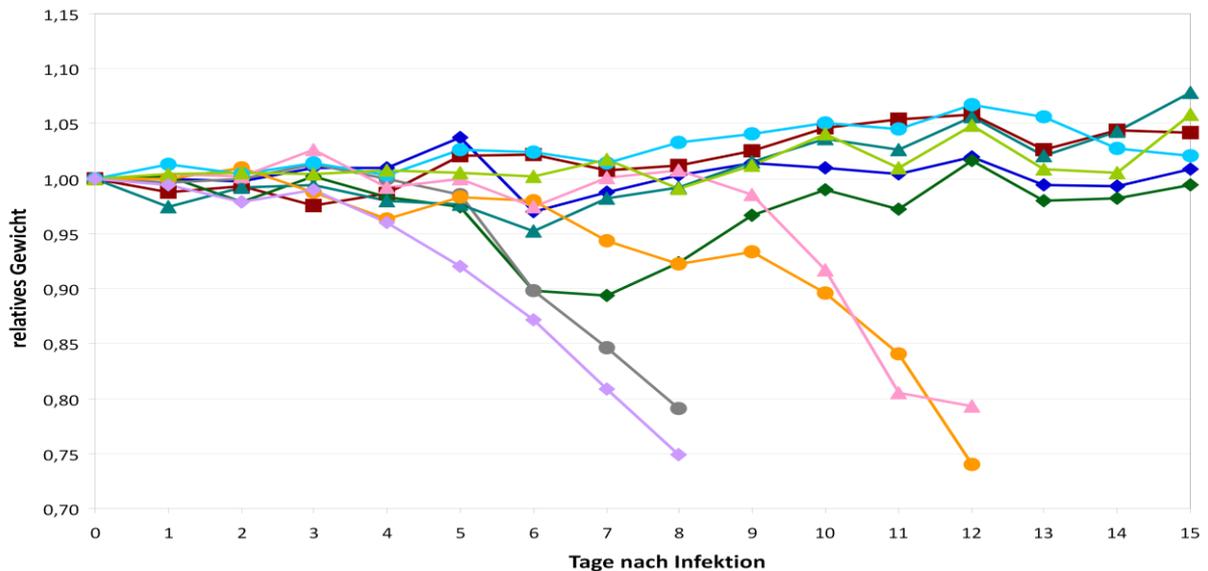


Abbildung 53 – Relative Gewichtsentwicklung nach Belastung von Mäusen mit 10 MLD₅₀ des homosubtypischen Influenzavirus A/Germany/R65/2006 (H5N1), welche mit dem tetravalenten, GM-CSF-modulierten Impfstoff geimpft wurden

In der Kontrollgruppe des Leervektors (Abb. 54) überlebte eine Maus die Infektion, was innerhalb der statistischen Schwankungen bei Infektionsversuchen liegt.

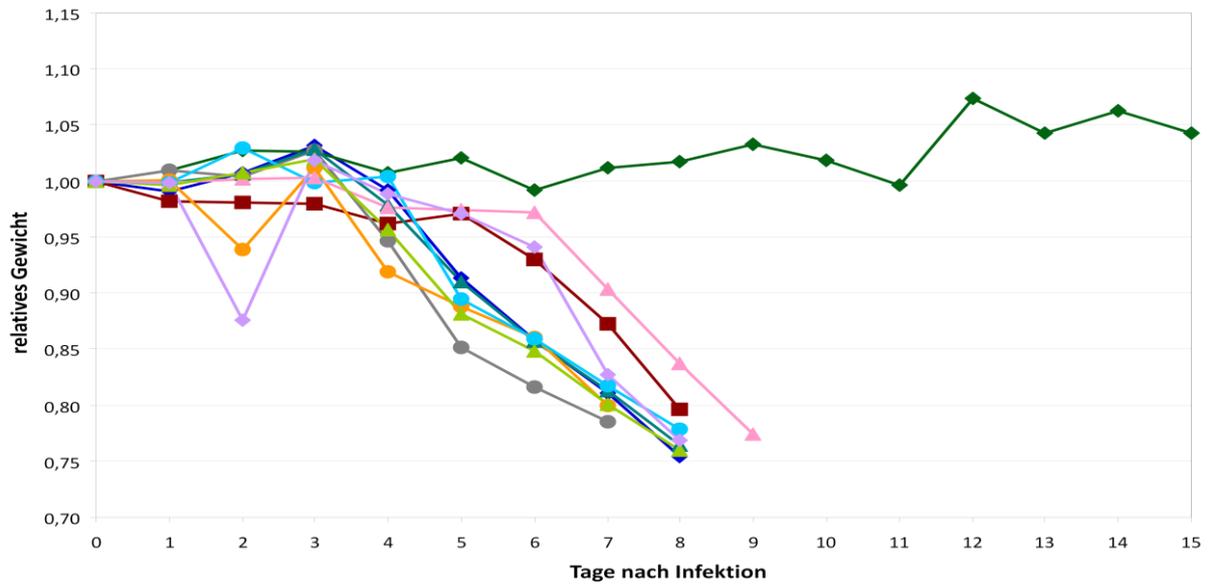


Abbildung 54 – Relative Gewichtsentwicklung nach Belastung von Mäusen mit 10 MLD₅₀ des homosubtypischen Influenzavirus A/Germany/R65/2006 (H5N1), welche mit dem GM-CSF-moduliertem Kontroll-Plasmid pTH-Leer geimpft wurden

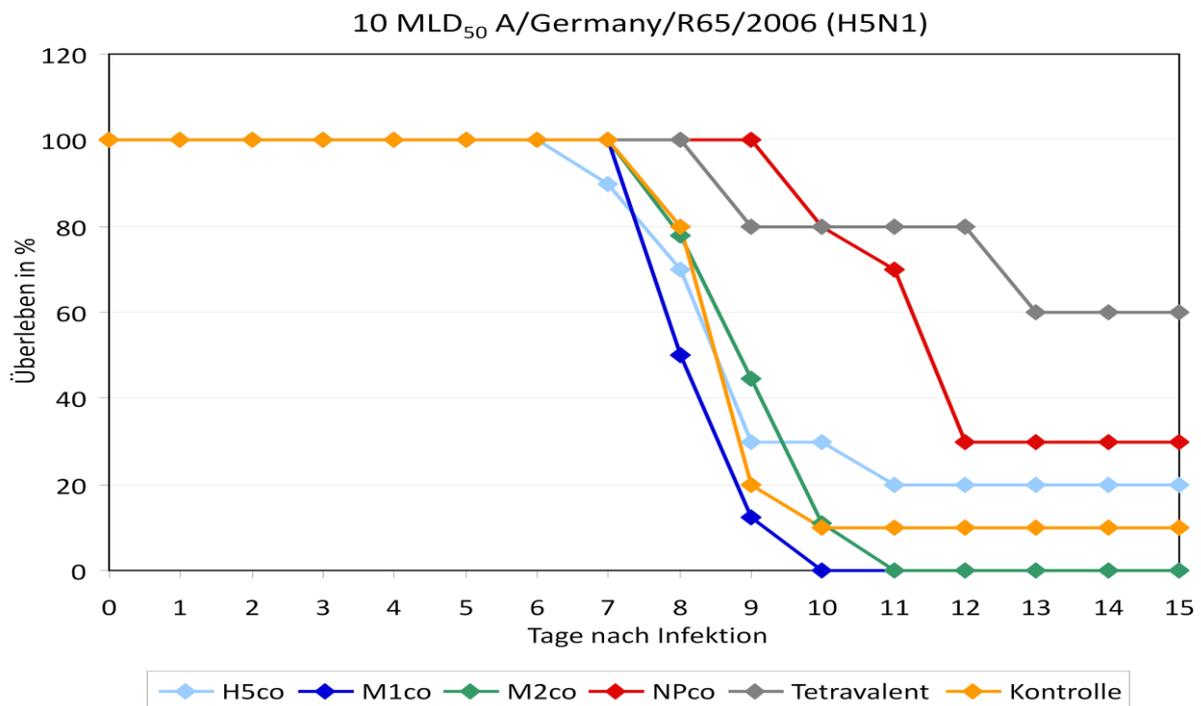


Abbildung 55 – Überlebensraten im Zeitverlauf nach Infektion mit 10 MLD₅₀ des Influenzavirus A/Germany/R65/2006, bei Erreichen eines Gewichtsverlusts von 20% wurden die Mäuse eingeschläfert

Phase VII - H1N1-Immunsierung und homosubtypische Belastung mit 10 MLD₅₀

Die letzte Impfreihe wurde aufgrund des Ausbruchs der Schweinegrippe in Mexiko und der in vorangehenden Impfreiheiten gewonnenen Erkenntnisse durchgeführt. Hierzu wurden drei Gene der Schweinegrippe (H1cosw, M1cosw, NPcosw) des H1N1-Stammes MexikoCity/4603/2009 erzeugt, in den Impfvektor pTH kloniert und sowohl einzeln als auch in polygener Kombination mit dem Immunomodulator pTH-GM-CSF per Gene Gun verabreicht.

Leider verschob sich der Liefertermin der für die Belastung notwendigen Maus-adaptierten Variante dieses Virus (A/Regensburg/D6/2009 Maus-adaptiert) von Dr. Oliver Planz aus Tübingen, zudem erwies sich dieses adaptierte H1N1-Virus trotz Passagierung in Mäusen als apathogen für Mäuse. Dadurch konnten die dafür vorgesehenen Mäuse hier erst zehn Wochen nach der zweiten Immunisierung mit dem mauspathogenen H1N1-Stamm A/PuertoRico/8/34 belastet werden, während bei vorherigen Impfreiheiten die Belastungen zwei bis drei Wochen nach der Zweitimmunisierung erfolgten.

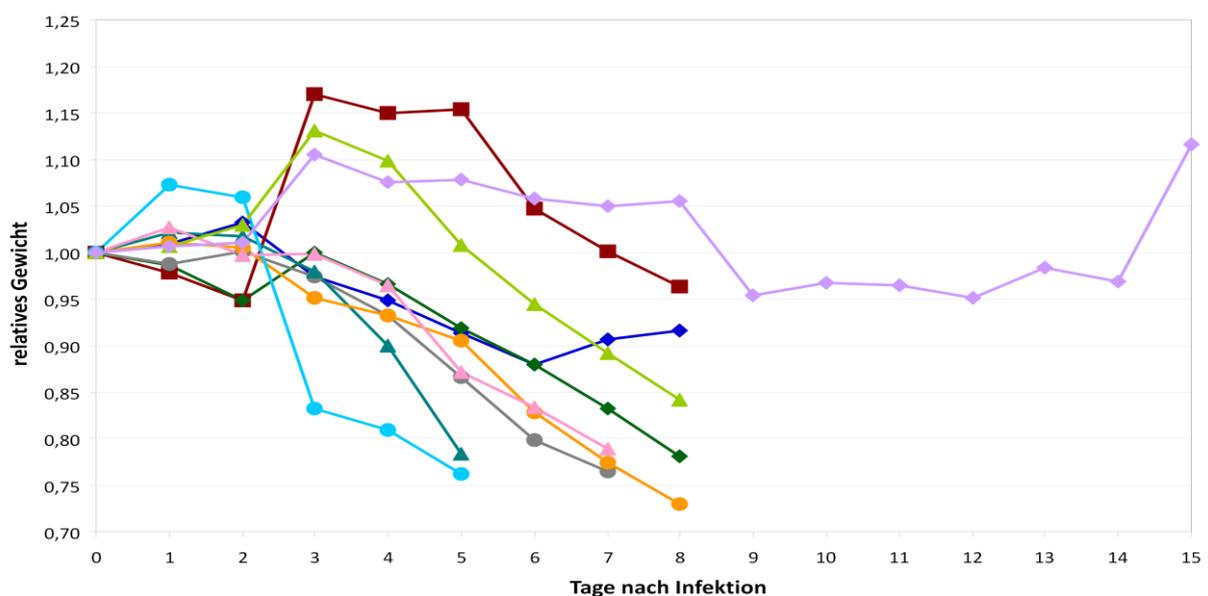


Abbildung 56 – Relative Gewichtsentwicklung nach Belastung von Mäusen mit 10 MLD₅₀ des homosubtypischen Influenzavirus A/PuertoRico/8/1934 (H1N1), welche mit dem GM-CSF-modulierten Plasmid pTH-H1cosw geimpft wurden

Die heterosubtypische Belastung mit 10 MLD₅₀ an H1N1/PuertoRico/8/34 gegen die H1N1-Schweinegrippe-basierten Impfkonstrukte zeigte einen Impfschutz von 10% in der Gruppe von H1cosw (Abb. 56) und 20% in der Gruppe von NPcosw (Abb. 58), in der Gruppe des trigenen Impfstoffs überlebten 22% der Mäuse (Abb. 59), jedoch auch 11% in der Kontrollgruppe (Abb. 60), entsprechend einer Maus, was im Bereich der Messungenauigkeit bei der statistischen Verteilung von Infektionen liegt.

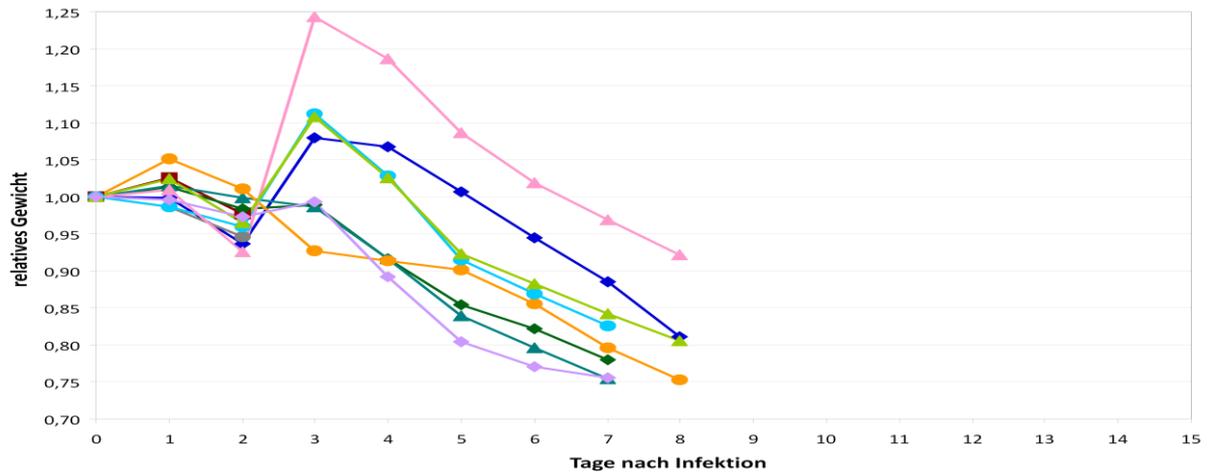


Abbildung 57 – Relative Gewichtsentwicklung nach Belastung von Mäusen mit 10 MLD₅₀ des homosubtypischen Influenzavirus A/PuertoRico/8/1934 (H1N1), welche mit dem GM-CSF-modulierten Plasmid pTH-M1cosw geimpft wurden

Nach einer Immunisierung mit NPcosw überlebten 20% der Mäuse (Abb. 58). Im immunodominanten CTL-Epitop des NP bei C57Bl/6-Mäusen existiert eine Aminosäuresubstitution im Belastungsvirus im Vergleich zum Impfstamm.

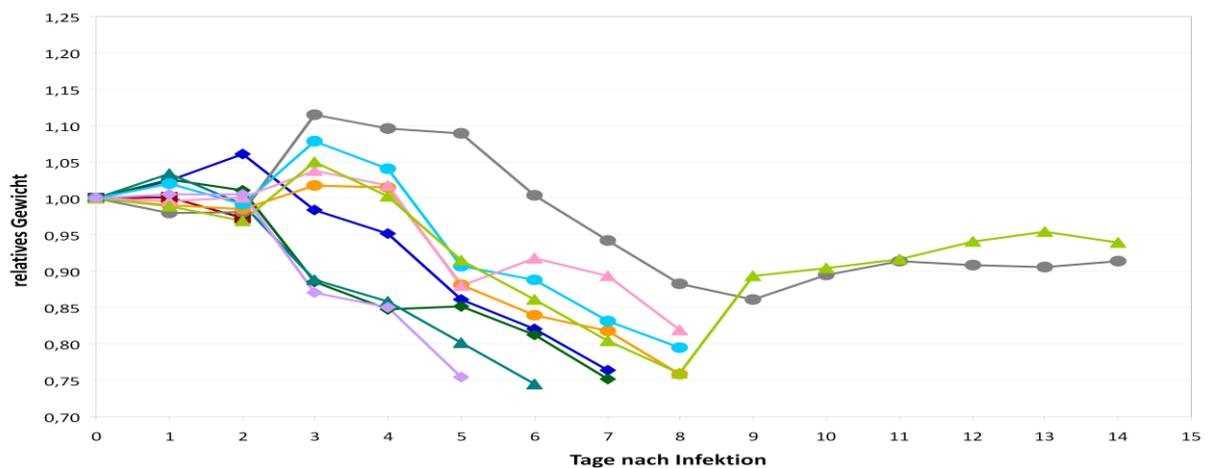


Abbildung 58 – Relative Gewichtsentwicklung nach Belastung von Mäusen mit 10 MLD₅₀ des homosubtypischen Influenzavirus A/PuertoRico/8/1934 (H1N1), welche mit dem GM-CSF-modulierten Plasmid pTH-NPcosw geimpft wurden

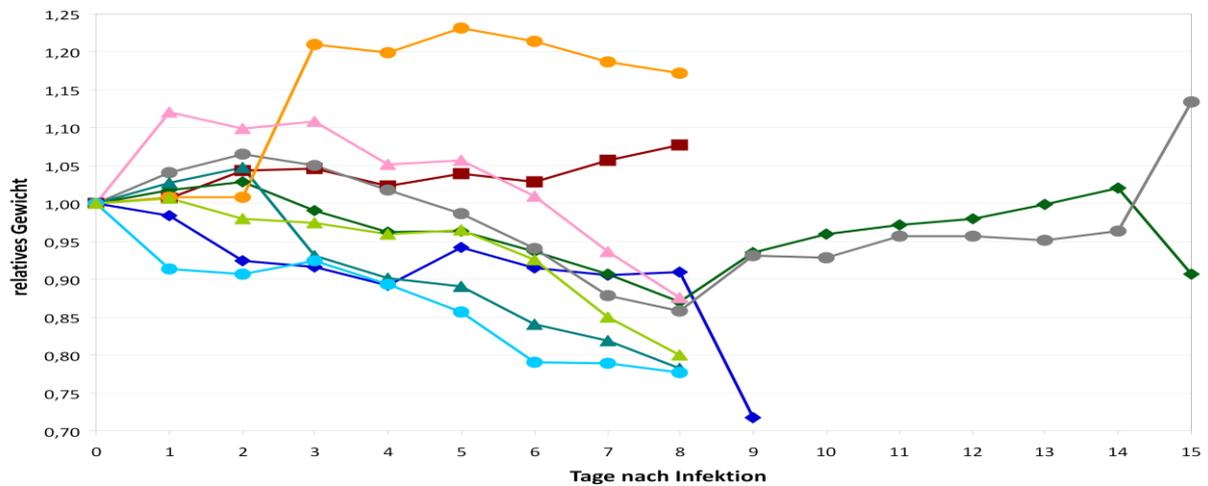


Abbildung 59 – Relative Gewichtsentwicklung nach Belastung von Mäusen mit 10 MLD₅₀ des homosubtypischen Influenzavirus A/PuertoRico/8/1934 (H1N1), welche mit dem trivalenten, GM-CSF-modulierten Impfstoff geimpft wurden

Die Überlebensrate betrug in der trivalent immunisierten Gruppe wie bei der des NPcosw 20% (Abb. 59). In der Kontrollgruppe überlebten 10% der Mäuse, entsprechend einer Maus (Abb. 60).

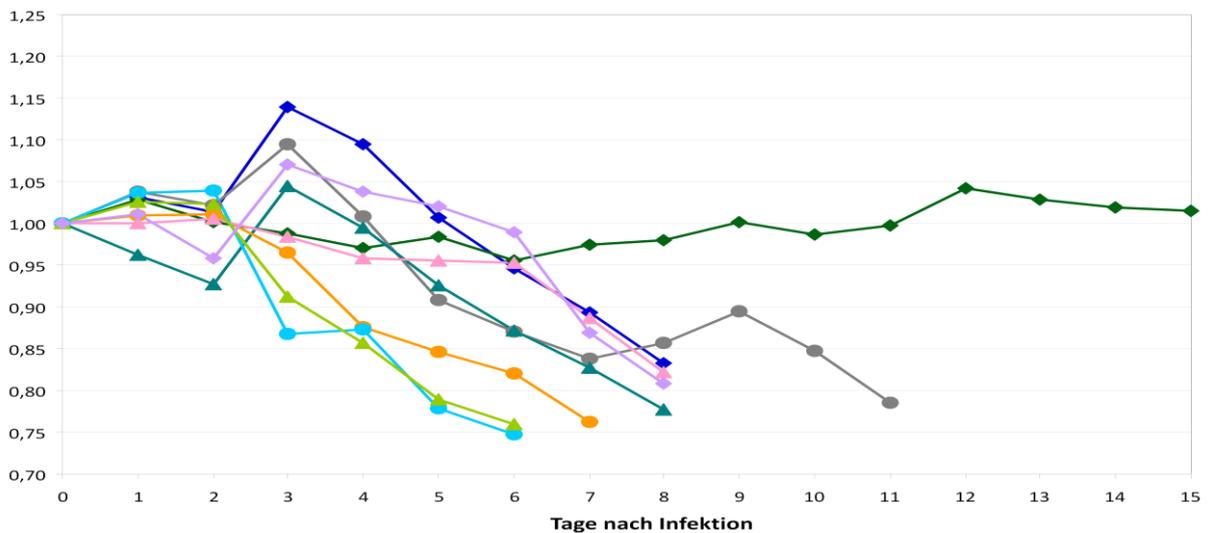


Abbildung 60 – Relative Gewichtsentwicklung nach Belastung von Mäusen mit 10 MLD₅₀ des homosubtypischen Influenzavirus A/PuertoRico/8/1934 (H1N1), welche mit dem GM-CSF-modulierten Kontrollvektor pTH-Leer geimpft wurden

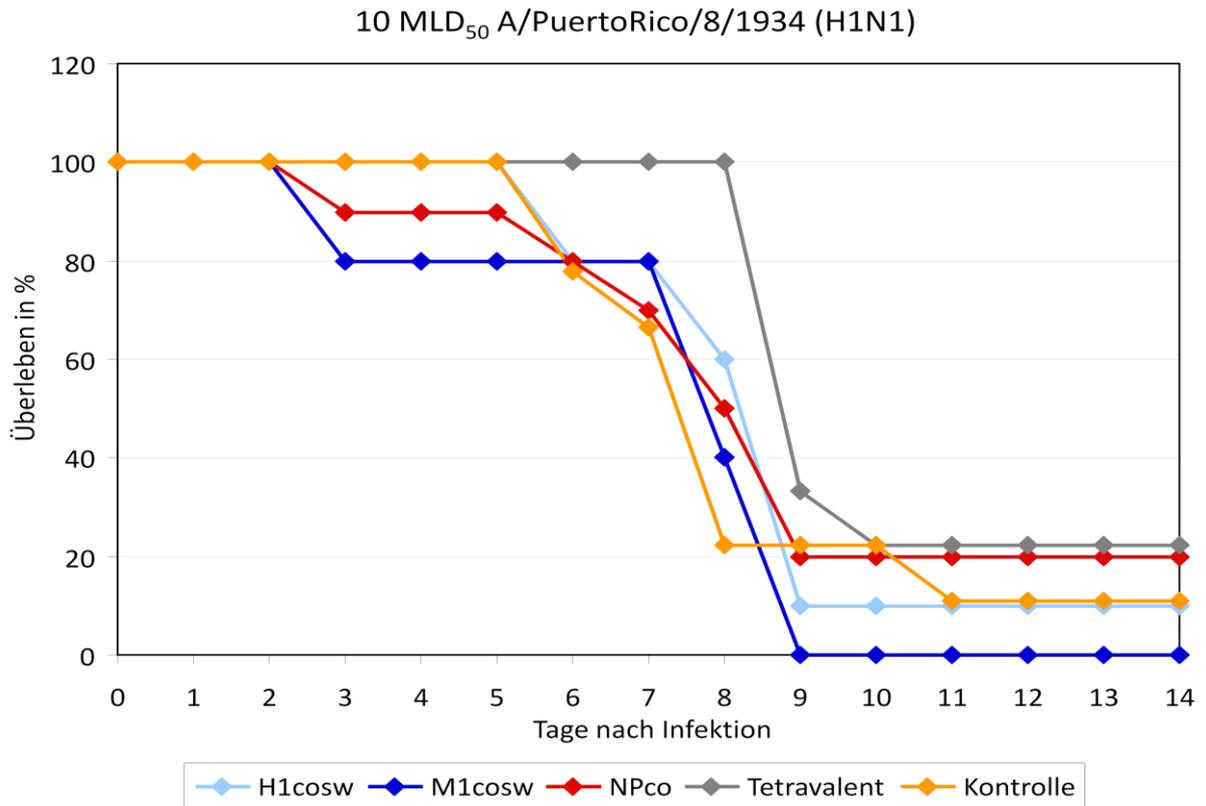


Abbildung 61 – Überlebensraten im Zeitverlauf nach Infektion mit 10 MLD₅₀ des Influenzavirus A/PuertoRico/8/1934, bei Erreichen eines Gewichtsverlusts von 20% wurden die Mäuse eingeschläfert

Diskussion

Vogelgrippe-Impfstoffe

Das ursprüngliche Ziel dieser Arbeit war die Erzeugung und Charakterisierung von CTL-induzierenden Plasmidimpfstoffen durch Klonierung des H5- und M2-Gens in Wildtyp- und Codon-optimierter Form. Das Hämagglutinin H5 ist ein Antikörper-neutralisierbares, aber variables Protein, während das M2 ein hochkonserviertes Protein ist, aber mit einer sehr kleinen und somit kaum Antikörper-zugänglichen extrazellulären Domäne. Aus Zeitgründen wurden zwei weitere hochkonservierte Gene jeweils per PCR im Wildtyp amplifiziert und gleichzeitig *de novo* erzeugt und in den Vektor pTH kloniert, das CTL-immunodominante NP-Gen und das M1-Gen. Die Erzeugung von Codon-optimierten Genen *de novo* wurde soweit optimiert, dass die Erzeugung eines Gens innerhalb eines Arbeitstages mit handelsüblichen Reagenzien erreicht werden kann. Diese Methode wurde als Erfindungsmeldung eingereicht.

Im Mausmodell³⁴⁶ ist Influenza in der Regel erst nach Anpassung an den Wirt durch serielle Passagen in einem Gewebe maximaler Virusproduktion (Lunge) oder mit begrenztem Immunsystem (Hirn) pathogen, wie der in den Belastungsversuchen verwendete Mäuse-adaptierte H1N1-Stamm A/PuertoRico/8/1934⁷⁹. Allerdings sind im Gegensatz dazu H5N1-Isolate direkt pathogen für Mäuse, wobei es keine einzelnen charakteristischen Mutationen gibt, die zu dieser Pathogenität in Mäusen führen, sondern mehrere Kombinationen⁸⁰ aus wachstumsfördernden Mutationen, wie zwei Mutationen im M1-Protein³⁴⁷.

Die Symptomatik von H5N1- oder mausadaptierter Influenza bei Mäusen unterscheidet sich in drei Hauptfaktoren von der beim Menschen, es gibt kein Fieber, keinen Husten und deshalb keine Virusausscheidung und Ausbreitung auf Artgenossen, wohl aber alle anderen Auswirkungen wie Appetitlosigkeit, Trägheit, Gewichtsverlust, Schüttelfrost und bei schweren Verlaufsformen auch eine Infektion des Hirns mit neurologischen Symptomen wie Enzephaloenteritis und Paresen bis hin zum Tod.

Herstellung der Immunogene und Modulatoren

Alle 4 Gene konnten sowohl als codon-optimiertes als auch als Wildtypvariante im Western Blot und per Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden, zytotoxische Effekte

wurden nicht beobachtet (Abb. 5-7). Die codon-optimierte Variante der jeweiligen Influenzogene wurde in allen 4 Fällen stärker exprimiert (Abb. 8), gleichzeitig zeigten sich auch in der ersten Impfreihe (Phase 1) höhere Konzentrationen an Antikörpern im ELISA bei H1, M1 und M2, mit Ausnahme von NP. Die Expression der beiden Varianten des Hämagglutinins (co & wt) ist im Vergleich zu den anderen Expressionskonstrukten von M1, M2 und NP relativ gering, was an der Länge des Proteins oder an einer Inhibition der Translation seitens des Proteins liegen kann, da die identische Aminosäuresequenz in beiden Konstrukten vorkommt und diese geringe Expression sich auf beide Hämagglutinin-Expressionskonstrukte erstreckte, welche beide in das übliche pTH-Plasmid-Rückgrat eingefügt wurden. Eine transkriptionsinhibierende DNA- oder RNA-Sequenz ist aufgrund des Austausches der meisten Codons im codon-optimierten Konstrukt im Vergleich zum Wildtyp eher unwahrscheinlich. Zudem kommt eine DNA von Influenzagenen in der Natur nicht vor, da Influenzaviren ein RNA-Genom besitzen und keine DNA-Zwischenstufe durchlaufen. Daher sind Abwehrmechanismen wie eine dagegen gerichtete Influenza-DNA-spezifische Translationsinhibition evolutionär unwahrscheinlich. Diese geringere Expression der H5-Konstrukte schlug sich auch in den Belichtungszeiten der ECL-Filme nieder, bei H5 musste mindestens 5 min. belichtet werden und jeweils zwei benachbarte Bahnen mussten dabei bandenfrei sein, um ein ausreichendes Signal ohne Überstrahlen durch Nachbarbanden im Western Blot zu erhalten. Dagegen wurden die Western Blots der anderen Konstrukte zwischen 1 und 5 sek. belichtet, die ECL-Signale von M2co, M2wt und IL21co konnten im Dunkelraum mit bloßem Auge betrachtet werden.

Lipopolysaccharid-Analyse der Plasmid-Reinheit

Der logarithmische Zusammenhang zwischen LPS-Konzentrationen unterhalb von 15µg/ml und der TLR4-Endocytose kann durch Messwiederholungen mit mehreren Messpunkten als Standardkurve zur LPS-Bestimmung verwendet werden. Der Zusammenhang gilt vermutlich auch bei noch niedrigeren Konzentrationen, als hier untersucht wurden und könnte durch mehr Messpunkte im unteren Bereich untersucht werden (um 15pg/ml). Der Beginn eines Abklingens des Effekts ist zu beobachten. Kommerziell erhältliche LPS-Testkits wie der Limulus-Amoebocyten-Lysat-Nachweis (LAL) PyroGene® von Lonza bieten eine Nachweisgrenze von 0,01 „Endotoxin Units“ (1EU entspricht 0,1ng LPS nach FDA-Definition), ergo im Bereich von einem Pikogramm pro Mililiter. Ein anderer Nachweis, der auf der Sekretion von IL-1b nach Inkubation einer Probe mit humanem Vollblut basiert, erreicht eine Sensitivität von 0,1pg/ml³⁴⁸.

Da die hier verwendeten Makrophagen der Maus im Vergleich zu humanen Makrophagen weniger LPS-sensitiv sind – die relative LPS-Dosis zur Induktion eines septischen Schocks liegt bei Menschen 1000-10000x niedriger als bei Mäusen^{349 350}, da Mäuse vermutlich aufgrund ihrer Lebensweise in Bodennähe und aufgrund der ernährungstechnischen Anpassung an organische Abfälle des Menschen toleranter für LPS sind - dürfte die hiermit erreichbare Sensitivität auch mindestens um den Faktor 1000 darunter liegen, im Bereich zweistelliger Nanogramm pro Milliliter, und somit niedriger als bei den anderen Nachweisen. Aus praktikablen Gründen könnte man die Verwendung einer Makrophagen-Zelllinie aus Primaten prüfen und eine Volumenreduktion auf das Mikrotiterplattenformat zur Herabsetzung der absoluten Sensitivität des Versuchsansatzes vornehmen. Bei niedrigeren LPS-Konzentrationen ist eventuell eine Erhöhung der Zellzahl notwendig, um eine statistische Signifikanz zu erhalten.

Phase I - Immunogene

Die Immunisierungsversuche mit einzelnen Immunogenen ermöglichte einen Vergleich der Codon-optimierten Variante der vier verwendeten Influenzogene mit dem Wildtypgen in Bezug auf die Induktion der jeweiligen Interferon- γ -sezernierenden Zellen, welche auf die korrespondierenden publizierten CTL-Epitope der jeweiligen Gene im ELISpot reagierten.

Die Milzzellen der Gruppen der OVA-Kontrolle zeigten im ELISpot Anzeichen einer akuten Entzündung, weshalb die betreffenden ELISpots mit gefrorenen Zellen nach einer Bestimmung der Lebendzellzahl zur Überprüfung der Durchführung und des Ergebnisses wiederholt wurden. Diese Entzündungsreaktionen äußerten sich in hohen Zahlen Interferon- γ -sezernierender Zellen sowohl nach Stimulation mit Influenzapeptiden als auch mit den Kontrollpeptiden oder auch ohne Peptide. Auch in der Wiederholung zeigten sich starke Reaktionen auf Kontrollpeptide. Erfreulicherweise blieb uns noch die Kontrollgruppe, die mit dem Leervektor pTH-Leer behandelt wurde, bei der die Reaktion auf Kontrollpeptide erwartungsgemäß gering war.

Unter allen untersuchten CTL-Epitopen der 4 Influenzogene hat das NP-Peptid ASNENMEAM (Peptid NP b4) mit Abstand die meisten Interferon- γ -sezernierenden Zellen (ISC) gezeigt, was sich sowohl hinsichtlich ihrer durchschnittlichen Anzahl zeigte - an der

oberen Nachweisgrenze - als auch ihrer Ansprechrate, wobei der Anteil der Mäuse mit ISC über 200 Spots / Million bei 90% der Mäuse lag.

Während sich im ELISpot nur geringe Unterschiede zwischen Codon-optimierten und Wildtypgenen hinsichtlich der Induktion von zytotoxischen T-Zellen zeigten, waren die Antikörpertiter im ELISA bei den Codon-optimierten Varianten von H5, M1 und NP deutlich höher als beim Wildtyp. Eine Ausnahme bildete hier das NP, dessen induzierte Antikörpertiter bei der Wildtypvariante deutlich erhöht waren.

Hinsichtlich der humoralen Ansprechrate von Mäusen, deren ELISA-Wert eine Extinktion (bei $\lambda = 495\text{nm}$) von 0,5 überschritt, wurden mit H5co 100% erreicht, während H5wt bei 60%, M1co bei 80%, M1wt bei 10%, NPco bei 30% und NPwt bei 50% lag.

Da die Induktion von Interferon- γ -sezernierender Zellen in dieser Phase unsere erste Priorität war und die ELISpot-Ergebnisse in beiden Varianten des NP bei einer Mehrzahl der Mäuse die obere Nachweisgrenze für das immunodominante CTL-Epitop für Influenza in C57Bl/6-Mäusen (MHC-Typ H2b) erreichte, wurde in folgenden Impfreihen bei allen vier Genen mit der stärker exprimierten Codon-optimierten Variante gearbeitet.

Phase II - Adjuvantien

In der zweiten Impfphase wurden verschiedene Plasmide von Immunomodulatoren in Kombination mit Plasmiden der vier Influenzagenen H5, M1, M2 und NP in ihrer Codon-optimierten Form verabreicht, um ihre Eignung zur nebenwirkungsarmen Verstärkung der zytotoxischen Immunantwort zu prüfen.

Das Gen von Interleukin-21 wurde im Verlauf dieser Arbeit in Codon-optimierter Form erzeugt, um das Gleichgewicht der entstehenden regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) und T_{H17} -Zellen aus dem gemeinsamen Vorläufer proinflammatorisch zu beeinflussen.

Alle verwendeten Immunomodulatoren führten zu einer deutlichen Verbesserung der Anzahl spezifischer Interferon- γ -sezernierender Zellen. Die Ansprechrate von Tieren mit mehr als 200 Interferon- γ -sezernierenden Zellen pro Million Splenozyten bei Kontakt mit dem immunodominanten NP-Peptid (NP b4: ASNENMEAM) stieg durch Verwendung der Immunomodulatoren von 90% bei dem tetragenen Impfstoff ohne Zusatz auf 100% bei allen

immunomodulierten Immunisierungsgruppen, die Kontrollgruppe lag erwartungsgemäß bei 0%.

Diese Werte wurden trotz der Einzeldosisreduktion beim tetragenen und adjuvantierten Impfstoff erreicht, denn während in Phase I noch 200µg des jeweiligen Plasmids und entweder 50µg eines Leervektors oder eines GM-CSF-codierenden Plasmides zur Munitionserstellung verwendet wurden, teilten sich ab Phase II vier Immunogene die Ladekapazität des Schlauches zu je 50µg von H5co, M1co, M2co, NPco und eines oder mehrerer Immunomodulatoren (oder eines Leervektors).

Bei der Gruppe mit GM-CSF war mit 100% der Anteil der Tiere am größten, deren ELISpot-Werte gegen das immunodominante NP-Peptid an der oberen Nachweisgrenze von 1600 Interferon-gamma-sezernierenden Zellen pro Million Splenozyten lag. Bei der Kombination von GM-CSF mit IL21co lag die Anzahl der Tiere mit ELISpot-Maximalwert bei 80 %, bei Einsatz von IL12 zeigten 90% der Tiere starke Reaktionen im ELISpot gegen das immunodominante NP-Peptid, während das IL21co nur zu einem Anteil von 30% führte. Der Anteil der Tiere mit Maximalwert im NP-ELISpot, welche ohne Immunomodulation tetragen immunisiert wurden, betrug 10% und in der Kontrollgruppe mit Leervektor erwartungsgemäß 0%. Daher wurde in allen folgenden Impfreiheiten die zelluläre Impfantwort mit GM-CSF verstärkt.

Die Ansprechquote gegen das immunodominante Peptid des M1co (M1 b1) lag ohne Immunomodulation bei 20%, in der Gruppe mit GM-CSF alleine 10%, mit GM-CSF und IL21co oder mit IL21co alleine ebenfalls bei 10% und in der Gruppe mit IL12 bei 30%, wobei auch die Höhe der einzelnen Werte an Interferon- γ -sezernierender Zellen bei M1 deutlich geringere Werte als bei NP erreichte. Die als positiv gezählten Werte des M1co lagen mit GM-CSF bei 250 ISC pro Million Splenozyten, bei GM-CSF und IL21co bei 700 und bei IL12 bei 2x300 und 1x700.

Leider hatte die Verwendung von T_{H1}-polarisierenden Immunomodulatoren auch in allen Fällen die erwartete gleichzeitige Abnahme der Antikörperantwort zur Folge, aufgrund der reziproken Beziehung zwischen humoraler und zellulärer Immunantwort. Die ELISA-Ansprechquote von Mäusen, deren Seren eine Extinktion von 0,5 überstieg, betrug beim H5co ohne Immunomodulation 10%, beim M1co ohne Immunomodulation 50% und beim NP ohne Immunomodulation 20%. Die ELISA-Ansprechquoten aller Gruppen mit Immunomodulation lagen bei 0% - außer der Gruppe mit IL21, bei der nur das NPco 10% erreichte.

Mit den übrigen Milzzellen dieser Impfreihe wurde ein Epitope-Mapping-ELISpot mit überlappenden Peptiden des H5, M1 und NP durchgeführt und das bisher unbekannte H2b-Epitop des Hämagglutinins AVGREFNNLE identifiziert.

Phase III – Stammesunterschiede zwischen Balb/C und C57Bl/6

Die Phase III diente zur Betrachtung der Stammesunterschiede in Mäusen mit T_{H1}-polarisierter Immunreaktion (Stamm C57Bl/6) im Vergleich zu Balb/c-Mäusen mit T_{H2}-polarisierter Immunantwort^{340 - 346}. Hierbei wurden allerdings unterschiedliche immunodominante Peptide verwendet, da C57Bl/6-Mäuse den MHCII-Haplotyp H2b besitzen, während Balb/C-Mäuse H2d zur Präsentation von Peptiden an MHCII-Komplexen verwenden. Gleichzeitig diente Phase III auch als Positivkontrolle für die Induktion von Antikörpern (T_{H1}), da Antikörper in Balb/c-Mäusen leichter zu induzieren sind, sofern es mit T_{H1}-polarisierenden Impfstoffen (pDNA per Gene Gun) und Immunomodulatoren (GM-CSF) überhaupt noch möglich sein sollte³⁵¹. Ebenso sollte die Immunogenität des M2 auf der Ebene der zellulären Immunität überprüft werden, denn M2-abgeleitete Peptide binden – laut Vorhersage mit SYFPEITHI und den Ergebnissen von Phase I und II – nicht an H2b bei C57Bl/6, während für den H2d-Haplotyp in Balb/C-Mäusen ein MHCII-präsentiertes Peptid des M2 bereits beschrieben wurde.

Sowohl die Ansprechquote wie auch die Höhe der einzelnen ELISpot-Ergebnisse waren bei den Balb/C-Mäusen erwartungsgemäß niedriger als bei den bisher untersuchten C57Bl/6. Die Spitzenwerte bezüglich der zellulären Immunantwort auf NP-Peptide der beiden vorangegangenen Phasen wurden bei Balb/C-Mäusen nicht erreicht. Die Gruppe mit tetragenem Impfstoff ohne Immunomodulator erreichte eine Ansprechquote der Mäuse mit mehr als 200 ISC/Million Splenozyten beim H5-Peptid (Peptid 107/108) von 60% und beim NP-Peptid (Peptid 29/30) von 50%. In der Kontrollgruppe ohne Immunogen oder Modulator waren nur beim H5-Peptid 20% messbar und in der Kontrollgruppe ohne Immunogen aber mit GM-CSF lagen die Werte bei 10% beim H5-Peptid und 10% beim NP-Peptid, vermutlich aufgrund statistischer Ausreißer. Durch den Einsatz des Immunomodulators GM-CSF wurde die Quote auf 70% für das H5- oder das NP-Peptid gesteigert. Weder das publizierte immunodominante Peptid von M1 noch das von M2 erzeugte eine Reaktion im ELISpot über dem Schwellenwert. Vermutlich ist selbst das dominanteste H2d-präsentierte Peptid von M1 oder M2 noch zu wenig immunogen im Vergleich zu denen der beiden anderen Influenza-Proteine.

Die Gruppe ohne Immunomodulator erreichte im ELISA beim M1-Protein (M1 d1) mit 100% von Mäusen mit einer Extinktion von mehr als 0,5 die höchste Ansprechquote. Die Gruppe mit Immunomodulation durch GM-CSF hatte zwar nur 80% Ansprechquote auf das M1-Peptid, aber die Antikörper-Immunkantwort war etwas breiter, denn die Proteine des H5 und des NP erreichten im ELISA 10% und 40%, respektive. Die Kontrollgruppen lagen beide erwartungsgemäß bei 0%.

Phase IV – niedrig dosierte Belastung mit drei Stämmen

Die Phase IV diente als erster Infektionsversuch zur Bestimmung des Impfschutzes gegen eine niedrige tödliche Dosis (fünffache Menge der Dosis mit 50% Maus-Mortalität, 5 MLD₅₀) an Influenzaviren dreier verschiedener Stämme. Der erste Stamm war der identische Stamm, aus dem der Impfstoff konstruiert worden war, Vietnam/1194/2004 (H5N1). Die homosubtypische Belastung erfolgte mit einem deutschen Stamm desselben Serotyps H5N1, Germany/R65/2006, und die heterosubtypische Belastung mit dem H1N1-Stamm PuertoRico/8/1934. Der H1N1-Stamm ist mäuseadaptiert, da mit Ausnahme der H5N1-Stämme Influenza für Mäuse ohne Passagierung apathogen ist.

Die mit dem GM-CSF-modulierten, tetragenen Impfstoff behandelten Gruppen zeigten bei der autologen Belastung mit 90% Überleben im Vergleich zur Leervektor-Kontrollgruppe mit 0% sowie bei der homosubtypischen Belastung mit 80% im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 11% einen weitreichenden Schutz vor der Infektion mit 5 MLD₅₀ beider H5N1-Stämme. Dagegen konnte kein Impfschutz vor heterosubtypischer Belastung mit dem verwendeten H1N1-Stamm beobachtet werden. Sowohl die mit GM-CSF-modulierten, tetragenen Impfstoff behandelten Gruppen als auch die Kontrollgruppe verstarben vollständig. Das immunodominante CTL-Epitop des NP im H1N1-Belastungsvirus (ASNENMETM) unterscheidet sich von dem korrespondierenden Epitop im Impfstoff (ASNENMEAM) durch den Austausch der Aminosäure Threonin mit hydroxylierter Seitenkette gegen ein Alanin mit aliphatischer Seitenkette.

Das immunodominante NP-Peptid (Position 366-74) in C57Bl/6-Mäusen mit der Sequenz ASNENMDAM aus der Literatur wurde in den ELISpots der Phase I verwendet, ab Phase II wurde auf ASNENMEAM aus dem autologen Stamm Vietnam/1194/2004 gewechselt. Das korrespondierende NP-Peptid des Stammes Germany/R65/2006 war identisch.

Phase V – hohe Belastung mit Steigerung der Impfdosis

In Phase V wurden Mäuse mit jeweils 2 oder 4 Schuß der Gene Gun an beiden Immunisierungstagen behandelt. Zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung wurden die Mäuse jeweils mit 50 MLD₅₀ eines der beiden H5N1-Stämme intranasal belastet.

Auch bei der hohen Belastungsdosis war der Impfschutz gegen beide H5N1-Stämme zu beobachten. Die normal geimpfte Gruppe (2 x 2 Schuß) war mit 70% Überlebenden nach Infektion mit Germany/R65/2006 und 70% nach Vietnam/1194/2004 im Vergleich zu den Kontrollgruppen mit jeweils 0% und 16%. Diese Überlebensraten ließen sich durch Verdopplung der Impfdosis (2 x 4 Schuß) auf 86% und 22%, respektive, verändern. Hierbei zeigte sich, dass eine Sättigung der Impfreaktion mit 2 x 2 Schuß beim Stamm R65 noch nicht erreicht wurde. Beim Stamm VN1194 zeigte sich möglicherweise eine Konkurrenz zwischen Lunge und Haut bezüglich der Rekrutierung von zytotoxischen T-Zellen, wodurch keine Wirkungssteigerung bei Dosissteigerung mehr auftrat. Dieser Effekt kann durch Verlängerung des Zeitraumes zwischen Impfung und Belastung umgangen werden. Die Dosis-Wirkungs-Beziehung zeigte beim Stamm R65 eine proportionale bis synergistische Tendenz, die durch weitere Erhöhung der Impfdosis und der Messpunkte genauer untersucht werden sollte. Die vergleichsweise höhere Pathogenität des H5N1/Vietnam/1194/2004 im Vergleich zu H5N1/Germany/R65/2006 liegt vermutlich daran, dass ersteres Virus als humanes Isolat bereits Anpassungen für Säugetierzellen aufwies, während R65 aus einem Höckerschwan stammte.

Phase VI – Korrelate des Impfschutzes bei mittlerer Belastung

Die letzte Belastungsphase mit vorheriger Impfung mit H5N1-Immunogenen diente der Ermittlung der schützenden Komponenten im tetragenen Influenzaimpfstoff gegen homosubtypische Belastung, welche im Vergleich zur autologen Belastung den typischeren Infektionsfall in der Natur darstellt.

Während die H5co- oder NPco-immunisierten Gruppen mit 20% und 30% Überlebensrate geschützt waren, verstarben die M1co- oder M2co-immunisierten Tiere vollständig. In der Kontrollgruppe mit Leervektor überlebten 10%. Die Gruppe des tetragenen Impfstoffs zeigt

eine additive Tendenz der beiden wirksamen enthaltenen Gene mit 60% Überlebensrate beim tetragenem Impfstoff.

Tabelle 13 - Zusammenfassung der Belastungsversuche mit dem tetragenem, GM-CSF-verstärkten Impfstoff der H5N1-Gene

Überlebensraten	2x 2 Schuss 5 MLD ₅₀	2x 2 Schuss 10 MLD ₅₀	2x 2 Schuss 50 MLD ₅₀	2x 4 Schuss 50 MLD ₅₀
Autologe Belastung VietNam/1194/2004	90%	n.t.	70%	22%
Homosubtypisch Germany/R65/2006	80%	60%	70%	86%
Heterosubtypisch PuertoRico/8/1934	0%	n.t.	n.t.	n.t.
Kontrollgruppen nach Belastungsstamm	0% VN1194 11% R65 0% PR8	10% R65	16% VN1194 0% R65	16% VN1194 0% R65

Ein auf zytotoxischen T-Zellen basierender Schutz vor Influenzainfektion mit einem autologem Stamm ist bereits oft gezeigt worden ^{352 353 354 355 356 357 358}, auch in Primaten ¹⁰⁷. Auch wurden kreuzreaktive CTL gegen Peptide der H5N1-Influenza in Menschen ^{76 359 360} und Mäusen ³⁵⁴ nachgewiesen. Ebenso konnten Mischungen von HA- und NP-exprimierenden Vesiculostomatitis Viren (VSV) ³⁶¹, inaktiviertes Virus ³⁶², DNA & Adenovirale Vektoren (Ad5) ^{363 364}, elektroporierte DNA ³⁶⁵, H5-Plasmiden ³⁶⁶, NP-Plasmiden ³⁶⁷, MVA-H5 ³⁶⁸ einen Schutz gegen mehr als nur den autologen Stamm vermitteln, jedoch beruhte der Impfschutz auf Antikörpern. Entgegen mancher Meinung ³⁶³ konnten wir hier zeigen, dass hohe Zahlen an zytotoxischen T-Zellen vor einer Influenzaerkrankung schützen können.

Phase VII – Transfer der Erkenntnisse auf die Schweinegrippe

Die mexikanische Schweinegrippe H1N1 und ihre Varianten haben die höchste Pandemiestufe 6 der WHO ausgelöst, weil dieser Erreger hohe Infektionszahlen und eine geringe präexistierende Herdenimmunität aufwies. Weiterhin hatte die WHO im Februar 2009 die Einstufungskriterien verschärft, wodurch das Erreichen der Stufe 6 bei vielfacher humaner Übertragung in mindestens 2 WHO-Weltregionen eintrat. Das Fehlen der Sterberate (Mortalität) eines Erregers in der Stufen-Definition ist kritisiert worden³⁶⁹. Trotz des relativ milden Verlaufs wurden bis April 2010 über 17700 Tote der Schweinegrippe in 213 Ländern labordiagnostisch bestätigt³⁷⁰.

Die Ähnlichkeit des aus der Schweinegrippe stammendem NP₃₆₆₋₇₄-Peptids ASNENVETM und das im ursprünglich vorgesehenen Belastungsstamm vorkommende ASNENVEIM ließ hoffen, dass auch diese Peptide in C57Bl/6-Mäusen hohe Zahlen an Interferon- γ -sezernierenden Zellen induzieren können und so vor Belastung mit dem homosubtypischen H1N1-Virus (A/Regensburg/D6/2009 Maus-adaptiert) schützen können. Diese Hoffnung wurde in der SYFPEITHI-Simulation gestützt durch die noch höhere berechnete Bindungsaffinität des Schweinegrippe-basierten Peptids an den MHC-Haplotyp H2b im Vergleich zum Vogelgrippe-basierten immunodominanten NP-Peptid.

Das korrespondierende Epitop im letztendlich verwendeten H1N1-Stamm A/PuertoRico/8/34 war ASNENMETM, mit einem Aminosäure-Austausch an Position 371. Aufgrund der Methylierungen der Seitenkette weist das Methionin in dem CTL-Epitop dieses Belastungsstammes vermutlich größere Ähnlichkeit zum entsprechenden Valin des Impfstammes auf als beim ursprünglich vorgesehenen Belastungsstamm. Bei dem ursprünglich vorgesehenen Schweinegrippe-Belastungsstamm ist ein Austausch der aliphatischen Seitenkette des Isoleucins mit einer polaren Gruppe wie der des hydroxylierten Threonins an Position 373 zu verzeichnen – und in Phase IV wurde der fehlende Impfschutz bereits mit dem heterologen Belastungsstamm (ASNENMETM gegen ASNENMEAM im Impfstamm) beobachtet. Das Fehlen der erwarteten Kreuzreaktivität und des Impfschutzes beim H1N1-basierten NPcosw-Konstrukt lag daher vermutlich am Austausch des an der Seitenkette methylierten Schwefels des Methionins gegen ein Valin mit aliphatischer Seitenkette an Position 371 des Nucleoproteins im immunodominanten CTL-Epitop bei C57Bl/6-Mäusen.

Leichte Unterschiede im dominanten NP-Epitop können die Breitenwirksamkeit des Impfschutzes aushebeln^{250 251 252}, letztendlich muss man CTL-Induktion und Impfschutz im

Einzelfall untersuchen und durch mehr als einen Angriffspunkt die Fluchtmutationen verhindern. Die Vorhersage eines Impfschutzes vor Influenza bleibt mangelhaft^{371 372 373 374}
³⁷⁵.

Ausblicke

Eine Überprüfung der Korrelation der Schutzwirkung mit dem NP₃₆₆₋₇₄-Epitop kann durch Belastungsversuche in „Knock-Out“-Mäusen für humorale und zelluläre Immunität nach vorhergehender Impfung einzelner Influenza-Gene durchgeführt werden. Zusätzlich bieten sich auch selektive Zelldepletionen (CD4, CD8) und adoptive Transfers von zytotoxischen T-Lymphozyten und Antikörpern als Versuch an.

Belastungsversuche mit vorheriger Impfung mit jeweils einer Punktmutante des NP der variablen Positionen 371, 372 und 373 könnten die Schutzwirkung einzelner Epitopvarianten bezüglich anderer Stämme aufzeigen – in Anlehnung an die in der Natur existierenden NP₃₆₆₋₇₄-Varianten – mit einer anschließenden Infektion mit jeweils einem der vier hier verwendeten Virenstämme (2x H5N1, 2x H1N1).

Das Ziel der Induktion von zytotoxischen T-Zellen gegen Influenza ist der heterosubtypische Schutz auch vor einer H5N1-Infektion, wie es bisher nur mit in Liposomen aus Phosphatidylcholin und Cholesterol verpackte, rekombinante Proteine³⁷⁶, liposomalen CTL-Epitopen³⁷⁷, durch γ -Bestrahlung inaktivierte Viren^{378 379 380}, intranasal applizierte, inaktivierte Viren mit Myceleextrakten von *Phellinus linteus*³⁸¹, oder M2- und NP-transgene adenovirale Vektoren³⁸² erreicht wurde.

Mit den bei Influenza häufiger auftretenden NP₃₆₆₋₇₄-Epitopen ASNENMDAM, ASNENMDTM und den hier verwendeten ASNENMEAM und ASNENMETM wird ein großer Teil der NP₃₆₆₋₇₄-Varianten der Influenzaviren abgedeckt^{77 383 384}, mit den Epitopen ASNENVEIM und ASNENVETM wären auch Schweinegrippe-Isolate eingeschlossen. Die Vogelgrippe-Isolate Indonesiens der Jahre 2005-2006 weisen ASNENMEVM auf, ASNENVEAM trat in Vogelgrippe-Isolaten aus Honkong im Jahre 1997 auf, ASNENMDNM in H3N2-Isolaten aus Memphis im Jahre 1990. H5N1-Isolate von Hühnern aus Guiyang (China, 2005) und von Enten aus Guanxi (China, 2004) besitzen die selteneren Epitope ASNENIETM und ASNENLETM³⁸⁵.

Eine Kombinationsimpfung dieser NP-Punktmutanten könnte ebenfalls zu einem breiteren Impfschutz führen. Dies gilt auch für die Induktion Interferon- γ -sezernierender Zellen durch M1-Konstrukte. Eine Möglichkeit zur Umgehung der CTL-Immundominanz, also der Bevorzugung einzelner Peptide während der Immunantwort, ist die zeitliche oder lokale Trennung der Impfungen mit diesen immunorezessiven CTL-Epitopen. Dies gilt auch für die immunrezessiven CTL-Epitope von H5co und M2co. Diese Erkenntnisse könnten dann auf das entsprechende humane immunodominante CTL-Epitop des NP übertragen und an immunologisch humanisierten Mäusen untersucht werden. Die Verwendung multipler Fluchtvarianten eines Epitops zur Immunisierung sollte die Gefahr von Fluchtmutationen senken, deren Bandbreite zusätzlich durch die ohnehin bestehende funktionale Selektion begrenzt wird. Ein zusätzlich polygener Ansatz erhöht den immunologischen Selektionsdruck auf das Virus und verringert die Gefahr von Fluchtmutationen, da die Wahrscheinlichkeit der gleichzeitigen Entstehung von mehreren Fluchtmutationen mit jeder weiteren Selektion abnimmt.

Bei dem verwendeten Hämagglutinin von Vietnam/1203/2004 wurde auch aus anderen Quellen über niedrige Ausbeuten berichtet ³⁸⁶. Diese spiegelt sich auch in der H5-Expression der in unserer Arbeitsgruppe existenten H5-transgenen Adeno-assoziierten Viren, Adenoviren und „Modified Vaccinia Ankara“ (MVA) wieder. Das H5-Antigen kann mit einem Hämagglutinins mit stärkerer Expression gewechselt werden, jedoch empfehlen sich für H5- und insbesondere M2-Konstrukte andere Impfstrategien als eine polygene Impfung von Plasmid-DNA per Gene Gun, weil die damit verbundene T_{H1}-Polarisierung selten eine Induktion von Antikörpern in einem schützenden Umfang erlaubt und beide als Oberflächenproteine für Antikörper zugänglich sind, sofern sie nicht durch Zelloberflächenproteine maskiert werden.

Breitenwirksame neutralisierende Antikörper ^{387 388 389 390 391} sind beschrieben und werden momentan für eine passive (nicht-prophylaktische) Immunisierung von Menschen vorbereitet. Daraus erfolgten aber bisher nur Versuchsansätze bei der Ectodomäne des M2 (M2e) als Fusionsprotein mit einer Tetramerisierungsdomäne ³⁹² oder bei repetitiven Peptiden der Ectodomäne ^{393 394} mit einer Immunisierung zur Erzeugung dieser Antikörper in den geimpften Versuchstieren. Eine Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten findet mangels Übertritt ins Zytosol und der Prozessierung und Präsentation an MHC I nicht statt. Mögliche Reaktionen auf den aus der Hefe stammenden Anteil des Proteins und Wechselwirkungen mit der Darmflora wurden nicht untersucht. Auch kann die Verabreichung von M2e-DNA in Schweinen eine Erkrankung verschlimmern ³⁹⁵. M2 sollte daher dimer oder tetramer in paralleler Orientierung auf einem Konstrukt präsentiert werden ²⁵⁵, bei dem die

kurze M2-Ektodomäne nicht mit anderen zellulären oder viralen Proteinen maskiert wird. Diese Konstrukte können nicht per Gene Gun verabreicht werden, da eine endogene Expression des M2-Proteins durch den Impfling dessen Maskierung durch wirtseigene Zelloberflächenproteine einschließt^{392 394}.

Die extrazelluläre Domäne des Hämagglutinins ist hochvariabel und daher ist die Antikörperantwort dagegen stammspezifisch. Durch eine Deletion von Membran-distalen Teilen der extrazellulären Domäne könnten die bisher selten beobachteten breit-neutralisierenden Antikörper gegen den Membran-proximalen Bereich der Fusionsdomäne auch durch Immunisierung erzeugt werden, auch hier müsste einer Maskierung vorgebeugt werden^{387 388 389 390}.

Weitere Kombinationen von Zytokinen und Kostimulatoren könnten einen Synergismus mit der Wirkung des T_{H1}-polarisierenden Immunomodulators GM-CSF aufweisen, oder – vermutlich auf Kosten der zytotoxischen T-Zell-Antwort – eine stärkere Antikörperinduktion ermöglichen. Insbesondere die Koapplikation von Expressionsvektoren doppelsträngiger, nichtkodierender RNA viralen Ursprungs von über 90 bp Länge könnte mit der Gene Gun angewendet über eine zusätzliche Aktivierung des TLR3 der dendritischen Zellen der Haut (Langerhans-Zellen) die Antigenprozessierung und -präsentation verbessern³⁹⁶.

Eine Beschichtung der Gene Gun Munition mit Polyethylenimin (PEI) an Stelle von Polyvinylpyrrolidon (PVP) könnte die Transfektionsrate der Gene Gun erhöhen³⁹⁷.

Da der Knall der Gene Gun so laut ist, dass die Mäuse dafür narkotisiert werden müssen und die Bediener einen Hörschutz tragen müssen, würde ein Schalldämpfer die Akzeptanz einer Anwendung am Menschen erhöhen. Die *in vivo* Transfektion ist eine ebenfalls T_{H1}-aktivierende Methode, die diesen Umstand umgeht, weniger Infrastruktur erfordert und eine Antikörperinduktion erleichtert. Erfolgt diese Applikation auf Schleimhäuten, könnten zudem mukosale Antikörper induziert werden, welche insbesondere gegen Infektionen der Mucosa der Atemwege wie bei Influenza sinnvoll sein könnten.

Eine kovalente Konjugation von Plasmid-DNA an ein Zell-penetrierendes Peptid (CPP) wurde bisher nicht mit Erfolg versucht. Ein synthetisches Konstrukt aus einem Zell-penetrierenden Peptid (wie Tat) als „Peptide Nucleic Acid“ (PNA) und einer zum Rückgrat des pTH-Vektors komplementären DNA-Sequenz ermöglicht vermutlich die sequenzspezifische Hybridisierung des PNA-DNA-Konstrukts mit dem Plasmiden und gleichzeitig eine Verbesserung der zellulären Aufnahme, Expression und Immunantwort.

Zusammenfassung

DNA-Impfstoffe können, per Gene Gun verabreicht, vergleichsweise hohe Zahlen an zytotoxischen T-Lymphozyten induzieren. Im Gegensatz zu gespaltenen oder inaktivierten Viren kann mit konservierten CTL-Epitopen eine breitere Immunität gegen mehrere Virusstämme vermittelt werden.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden die Gene HA, M1, M2 und NP von Influenza (A/Vietnam/1194/2004, H5N1-clade 1) in Codon-optimierter und Wildtyp-Variante erzeugt und in das Plasmid pTH ligiert. Die Plasmid-Präparationen wurden auf ihren Gehalt an Lipopolysacchariden hin untersucht. Nach einer Überprüfung der Expression in Zellkulturen wurden Mäuse per Gene Gun mit den DNA-Konstrukten in Kombinationen mit Plasmiden von Immunomodulatoren geimpft. Als Immunomodulatoren wurden Plasmide von GM-CSF, IL-12 und IL-21 in Kombinationen appliziert. Impfreaktionen wurden im ELISpot und ELISA untersucht. Unter den von Influenza abgeleiteten, untersuchten Peptiden war das Peptid NP₃₆₆₋₃₇₄ immunodominant in C57Bl/6-Mäusen. Über 80% der immunisierten Mäuse hatten im ELISpot > 1600 Spots / Million Splenozyten gegen dieses Epitop.

Der aus den vier Influenzagenen bestehende, GM-CSF-verstärkte Impfstoff wurde für Belastungsstudien mit verschiedenen Influenzastämmen eingesetzt und vermittelte über 80% Schutz gegen bis zu 50 MLD₅₀ eines aus einer anderen H5N1-Untergruppe stammenden Virus (A/Germany/R65/2006, H5N1-clade 2.2), nicht aber gegen 5 MLD₅₀ eines H1N1-Stamms (A/PuertoRico/8/1934). Dieser Schutz basierte hauptsächlich auf dem Gen des Nucleoproteins (NP) und in geringerem Umfang auf dem Hämagglutinin. Eine Aminosäuresubstitution an der variablen Position 373 des in der zytotoxischen Immunantwort von Mäusen immunodominanten NP₃₆₆₋₇₄-Peptids im Belastungsstamm führte wahrscheinlich zum kompletten Verlust des NP-basierten Impfschutzes.

Summary

When applied with a Gene Gun, DNA vaccines are able to induce a relatively strong cytotoxic T-cell response. Immunity against a wider range of virus strains may therefore be achieved compared to that induced using split viruses or inactivated viruses.

In this study, the HA, M1, M2 and NP genes of influenza (A/Vietnam/1194/2004, H5N1-clade 1) were produced in both wild-type and codon-optimised forms and ligated into the plasmid pTH. Plasmid preparations were tested with regard to their lipopolysaccharide content. After confirming protein expression in cell culture, mice were immunised with the DNA constructs via Gene Gun together with immunomodulatory plasmids (GM-CSF, IL-12 and IL-21) in different combinations. The resulting immune reactions were analysed by ELISpot and ELISA. Of the peptides tested, NP₃₆₆₋₃₇₄ was found to be immunodominant in C57Bl/6 mice, with over 80% of the immunized mice developing epitope-specific T-cell frequencies of 1600 or more per million splenocytes in the ELISpot.

The protective efficacy of a vaccine containing plasmids coding for four influenza genes plus GM-CSF was evaluated by challenging immunised mice with pathogenic influenza virus. Over 80% of mice could be protected against challenge with up to 50 MLD₅₀ of a virus belonging to a different H5N1 clade (A/Germany/R65/2006, H5N1-clade 2.2), but not against 5 MLD₅₀ of an H1N1 strain (A/PuertoRico/8/1934). This protection relied predominantly on responses to the nucleoprotein (NP) gene and to a lesser extent to those specific for hemagglutinin. An amino acid substitution at the variable position 373 in the immunodominant peptide NP₃₆₆₋₇₄ for cytotoxic T-cells appeared to abrogate the NP-based protection.

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle allen Menschen herzlich danken, die mich in der Promotion mit Gesprächen oder bei der Durchführung von Experimenten unterstützt haben.

Zuerst möchte ich Prof. Reinhard Kurth für die Betreuung, die finanzielle Unterstützung und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danken. Weiterhin danke ich sehr herzlich vor allem Dr. Stephen Norley, aber auch Dr. Isaac Sipo für die hilfreichen Diskussionen, aufgrund derer diese Arbeit ihre Struktur bekam. Einen besonders herzlichen Dank möchte ich an meine Mitdoktorandinnen Dr. Christine Siegismund, Judith Wildner und Janna Seifried für die schöne gemeinsame, mit wertvollen Gesprächen verbrachte Zeit richten. Prof. Dr. Antonio Siccardi und Dr. Markus Möbs möchte ich für die freundschaftliche Unterstützung während und nach der Arbeit danken.

Auch möchte ich den Mitarbeiterinnen des Tierstalls, vor Allen Anette Dietrich und Patrizia Müzlitz für die liebevolle Pflege der Tiere, Dr. Stefan Kaulfuß für die Freundschaft und Mitarbeit bei den durchflusszytometrischen Versuchen, Dr. Kazimierz Madela für die Hilfe am cLSM, den Mitarbeitern des Sequenzierlabors sowie unseren technischen Assistentinnen Verena Dolata, Nicole Norley und insbesondere Sandra Kühn für die hilfreiche Unterstützung bei Immunisierung, Milzaufarbeitung und ELISA danken. Abschließend gebührt meinen Eltern, Dr. Marion und Thies Knauf, welche mir das Studium und somit auch die Dissertation ermöglichten, der größte Dank.

Veröffentlichungen

Soprana, E., Panigada, M., Knauf, M., Radaelli, A., Vigevani, L., Palini, A., Villa, C., Malnati, M., Cassina, G., Kurth, R., Norley, S., Siccardi, A.G., Joint production of prime/boost pairs of Fowlpox Virus and Modified Vaccinia Ankara recombinants carrying the same transgene. *J Virol Methods* 174(1-2):22-8 (2011)

Sipo, I., Knauf, M., Fechner, H., Poller, W., Planz, O., Kurth, R., Norley, S., Vaccine protection against lethal homologous and heterologous challenge using recombinant AAV vectors expressing codon-optimized genes from pandemic swine origin influenza virus (SOIV). *Vaccine* 11; 29(8):1690-9 (2011)

Knauf, M., Norley, S., Kurth, R., Polygenic Gene Gun Vaccination induces high levels of Cytotoxic Lymphocytes and provides cross-clade Protection against lethal Influenza H5N1 infection, in Vorbereitung.

Anhänge

Verwendete Puffer und Reagenzien

DMEM komplett

100 ml/l Fetal Bovine Serum (Biochrom)
10 ml/l 200 mM Glutaminlösung
mit 0,85% NaCl (Gibco BRL)
5 ml/l PenStrep-Lösung (Gibco BRL)
(= 80 U/ml Penicillin, 80 mg/l Streptomycin)
In Dulbecco & Vogt's
Modified Eagle's Medium
(DMEM von Gibco BRL)

Phosphate-buffered Saline (PBS)

0,137 M NaCl
0,0027 M KCl
0,0081 M NaH₂PO₄
0,0015 M KH₂PO₄
In Aq.dest.
Mit HCl ad pH 7,2

Trypsin-EDTA-Lösung

2,5 g/l Trypsin
1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

RPMI 1640 komplett

100 ml/l Fetal Bovine Serum (Biochrom)
10 ml/l Glutaminlösung (Gibco BRL)
5 ml/l PenStrep-Lösung (Gibco BRL)
50 µM β-Mercaptoethanol
In Roswell Park Memorial Institute
Medium (RPMI1640 von Gibco BRL)

TritonX-100-Lysispuffer

20 mM Tris
150 mM NaCl
10 ml/l TritonX-100
Mit HCl ad pH 7,7
Frisch anzusetzen :
1 Tablette pro Liter von Roche Complete

TE-Puffer

10 mM Tris
1 mM EDTA
In Aq.dest.
Mit HCl ad pH 8

DNA-Probenpuffer

650 g/l Saccharose
4 g/l Orange G
10 mM EDTA
in TE-Puffer

Trenngelpuffer

1,5 M Tris
In Aq.dest.
Mit HCl ad pH 8,8

Lämmli-Probenpuffer

20 g/l Natriumlaurylsulfat
50 ml/l β -Mercaptoethanol (=710 mM)
250 ml/l Glycerol
125 ml/l Sammelgelpuffer pH 6,8
0,01 % Bromphenolblau
In Aq.dest.

Transferpuffer (Blotpuffer)

25 mM Tris
192 mM Glycin
200 ml/l Methanol
In Aq.dest.

PBS-T

1 ml/l Tween20 von Sigma
In PBS

TAE-Puffer

40 mM Tris
20 mM Essigsäure
1 mM EDTA
In Aq.dest., pH 8,2

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris
In Aq.dest.
Mit HCl ad pH 6,8

PAGE-Puffer (Laufpuffer)

3,03 g/l Tris (= 25 mM)
14,41 g/l Glycin (= 192 mM)
1 g/l Natriumlaurylsulfat
In Aq.dest., pH 8,3

Blot-Blockierungspuffer

Frisch anzusetzen :
50 g/l Magermilchpulver (Sucofin)
In PBS-T

Denaturierungspuffer

6M Urea
100mM β -Mercaptoethanol
In Aq.dest.

Gelfixierlösung

5% V/V Essigsäure
(mit 96% V/V)
40% V/V Ethanol
(mit 96% V/V, vergällt)
In Aq.dest.

Adsorptionspuffer

50 mM Natriumhydrogencarbonat
0,2 g/l Natriumazid
In Aq.dest.
Mit NaOH ad pH 9,6

ELISA-Blockpuffer (PM)

Frisch anzusetzen :
20 g/l Magermilchpulver
In PBS

OPD-HRP-Substratpuffer

50 mM Citronensäure
50 mM Natriumdihydrogenphosphat
Mit HCl ad pH 5
Frisch anzusetzen :
400 mg/l o-Phenylendiamin
400 ml/l H₂O₂ (30%)

AEC-HRP-Substratpuffer

20mM Natriumacetat
In Aq.dest.
Mit H₂SO₄ ad pH 5
Frisch anzusetzen :
1 ml/l H₂O₂ (30%)
200 mg Aminoethylcarbazol in 50 ml DMF
pro Liter Puffer

ELISA-Waschpuffer (PT)

0,5 ml/l Tween20
In PBS

ELISA-Blockpuffer mit Tween (PMT)

0,5 ml/l Tween20
In ELISA-Blockpuffer

SOC-Medium

20 g/l Trypton
5 g/l Hefeextrakt
4 g/l Glucose
10 mM NaCl
2,5 mM KCl
5 mM MgCl₂
In Aq.dest.

Luria-Bertani-Medium (LB-Amp)

10 g/l Trypton

5 g/l Hefeextrakt

1 g/l NaCl

In Aq.dest.

Mit NaOH ad pH 7,5

Frisch anzusetzen :

Ad 100 mg/l Ampicillin (Roth)

2YT-Medium

16 g/l Trypton

10 g/l Hefeextrakt

5 g/l NaCl

In Aq.dest.

Mit NaOH ad pH 7

Agarplatten

50 g/l Agar

In LB oder 2YT Medium

Antibiotikum kurz vor dem Gießen

hinzugeben

FACS-PBS

20 ml/l Fetal Bovine Serum

1 g/l NaN₃

In PBS

10 x FACS-Blockierungslösung

1 mg/ml anti-CD16/CD32

0,5 mg/ml Ratten IgG

Erythrozyten-Lysepuffer

8,6 g/l NH₄Cl

150 mM NaCl

20 mM Tris

mit HCl ad pH 7,2

IF-Fixierungslösung

40 g/l Paraformaldehyd

In PBS aufgekocht, dann filtriert

10 g/l Tween20 (frisch zugesetzt)

IF-Blockierungslösung

20 ml/l Fetal Bovine Serum

In PBS

Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Medium
Top10	<i>E.coli</i> , gram-negativ, fakultativ anaerob	LB oder 2YT
HEK293T	Humane Nierenzelllinie	DMEM komplett
COS7	Cercopithecus aethiops (AGM) Fibroblastenlinie	DMEM komplett
NIH3T3	Murine Fibroblastenlinie	RPMI1640
Milzzellen	C57Bl/6 und Balb/c Maus (in Suspension gehalten)	RPMI1640

Verwendete Antikörper

Spezifität	Verwendung	Klon & Herkunft	Lieferant & Charge	Artikelnr.
Anti-HA	WB	Maus IgG	SantaCruz	
Anti-M1	WB	Maus IgG	SantaCruz	
Anti-M2	WB	14C2 Maus IgG1	SantaCruz Sc32238	
Anti-NP	WB	5D8 Maus IgG2a	SantaCruz Sc80481	
anti-V5	WB	MCA1360 Maus IgG	Serotec MCA1360	0702
anti-V5- HRP-Konjugat	WB	Maus IgG2a	Invitrogen 46-0708	1229769
Anti-V5 HRP-Konjugat	WB	V5-10 Maus IgG	SigmaAldrich V2260	
Anti-V5 Cy3-Konjugat	IF	V5-10 Maus IgG	SigmaAldrich V4014	
Anti-TLR4/MD2 PE-Konjugat	FACS	MTS510 Ratte IgG2a	eBioscience MTS510	

„Score Sheet“ der täglichen Inspektion nach einer Infektion

Für das Score Sheet wurden folgende Einteilung verwendet :

0 = Habitus, Bewegungsdrang, Atmung unauffällig,

1 = struppiges Fell, verminderte Bewegung,

2 = vorübergehende Apathie

3 = Husten

4 = Husten und Zittern

5 = Hinterbein-Paralysen oder 20 % Gewichtsverlust

6 = tot

Abbruchkriterium ist das Erreichen der Stufe 5

Weitere Kriterien unter :

http://www.charite.de/tierschutz/download/Abbruchkriterien-Berliner-TSchB_2Auflage2009.pdf

Verwendete Primer

H5wtF GTACGTACGTAAGCTTAGATCTCCCGCCGCCACCatggagaaaatagtgcttctttttgc
H5wtR GGGTCGTTACAATGCAGAATTTGCATTATGGATGACCTAGGATCCGTACGTACGT
M1wtF GTACGTACGTAAGCTTAGATCTCCCGCCGCCACCatgagtccttctaaccgaggtcgaaaacg
M1wtR ACGTACGTACGGATCCTAGGTCATCCATctccaattctatggttgacaaaatgaccatc
M2wtFusionF Atgagtccttctaaccgaggtcgaaaacgcctaccagaaaacgaatgggagtgca
M2wtFusionR Tgcactccccattcgtttctggttaggcggttcgacctcggttagaagactcat
M2wtF GTACGTACGTAAGCTTAGATCTCCCGCCGCCACCatgagtccttctaaccgaggtcgaaaacg
M2wtR ACGTACGTACGGATCCTAGGTCATCCATctccaattctatggttgacaaaatgaccatc
NPwtF GTACGTACGTAAGCTTAGATCTCCCGCCGCCACCatggcgtctcaaggcaccaaaacga
NPwtR ACGTACGTACGGATCCTAGGTCATCCATTTCTTCCGCGTTATCGCCAAAAAA
pTHF CTTTCCATGGGTCTTTTCTG
pTHR CCAGTGTGATGGATATCTG
V5mutStopF ATGGATGACCTATGATCCATTCCAAACCC
V5mutStopR GGGTTTGGAATGGATCATAGGTCATCCAT
M13F GTAAAACGACGGCCAGTG
M13R GGAAACAGCTATGACCATG

coM2, +Strang 5'->3'

M2coTop1 AAGCTTAGATCTCCCGCCGCCACCatgAGCCTGCTGACCGAGGTGGAGAC
M2coTop2 CCCACCCGCAACGAGTGGGAGTGCCGCTGCAGCGACAGCAGCGACCCCA
M2coTop3 TTGTGGTGGCCGCCAACATTATTGGCATTCTGCACCTGATTCTGTGGATT
M2coTop4 CTGGACCGCTGTTCTTCAAGTGCATTTACCGCCGCCTGAAGTACGGCCT
M2coTop5 GAAGCGGGCCCCGCCACCGCCGGCGTGCCCGAGAGCatgCGCGAGGAGT
M2coTop6 ACCGCCAGGAGCAGCAGAGCGCCGTGGACGTGGACGACGGCCACTTCGTG
M2coTop7 AACATTGAGCTGGAGGATGACCTAGGATCCGTACGT (weggelassen)

coM2, -Strang 5'->3'

M2coBot6 ACGTACGGATCCTAGGTCATCCTCCAGCTCAATGTTACGAAGTGGCCGTCGTCCACGTCC
M2coBot5 ACGGCGCTCTGCTGCTCCTGGCGGTACTCCTCGCGcatGCTCTCGGGCAC
M2coBot4 GCCGGCGGTGGCGGGGCGCGCTTCAGGCCGACTTCAGGCGGGGTA
M2coBot3 TGCACCTGAAGAACAGGCGGTCCAGAATCCACAGAATCAGGTGCAGAATG
M2coBot2 CCAATAATGTTGGCGGCCACCACAATGGGGTTCGCTGCTGCTGCTGCAGCG
M2coBot1 GCACTCCCCTCGTTGCGGGTGGGGTCTCCACCTCGGTGAGCAGGCTca
M2coBot0 tGGTGGCGGGGAGATCTAAGCTT (weggelassen)

NPco, +Strang 5'->3'

NPcoTop1 GTACGTACGTAAGCTTAGATCTCCCGCCGCCACCatgGCCAGCCAGGGCA
NPcoTop2 CCAAGCGCAGCTACGAGCAGatgGAGACCGGCGGAGCGCCAGAACGCC
NPcoTop3 ACCGAGATTGCGCCAGCGTGGGCGCatgGTGAGCGGATTGGCCGCTT
NPcoTop4 CTACATTGAGatgTGACCGAGCTGAAGCTGAGCGACTACGAGGGCCGCC
NPcoTop5 TGATTGAGAACAGCATTACCATTGAGCGCatgGTGCTGAGCGCCTTCGAC
NPcoTop6 GAGCGCCGCAACCGCTACCTGGAGGAGCACCCAGCGCCGGCAAGGACCC
NPcoTop7 CAAGAAGACCGGCGGGCCCATTTACCGCCGCCGACGGCAAGTGGGTGC
NPcoTop8 GCGAGCTGATTCTGTACGACAAGGAGGAGATTGCGCCGATTTGGCGCCAG
NPcoTop9 GCCAACAACGCGGAGGACGCCACCGCCGGCCTGACCCACCTGatgATTTG
NPcoTop10 GCACAGCAACCTGAACGACGCCACCTACCAGCGCACCCGCGCCCTGGTGC
NPcoTop11 GCACCGGCatgGACCCCGCatgTGACGCTGatgCAGGGCAGCACCTG
NPcoTop12 CCCC GCCGAGCGGCGCCGCCGCGCGCCGCGTGAAGGGCGTGGGCACCat
NPcoTop13 GGTGatgGAGCTGATTGCGatgATTAAGCGGGCATTAAACGACCGCAACT
NPcoTop14 TCTGGCGGGCGAGAACGGCCCGCCGACCCGATTCCTACGAGCGCatg
NPcoTop15 TGCAACATTCTGAAGGGCAAGTTCCAGACCGCCGCCAGCGCGCCatgat
NPcoTop16 GGACCAGGTGCGCGAGAGCCGCAACCCCGCAACGCCGAGATTGAGGACC

NPcoTop17 TGATTTTCTGGCCCGCAGCGCCCTGATTCTGCGCGGCAGCGTGGCCAC
 NPcoTop18 AAGAGCTGCCTGCCCCGCTGCGTGTACGGCCTGGCCGTGGCCAGCGGCTA
 NPcoTop19 CGACTTCGAGCGCGAGGGCTACAGCCTGGTGGGCATTGACCCCTTCGCC
 NPcoTop20 TGCTGCAGAACAGCCAGGTGTTACGCCTGATTGCCCCAACGAGAACCCC
 NPcoTop21 GCCACAAGAGCCAGCTGGTGTGGatgGCCTGCCACAGCGCCGCTTCGA
 NPcoTop22 GGACCTGCGCGTGAGCAGCTTCATTGCGGGCACCCGCGTGGTGGCCGCG
 NPcoTop23 GCCAGCTGAGCACCCGCGGCGTGCAGATTGCCAGCAACGAGAACatgGAG
 NPcoTop24 GCCatgGACAGCAACACCCTGGAGCTGCGCAGCCGCTACTGGGCCATTTCG
 NPcoTop25 CACCCGCGAGCGGCGCAACACCAACCAGCAGCGCGCCAGCGCCGGCCAGA
 NPcoTop26 TTAGCGTGAGCCACCTTCAGCGTGACGCAACCTGCCCTTCGAGCGC
 NPcoTop27 GCCACCATTatgGCCGCTTCACCGGCAACACCGAGGGCCGACCAGCGA
 NPcoTop28 CatgCGCACCGAGATTATTCGatgatgGAGAGCGCCCGCCCGAGGACG
 NPcoTop29 TGAGCTTCAGGGCCGCGGCGTGTTCGAGCTGAGCGACGAGAAGGCCACC
 NPcoTop30 AACCCCATTTGTGCCAGCTTCGACatgAACAACGAGGGCAGCTACTTCTT
 NPcoTop31 CGGCGACAACGCCGAGGAGtacgacaacATGGATGACCTAGGATCCGTACGTACGT

NPco. -Strang 5'->3'

NPcoBot1 GTACGTACGTAAGCTTAGATCTCCC
 NPcoBot2 GCCGCCACCatgGCCAGCCAGGGCACCAAGCGCAGCTACGAGCAGatgGA
 NPcoBot3 GACCGGCGGCGAGCGCCAGAACGCCACCGAGATTCGCGCCAGCGTGGGCC
 NPcoBot4 GCatgGTGAGCGGCATTGGCCGCTTCTACATTCAGatgTGCACCGAGCTG
 NPcoBot5 AAGCTGAGCGACTACGAGGGCCGCTGATTCAGAACAGCATTACCATTGA
 NPcoBot6 GCGCatgGTGCTGAGCGCCTTCGACGAGCGCCGAACCGCTACCTGGAGG
 NPcoBot7 AGCACCCAGCGCCGGCAAGGACCCCAAGAAGACCGGCGGCCCATTTAC
 NPcoBot8 CGCCGCCGCGACGGCAAGTGGGTGCGCGAGCTGATTCTGTACGACAAGGA
 NPcoBot9 GGAGATTGCGCGCATTTGGCGCCAGGCCAACACGGCGAGGACGCCACCG
 NPcoBot10 CCGGCCTGACCCACCTGatgATTTGGCACAGCAACCTGAACGACGCCACC
 NPcoBot11 TACCAGCGCACCCGCGCCCTGGTGCACACCGGCatgGACCCCGCatgTG
 NPcoBot12 CAGCCTGatgCAGGGCAGCACCTGCCCCGCCGAGCGGCGCCGGCCGCG
 NPcoBot13 CCGCCGTGAAGGGCGTGGGCACCatgGTGatgGAGCTGATTTCGatgATT
 NPcoBot14 AAGCGCGGCATTAACGACCGCAACTTCTGGCGGCGGAGAACGGCCCGC
 NPcoBot15 CACCCGATTGCCTACGAGCGCatgTGCAACATTCTGAAGGGCAAGTTC
 NPcoBot16 AGACCGCCGCCAGCGCGCCatgatgGACCAGGTGCGCGAGAGCCGCAAC
 NPcoBot17 CCCGGCAACGCCGAGATTGAGGACCTGATTTTCTGGCCCCGAGCGCCCT
 NPcoBot18 GATTCTGCGCGGCAGCGTGGCCACAAGAGCTGCCTGCCCCGCTGCGTGT
 NPcoBot19 ACGGCCTGGCCGTGGCCAGCGGCTACGACTTCGAGCGCGAGGGCTACAGC
 NPcoBot20 CTGGTGGGCATTGACCCCTTCCGCTGCTGCAGAACAGCCAGGTGTTTCAG
 NPcoBot21 CCTGATTGCCCCAACGAGAACCCCGCCACAAGAGCCAGCTGGTGTGGa
 NPcoBot22 TgGCCTGCCACAGCGCCGCTTCGAGGACCTGCGCGTGAGCAGCTTCATT
 NPcoBot23 CGCGGCACCCGCGTGGTGCCTCCGCGGCGCCAGCTGAGCACCCGCGGCGTGA
 NPcoBot24 GATTGCCAGCAACGAGAACatgGAGGCCatgGACAGCAACACCCTGGAGC
 NPcoBot25 TGCGCAGCCGCTACTGGGCCATTTCGACCCGAGCGGCGGCAACACCAAC
 NPcoBot26 CAGCAGCGCGCCAGCGCCGCGCAGATTAGCGTGCAGCCACCTTCAGCGT
 NPcoBot27 GCAGCGCAACCTGCCCTTCGAGCGCGCCACCATtatgGCCGCTTCACCG
 NPcoBot28 GCAACACCGAGGGCCGCAACCAGCGACatgCGCACCGAGATTATTCGatg
 NPcoBot29 AtgGAGAGCGCCCGCCCGAGGACGTGAGCTTCCAGGGCCGCGGCGTGT
 NPcoBot30 CGAGCTGAGCGACGAGAAGGCCACCAACCCCATTTGTGCCAGCTTCGACa
 NPcoBot31 TgAACAACGAGGGCAGCTACTTCTTCGGCGACAACGCCGAGGAGtacgac

IL21co, +Strang 5'->3'

IL21coTop1 ACACGaagccttAGATCTCCCGCCGCCACCatgGAGCGCACCCCTGGTGTGC
IL21coTop2 CTGGTGGTGATTTTCTGGGCACCGTGGCCCACAAGAGCAGCCCCAGGG
IL21coTop3 CCCCCACCGCCTGCTGATTTCGCCTGCGCCACCTGATTGACATTGTGGAGC
IL21coTop4 AGCTGAAGATTTACGAGAACGACCTGGACCCCGAGCTGCTGAGCGCCCC
IL21coTop5 CAGGACGTGAAGGGCCACTGCGAGCACGCCGCTTCGCCTGCTTCCAGAA
IL21coTop6 GGCCAAGCTGAAGCCCAGCAACCCCGCAACAACAAGACCTTCATTATTG
IL21coTop7 ACCTGGTGGCCCAGCTGCGCCGCGCCTGCCCGCCCGCGGGCAAG
IL21coTop8 AAGCAGAAGCACATTGCCAAGTGCCCCAGCTGCGACAGCTACGAGAAGCG
IL21coTop9 CACCCCCAAGGAGTTCCTGGAGCGCCTGAAGTGGCTGCTGCAGAAgAtgA
IL21coTop10 TTCACCAGCACCTGAGCATGGATGACCTAGGATCCGTACGTACGT

IL21co, -Strang 5'->3'

IL21coBot1 CACCatgGAGCGCACCCCTGGTGTGCCTGGTGGTGATTTTCTGGGCACCG
IL21coBot2 TGGCCCACAAGAGCAGCCCCAGGGCCCCGACCGCCTGCTGATTTCGCCTG
IL21coBot3 CGCCACCTGATTGACATTGTGGAGCAGCTGAAGATTTACGAGAACGACCT
IL21coBot4 GGACCCCGAGCTGCTGAGCGCCCCCAGGACGTGAAGGGCCACTGCGAGC
IL21coBot5 ACGCCGCTTCGCCTGCTTCCAGAAGGCCAAGCTGAAGCCCAGCAACCC
IL21coBot6 GGCAACAACAAGACCTTCATTATTGACCTGGTGGCCCAGCTGCGCCGCG
IL21coBot7 CCTGCCCGCCCGCGCGGCAAGAAGCAGAAGCACATTGCCAAGTGCC
IL21coBot8 CCAGCTGCGACAGCTACGAGAAGCGCACCCCCAAGGAGTTCCTGGAGCGC
IL21coBot9 CTGAAGTGGCTGCTGCAGAAgAtgATTACCAGCACCTGAGCATGGATGA
IL21coBot10 CCTAGGATCCGTACGTACGT

Verwendete Peptide

Name des Proteins, Haplotyp b oder d, Nummerierung Elispot-Bezeichnung	Peptidsequenz
NP b2 = P2	ARSALILRGSVAHKSCLPACVYGP
NP b1 = P1	SVQRNLPFDRTTVMAAFTGNTEG
HA d14	NAYVSVVTSNYNRRF
HA d13	HNTNGVTAACSHE
HA d12	EIAERPQVRDQAG
HA d5	VTGLRNIPSIQSR
H5 d5	ATGLRNVPQIESR
M2 d1 = P1 i	YRKEQQSAVDADD
NP b3 = P3	NSQVYSLIRPNE
HA d1	ASMHECNTKCQT
HA d12	KLKNSYVNKKGK
HA d11	VLWGIHPPNSK
HA d3	CPKYVRSACLRLM
M1 d1 = P1 i	KAVKLYRKLKRE
HA d2	SSFERFEIFPK
HA d7	TYVSVGSTSTL
HA b2 = P2	SQLKNNAKEI
HA d4	KYVKQNTLKL
HA b1 = P1	TGLRNIPSI
HA d6	LYQNVGTYY
HA d8	LYEKVKSQI
H5 d10 = P1 i	IYSTVASSL
HA d9	VYQILAIYA
HA d10	IYATVAGSL
HA b3 = P3	SSLPFQNI
HA b4 = P4	MNIQFTAV
M1 b1 = P1 i	MGLIYNRM
NP b6 = P6	IGRFYIQM
NP b7	NSQVFSILIRPNE
H5 b6	LQLRDNAKEL
H5 b5	TGLRNSPQR
NP b4 = P4 i	ASNENMEAM
NP b5 = P5	RLIQNSITI
NP d1 = P1 i	AYERMCNIL
NP d2	FYIQMCTEL
NP d3	TYQRTRALV
H5 b7	SSMPFHNI
H5 b8	MNTQFEAV
Pap E7	RAHYNIVTF
OVA	SIINFEKL

(i) markiert das immunodominante Peptid des jeweiligen Antigens (HA, M1, M2 und NP) und des MHC-I-Haplotyps der Mausstämme (C57Bl/6 = H2b, Balb/c = H2d)

Tabelle der H5-Peptide

Name	Peptidsequenz	Name	Peptidsequenz
H5-1	MEKIVLLFAIVSLVK	H5-57	MKSELEYGNCNTKCQ
H5-2	LLFAIVSLVKSDQIC	H5-58	EYGNCNTKCQTPMGA
H5-3	VSLVKSDQICIGYHA	H5-59	NTKCQTPMGAINSSM
H5-4	SDQICIGYHANNSTE	H5-60	TPMGAINSSMPFHNI
H5-5	IGYHANNSTEQVDTI	H5-61	INSSMPFHNIHPLTI
H5-6	NNSTEQVDTIMEKNV	H5-62	PFHNIHPLTIGECKP
H5-7	QVDTIMEKNVTVIHA	H5-63	HPLTIGECKPKYVKS
H5-8	MEKNVTVIHAQDILE	H5-64	GECKPKYVKSRLVLA
H5-9	TVIHAQDILEKKHNG	H5-65	YVKSRLVGLATGLRN
H5-10	QDILEKKHNGKLCDL	H5-66	RLVGLATGLRNSPQRE
H5-11	KKHNGKCLDLGDKVP	H5-67	TGLRNSPQRERRRKK
H5-12	KCLDLGDKVPLILRD	H5-68	SPQRERRRKRGLFG
H5-13	DGDKVPLILRDCSVAG	H5-69	RRRKRGLFGAIAGF
H5-14	LILRDCSVAGWLLGN	H5-70	RGLFGAIAGFIEGGW
H5-15	CSVAGWLLGNPMCDE	H5-71	AIAGFIEGGWQGMVD
H5-16	WLLGNPMCDEFINVP	H5-72	IEGGWQGMVDGWYGY
H5-17	PMCDEFINVPEWSYI	H5-73	QGMVDGWYGYHHSNE
H5-18	FINVPEWSYIVEKAN	H5-74	GWYGYHHSNEQGSY
H5-19	EWSYIVEKANPVNDL	H5-75	HHSNEQGSYAADKE
H5-20	VEKANPVNDLCYPGD	H5-76	QGSYAADKESTQKA
H5-21	PVNDLCYPGDFNDYE	H5-77	AADKESTQKAIDGVT
H5-22	CYPGDFNDYEELKHL	H5-78	STQKAIDGVTNKVNS
H5-23	FNDYEELKHLLSRIN	H5-79	IDGVTNKVNSIIDKM
H5-24	ELKHLLSRINHFEKI	H5-80	NKVNSIIDKMNTQFE
H5-25	LSRINHFEKIQIIPK	H5-81	IIDKMNTQFEAVGRE
H5-26	HFEKIQIIPKSSWSS	H5-82	NTQFEAVGREFNNLE
H5-27	QIIPKSSWSSHEASL	H5-83	AVGREFNNLERRIEN
H5-28	SSWSSHEASLGVSSA	H5-84	FNNLERRIENLNKKM
H5-29	HEASLGVSSACPYQG	H5-85	RRIENLNKKMEDGFL
H5-30	GVSSACPYQGKSSFF	H5-86	LNKKMEDGFLDVWTY
H5-31	CPYQGKSSFFRNVVW	H5-87	EDGFLDVWTYNAELL
H5-32	KSSFFRNVVWLIKKN	H5-88	DVWTYNAELLVLMEN
H5-33	RNVVWLIKKNSTYPT	H5-89	NAELLVLMENERTLD
H5-34	LIKKNSTYPTIKRSY	H5-90	VLMENERTLDFHDSN
H5-35	STYPTIKRSYNNTNQ	H5-91	ERTLDFHDSNVKNLY
H5-36	IKRSYNNTNQEDLSV	H5-92	FHDSNVKNLYDKVRL
H5-37	NNTNQEDLSVLWGIH	H5-93	VKNLYDKVRLQLRDN
H5-38	EDLSVLWGIHHPNDA	H5-94	DKVRLQLRDNKELG
H5-39	LWGIHHPNDAAEQTK	H5-95	QLRDNKELGNGCFE
H5-40	HPNDAAEQTKLYQNL	H5-96	AKELGNGCFEFYHKC
H5-41	AEQTKLYQNLTTYIS	H5-97	NGCFEFYHKCDNECM
H5-42	LYQNLTTYISVGTST	H5-98	FYHKCDNECMESVRN
H5-43	TTYISVGTSTLNQRL	H5-99	DNECMESVRNGTYDY
H5-44	VGTSTLNQRLVPRIA	H5-100	ESVRNGTYDYPQYSE
H5-45	LNQRLVPRIATRSKV	H5-101	GTYDYPQYSEEARLK
H5-46	VPRIATRSKVNGQSG	H5-102	PQYSEEARLKREEIS
H5-47	TRSKVNGQSGRMEFF	H5-103	EARLKREEISGVKLE
H5-48	NGQSGRMEFFWTILK	H5-104	REEISGVKLESIGIY
H5-49	RMEFFWTILKPNDAI	H5-105	GVKLESIGIYQILSI
H5-50	WTILKPNDAINFESN	H5-106	SIGIYQILSIYSTVA
H5-51	PNDAINFESNGNFIA	H5-107	QILSIYSTVASSLAL
H5-52	NFESNGNFIAPEYAY	H5-108	YSTVASSLALAIMVA
H5-53	GNFIAPEYAYKIVKR	H5-109	SSLALAIMVAGLSLW
H5-54	PEYAYKIVKRGDSTI	H5-110	AIMVAGLSLWMCNSG

H5-55	KIVKRGDSTIMKSEL	H5-111	GLSLWMCSNGSLQCR
H5-56	GDSTIMKSELEYGNC	H5-112	LWMCSNGSLQCRICI

Rot markierte Peptide konnten in 3 Anläufen nicht synthetisiert werden, sie werden aber der Vollständigkeit halber hier aufgeführt.

Tabelle der M1-Peptide

Name	Peptidsequenz	Name	Peptidsequenz
M1-1	MSLLTEVETYVLSII	M1-26	SCMGLIYNRMGTVTT
M1-2	EVETYVLSIIPSGPL	M1-27	IYNRMGTVTTEVAFG
M1-3	VLSIIPSGPLKAEIA	M1-28	GVTTTEVAFGLVCAT
M1-4	PSGPLKAEIAQKLED	M1-29	EVAFGLVCATCEQIA
M1-5	KAEIAQKLEDVFAGK	M1-30	LVCATCEQIADSQHR
M1-6	QKLEDVFAGKNTDLE	M1-31	CEQIADSQHRSHRQM
M1-7	VFAGKNTDLEALMEW	M1-32	DSQHRSHRQMATITN
M1-8	NTDLEALMEWLKTRP	M1-33	SHRQMATITNPLIRH
M1-9	ALMEWLKTRPILSPL	M1-34	ATITNPLIRHENRMV
M1-10	LKTRPILSPLTKGIL	M1-35	PLIRHENRMVLAAT
M1-11	ILSPLTKGILGFVFT	M1-36	ENRMVLAATKAME
M1-12	TKGILGFVFTLTVPS	M1-37	LAATKAMEQMAGS
M1-13	GFVFTLTVPSERGLQ	M1-38	AKAMEQMAGSSEQAA
M1-14	LTVPSERGLQRRRFV	M1-39	QMAGSSEQAAEAMEI
M1-15	ERGLQRRRFVQNALN	M1-40	SEQAAEAMEIANQAR
M1-16	RRRFVQNALNGNGDP	M1-41	EAMEIANQARQMVQA
M1-17	QNALNGNGDPNNMDR	M1-42	ANQARQMVQAMRTIG
M1-18	GNGDPNNMDRAVKLY	M1-43	QMVQAMRTIGTHPNS
M1-19	NNMDRAVKLYKCLKR	M1-44	MRTIGTHPNSSAGLR
M1-20	AVKLYKCLKREITFH	M1-45	THPNSSAGLRDNLLE
M1-21	KCLKREITFHGAKEV	M1-46	SAGLRDNLLENLQAY
M1-22	EITFHGAKEVALSYS	M1-47	DNLLENLQAYQKRMG
M1-23	GAKEVALSYSTGALA	M1-48	NLQAYQKRMGVQMQR
M1-24	ALSYSTGALASCMGL	M1-49	QAYQKRMGVQMQRFK
M1-25	TGALASCMGLIYNRM		

Tabelle der M2-Peptide

Name	Peptidsequenz	Name	Peptidsequenz
M2-1	MSLLTEVETPTRNEW	M2-11	FKCIYRRLKYGLKR
M2-2	EVETPTRNEWECR	M2-12	YRRLKYGLKRGDATA
M2-3	TPTRNEWECRCSDDS	M2-13	YGLKRGDATAAGV
M2-4	EWECRCSDDSDPIVV	M2-14	LKRGDATAAGVPESMR
M2-5	CSDSDPIVVAANII	M2-15	ATAGVPESMREEYR
M2-6	DPIVVAANIIGILHL	M2-16	VPESMREEYRQEQQSA
M2-7	AANIIGILHLILWIL	M2-17	EEYRQEQQSAVDV
M2-8	GILHLILWILDRLFF	M2-18	RQEQQSAVDVDDGHF
M2-9	ILWILDRLFFKCIYR	M2-19	SAVDVDDGHFVNIELE
M2-10	DRLFFKCIYRRLKY		

Tabelle der NP-Peptide

Name	Peptidsequenz	Name	Peptidsequenz
NP-01	MASQGTKRSYEQMET	NP-50	RNPGNAEIEDLIFLA
NP-02	TKRSYEQMETGGERQ	NP-51	AEIEDLIFLARSALI
NP-03	EQMETGGERQNATEI	NP-52	LIFLARSALILRGSV
NP-04	GGERQNATEIRASVG	NP-53	RSALILRGSVAHKSC
NP-05	NATEIRASVGRMVSG	NP-54	LRGSVAHKSCLPACV
NP-06	RASVGRMVSGIGRFY	NP-55	AHKSCLPACVYGLAV
NP-07	RMVSGIGRFYIQMCT	NP-56	LPACVYGLAVASGYD
NP-08	IGRFYIQMCTELKLS	NP-57	YGLAVASGYDFEREG
NP-09	IQMCTELKLSDYEGR	NP-58	ASGYDFEREGYSLVG
NP-10	ELKLSDYEGRLIQNS	NP-59	FEREGYSLVGIDPFR
NP-11	DYEGRLIQNSITIER	NP-60	YSLVGIDPFRLLQNS
NP-12	LIQNSITIERMVLSA	NP-61	IDPFRLLQNSQVFSL
NP-13	ITIERMVLSAFDERR	NP-62	LLQNSQVFSLIRPNE
NP-14	MVLSAFDERRNRYLE	NP-63	QVFSLIRPNENPAHK
NP-15	FDERRNRYLEEHPSA	NP-64	IRPNENPAHKSQLVW
NP-16	NRYLEEHPSAGKDPK	NP-65	NPAHKSQLVWMACHS
NP-17	EHPSAGKDPKKTGGP	NP-66	SQLVWMACHSAAFED
NP-18	GKDPKKTGGPIYRRR	NP-67	MACHSAAFEDLRVSS
NP-19	KTGGPIYRRRDGKWV	NP-68	AAFEDLRVSSFIRGT
NP-20	IYRRRDGKWVRELIL	NP-69	LRVSSFIRGTRVVPR
NP-21	DGKWVRELILYDKEE	NP-70	FIRGTRVVPRGQLST
NP-22	RELILYDKEEIRRIW	NP-71	RVVPRGQLSTRGVQI
NP-23	YDKEEIRRIWRQANN	NP-72	GQLSTRGVQIASNEN
NP-24	IRRIWRQANNGEDAT	NP-73	RGVQIASNENMEAMD
NP-25	RQANNGEDATAGLTH	NP-74	ASNENMEAMDSNTLE
NP-26	GEDATAGLTHLMIWH	NP-75	MEAMDSNTLELRSRY
NP-27	AGLTHLMIWHSNLND	NP-76	SNTLELRSRYWAIRT
NP-28	LMIWHSNLNDATYQR	NP-77	LRSRYWAIRTRSGGN
NP-29	SNLNDATYQRTRALV	NP-78	WAIRTRSGGNTNQQR
NP-30	ATYQRTRALVRTGMD	NP-79	RSGGNTNQQRASAGQ
NP-31	TRALVRTGMDPRMCS	NP-80	TNQQRASAGQISVQP
NP-32	RTGMDPRMCSLMQGS	NP-81	ASAGQISVQPTFSVQ
NP-33	PRMCSLMQGSTLPRR	NP-82	ISVQPTFSVQRNLPF
NP-34	LMQGSTLPRRSGAAG	NP-83	TFSVQRNLPFERATI
NP-35	TLPRRSGAAGAAVKG	NP-84	RNLPFERATIMAAFT
NP-36	SGAAGAAVKGVGTMV	NP-85	ERATIMAAFTGNTEG
NP-37	AAVKGVGTMVMELIR	NP-86	MAAFTGNTEGRTSDM
NP-38	VGTMVMELIRMIKRG	NP-87	GNTEGRTSDMRTEII
NP-39	MELIRMIKRGINDRN	NP-88	RTSDMRTEIIRMMES
NP-40	MIKRGINDRNFWRGE	NP-89	RTEIIRMMESARPED
NP-41	INDRNFWRGENGRRT	NP-90	RMMESARPEDVSFQG
NP-42	FWRGENGRRTRIAYE	NP-91	ARPEDVSFQGRGVFE
NP-43	NGRRTRIAYERMCNI	NP-92	VSFQGRGVFELSDEK
NP-44	RIAYERMCNILKGKF	NP-93	RGVFELSDEKATNPI
NP-45	RMCNILKGKFQATAAQ	NP-94	LSDEKATNPVPSFD
NP-46	LKGKFQATAAQRAMMD	NP-95	ATNPVPSFDMNNEG
NP-47	QATAAQRAMMDQVRES	NP-96	VPSFDMNNEGSYFFG
NP-48	RAMMDQVRESRNPNGN	NP-97	MNNEGSYFFGDNAEE
NP-49	QVRESRNPNGNAEIED	NP-98	SYFFGDNAEEYDN

H5-Peptidpools

112 Peptide wurden in 22 Pools aufgeteilt, wovon jedes Peptid in zwei Pools vertreten ist.

Pool-Name		L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V
		1,12, 23,34, 45,56, 67,78, 89,	2,13, 24,35, 46,57, 68,79, 90,	3,14, 25,36, 47,58, 69,80, 91,	4,15, 26,37, 48,59, 70,81, 92,	5,16, 27,38, 49,60, 71,82, 93,	6,17, 28,39, 50,61, 72,83, 94,	7,18, 29,40, 51,62, 73,84, 95,	8,19, 30,41, 52,63, 74,85, 96,	9,20, 31,42, 53,64, 75,86, 97,	10,21, 32,43, 54,65, 76,87, 98,	11,22, 33,44, 55,66, 77,88, 99,
	H5 Peptide	100, 111	101, 112	102	103	104	105	106	107	108	109	110
A	1-11	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B	12-22	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
C	23-33	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
D	34-44	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
E	45-55	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
F	56-66	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
G	67-77	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77
H	78-88	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
I	89-99	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99
J	100-110	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
K	111-112	111	112									

M2-Peptidpools

19 Peptide wurden in 9 Pools aufgeteilt, wovon jedes Peptid in zwei Pools vertreten ist.

Poolname		E	F	G	H	I
	M2 Peptide	1,6,11,16	2,7,12,17	3,8,13,18	4,9,14,19	5,10,15
A	1-5	1	2	3	4	5
B	6-10	6	7	8	9	10
C	11-15	11	12	13	14	15
D	16-19	16	17	18	19	

Quellenverzeichnis

- ¹ World Health Organization, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/index.html>
- ² Robert Koch-Institut, RKI Ratgeber Infektionskrankheiten - Merkblätter für Ärzte: Influenza
- ³ Robert Koch-Institut, AG Influenza, Saisonbericht 2007
- ⁴ Kuiken, T., Taubenberger, J.K., Pathology of human influenza revisited. *Vaccine* 26 Suppl 4:D59-66 (2008)
- ⁵ Girard, M.P., Cherian, T., Pervikov, Y., Kieny, M.P.; A review of vaccine research and development: human acute respiratory infections; *Vaccine* 23(50):5708-24 (2005)
- ⁶ Palese, P., Young, J.F., Variation of influenza A, B, and C viruses; *Science*. 215(4539):1468-74 (1982)
- ⁷ Lipatov, A.S., Govorkova, E.A., Webby, R.J., Ozaki, H., Peiris, M., Guan, Y., Poon, L., Webster, R.G.; Influenza: emergence and control, *J Virol*. 78(17):8951-9 (2004)
- ⁸ Palese, P., Influenza: old and new threats. *Nat Med*. 10(12 Suppl):S82-7 (2004)
- ⁹ Fields, B.N., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Straus, S.E., Knipe, D.M.; *Fields - Virology (Two Volumes) 4th Edition (August 2001)*;
- ¹⁰ Caesar, G.J., *Comentarii de Bello Gallico, erster Satz: [...] est omnis divisa in partes tres, quarum unam [...], 51 v. Chr., Neuauflage Reclam Verlag, Stuttgart (2004)*
- ¹¹ Robert Koch-Institut, *Epidemiologisches Bulletin* 7/1999. Aktualisierte Fassung vom Februar 2008
- ¹² Lamb R.A, Choppin P.W., The gene structure and replication of influenza virus; *Annu Rev Biochem*. 52:467-506 (1983)
- ¹³ CDC / Palmer, Erskine, L., Martin, M.L., Murphy, F.; (1981) auf <http://phil.cdc.gov>
- ¹⁴ Lamb R.A., Zebedee, S.L., Richardson, C.D., Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface. *Cell* 40(3):627-33 (1985)
- ¹⁵ Zebedee, S.L., Richardson, C.D., Lamb, R.A., Characterization of the influenza virus M2 integral membrane protein and expression at the infected-cell surface from cloned cDNA. *J Virol*. 56(2):502-11 (1985)
- ¹⁶ Martin, K., Helenius, A., Transport of incoming Influenza Virus Nucleocapsids into the Nucleus, *J. Virol*. 56(1)232 (1991)
- ¹⁷ Hilleman, M.R., Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control, *Vaccine* 20(25-26):3068-87 (2002)
- ¹⁸ Coloma, R., Valpuesta, J.M., Arranz, R., Carrascosa, J.L., Ortín, J., Martín-Benito, J., The structure of a biologically active influenza virus ribonucleoprotein complex. *PLoS Pathog*. Jun;5(6):e1000491 (2009)
- ¹⁹ Haye, K., Bourmakina, S., Moran, T., García-Sastre, A., Fernandez-Sesma, A., The NS1 protein of a human influenza virus inhibits type I interferon production and the induction of antiviral responses in primary human dendritic and respiratory epithelial cells. *J Virol*. Apr 29 (2009)

-
- ²⁰ Hale, B.G., Randall, R.E., Ortín, J., Jackson, D., The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J Gen Virol.* 89(Pt 10):2359-76 (2008)
- ²¹ Wolff, T., Zielecki, F., Abt, M., Voss, D., Semmler, I., Matthaei, M., Sabotage of antiviral signaling and effectors by influenza viruses. *Biol Chem.* 389(10):1299-305 (2008)
- ²² Robb, N.C., Smith, M., Vreede, F.T., Fodor, E., NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome. *J Gen Virol.* 90(Pt6):1398-407 (2009)
- ²³ Mazur, I., Anhlan, D., Mitzner, D., Wixler, L., Schubert, U., Ludwig, S., The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein. *Cell Microbiol.* 10(5):1140-52 (2008)
- ²⁴ Zell, R., Krumbholz, A., Wutzler, P., Influenza A virus PB1-F2 gene. *Emerg Infect Dis.* 12(10):1607-8; author reply 1608-9 (2006)
- ²⁵ O'Brien, J.D., She, Z.S., Suchard, M.A., Dating the time of viral subtype divergence; *BMC Evol Biol.* 8:172 (2008)
- ²⁶ http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2009_05_22/en/index.html
- ²⁷ Basler, C.F., Aguilar, P.V., Progress in identifying virulence determinants of the 1918 H1N1 and the Southeast Asian H5N1 influenza A viruses, *Antiviral Res.* 79(3):166-78 (2008)
- ²⁸ Hulse-Post, D.J., Franks, J., Boyd, K., Salomon, R., Hoffmann, E., Yen, H.L., Webby, R.J., Walker, D., Nguyen, T.D., Webster, R.G., Molecular changes in the polymerase genes (PA and PB1) associated with high pathogenicity of H5N1 influenza virus in mallard ducks. *J Virol.* 81(16):8515-24 (2007)
- ²⁹ Hatta, M., Gao, P., Halfmann, P., Kawaoka, Y., Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* 293:1840–1842 (2001)
- ³⁰ Conenello, G.M., Zamarin, D., Perrone, L.A., Tumpey, T., Palese, P., A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence. *PLoS Pathog.* 3(10):1414-21 (2007)
- ³¹ Zell, R., Krumbholz, A., Eitner, A., Krieg, R., Halbhuber, K.J., Wutzler, P., Prevalence of PB1-F2 of influenza A viruses. *J Gen Virol.* 88(Pt 2):536-46 (2007)
- ³² de Jong, M.D., Simmons, C.P., Thanh, T.T., Hien, V.M., Smith, G.J., Chau, T.N., Hoang, D.M., Chau, N.V., Khanh, T.H., Dong, V.C., Qui, P.T., Cam, B.V., Ha do, Q., Guan, Y., Peiris, J.S., Chinh, N.T., Hien, T.T., Farrar, J., Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med.* 12(10):1203-7 (2006)
- ³³ Sandbulte, M.R., Boon, A.C., Webby, R.J., Riberdy, J.M., Analysis of cytokine secretion from human plasmacytoid dendritic cells infected with H5N1 or low-pathogenicity influenza viruses. *Virology* 381(1):22-8 (2008)
- ³⁴ Beigel, J.H., Farrar, J., Han, A.M., Hayden, F.G., Hyer, R., de Jong, M.D., Lochindarat, S., Nguyen, T.K., Nguyen, T.H., Tran, T.H., Nicoll, A., Touch, S., Yuen, K.Y.; Writing Committee of the World

-
- Health Organization (WHO) Consultation on Human Influenza A/H5. Avian influenza A (H5N1) infection in humans. *N Engl J Med.* 353(13):1374-85 Erratum in: *N Engl J Med.* 354(8):884 (2006)
- ³⁵ Maines, T.R., Chen, L.M., Matsuoka, Y., Chen, H., Rowe, T., Ortin, J., Falcon, A., Nguyen, T.H., Maile, Q., Sedyaningsih, E.R., et al., Lack of transmission of H5N1 avian-human reassortant influenza viruses in a ferret model; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 12121–12126 (2006)
- ³⁶ Yen, H.L., Lipatov, A.S., Ilyushina, N.A., Govorkova, E.A., Franks, J., Yilmaz, N., Douglas, A., Hay, A., Krauss, S., Rehg, J.E., et al., Inefficient transmission of H5N1 influenza viruses in a ferret contact model. *J. Virol.* 81, 6890–6898 (2007)
- ³⁷ Hulse-Post, D.J., Sturm-Ramirez, K.M., Humberd, J., Seiler, P., Govorkova, E.A., Krauss, S., Scholtissek, C., Puthavathana, P., Buranathai, C., Nguyen, T.D., Long, H.T., Naipospos, T.S., Chen, H., Ellis, T.M., Guan, Y., Peiris, J.S., Webster, R.G., Role of domestic ducks in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia. *Proc Natl Acad Sci* 102(30):10682-7 (2005)
- ³⁸ Thiry, E., Zicola, A., Addie, D., Egberink, H., Hartmann, K., Lutz, H., Poulet, H., Horzinek, M.C., Highly pathogenic avian influenza H5N1 virus in cats and other carnivores. *Vet Microbiol.* 122(1-2):25-31 (2007)
- ³⁹ Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Tantilertcharoen, R., Damrongwatanapokin, S., Theamboonlers, A., Payungporn, S., Nanthapornphiphat, K., Ratanamungklanon, S., Tunak, E., Songserm, T., Vivatthanavanich, V., Lekdumrongsak, T., Kerdangsakonwut, S., Tunhikorn, S., Poovorawan, Y. Probable tiger-to-tiger transmission of avian influenza H5N1. *Emerg Infect Dis.* 11(5):699-701. Erratum in: *Emerg Infect Dis.* 11(6):976 (2005)
- ⁴⁰ Taylor, S.S., Haste, N.M., Ghosh, G.. PKR and eIF2alpha: integration of kinase dimerization, activation, and substrate docking. *Cell* 122(6):823-5 (2005)
- ⁴¹ Ehrhardt, C., Seyer, R., Hrinčius, E.R., Eierhoff, T., Wolff, T., Ludwig, S.. Interplay between influenza A virus and the innate immune signaling. *Microbes Infect.* 2010 Jan;12(1):81-87. Epub 2009
- ⁴² Wong, J.P., Christopher, M.E., Viswanathan, S., Karpoff, N., Dai, X., Das, D., Sun, L.Q., Wang, M., Salazar, A.M., Activation of toll-like receptor signaling pathway for protection against influenza virus infection, *Vaccine* 26;27(25-26):3481-3 (2009)
- ⁴³ Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C.P., Näslund, T.I., Liljeström, P., Weber, F., Reis e Sousa, C., RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates, *Science* 314(5801):997-1001 (2006)
- ⁴⁴ Sirén, J., Imaizumi, T., Sarkar, D., Pietilä, T., Noah, D.L., Lin, R., Hiscott, J., Krug, R.M., Fisher, P.B., Julkunen, I., Matikainen, S., Retinoic acid inducible gene-I and mda-5 are involved in influenza A virus-induced expression of antiviral cytokines. *Microbes Infect.* 8(8):2013-20 (2006)

-
- ⁴⁵ Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C.P., Rehwinkel, J., Kato, H., Takeuchi, O., Akira, S., Way, M., Schiavo, G., Reis e Sousa, C., Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection. *J Virol* 83(20):10761-9 (2009)
- ⁴⁶ Le Goffic, R., Pothlichet, J., Vitour, D., Fujita, T., Meurs, E., Chignard, M., Si-Tahar, M., Cutting Edge: Influenza A virus activates TLR3-dependent inflammatory and RIG-I-dependent antiviral responses in human lung epithelial cells. *J Immunol.* 178(6):3368-72 (2007)
- ⁴⁷ Ranjan, P., Bowzard, J.B., Schwerzmann, J.W., Jeisy-Scott, V., Fujita, T., Sambhara, S., Cytoplasmic nucleic acid sensors in antiviral immunity. *Trends Mol Med.* 15(8):359-68 (2009)
- ⁴⁸ Min, J.Y., Krug, R.M., The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(18):7100-5 (2006)
- ⁴⁹ Ichinohe, T., Lee, H.K., Ogura, Y., Flavell, R., Iwasaki, A., Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses. *J Exp Med.* 206(1):79-87 (2009)
- ⁵⁰ Weber, F., Haller, O., Kochs, G. MxA GTPase blocks reporter gene expression of reconstituted Thogoto virus ribonucleoprotein complexes. *J. Virol.* (2000)
- ⁵¹ Couch, R.B., An overview of serum antibody responses to influenza virus antigens. *Dev Biol (Basel).* 115:25-30 (2003)
- ⁵² Jayasekera, J.P., Moseman, E.A., Carroll, M.C., Natural antibody and complement mediate neutralization of influenza virus in the absence of prior immunity. *J Virol.* 81(7):3487-94 (2007)
- ⁵³ Fernandez Gonzalez, S., Jayasekera, J.P., Carroll, M.C., Complement and natural antibody are required in the long-term memory response to influenza virus. *Vaccine* 26 Suppl 8:l86-93 (2008)
- ⁵⁴ Khurana, S., Suguitan, A.L. Jr., Rivera, Y., Simmons, C.P., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., Manischewitz, J., King, L.R., Subbarao, K., Golding, H., Antigenic fingerprinting of H5N1 avian influenza using convalescent sera and monoclonal antibodies reveals potential vaccine and diagnostic targets. *PLoS Med.* 6(4):e1000049 (2009)
- ⁵⁵ Garcia, J.M., Pepin, S., Lagarde, N., Ma, E.S., Vogel, F.R., Chan, K.H., Chiu, S.S., Peiris, J.S., Heterosubtype neutralizing responses to influenza A (H5N1) viruses are mediated by antibodies to virus haemagglutinin. *PLoS One.* 4(11):e7918 (2009)
- ⁵⁶ Sandbulte, M.R., Jimenez, G.S., Boon, A.C., Smith, L.R., Treanor, J.J., Webby, R.J., Cross-reactive neuraminidase antibodies afford partial protection against H5N1 in mice and are present in unexposed humans. *PLoS Med.* 4(2):e59 (2007)
- ⁵⁷ Stelzer-Braid, S., Wong, B., Robertson, P., Lynch, G.W., Laurie, K., Shaw, R., Barr, I., Selleck, P.W., Baleriola, C., Escott, R., Katsoulotos, G., Rawlinson, W.D., A commercial ELISA detects high levels of human H5 antibody but cross-reacts with influenza A antibodies. *J Clin Virol.* 43(2):241-3 (2008)

-
- ⁵⁸ Lynch, G.W., Selleck, P.W., Axell, A.M., et al., Cross-Reactive anti-Avian H5N1 Influenza Neutralizing Antibodies in a Normal 'Exposure-Naïve' Australian Blood Donor Population. *The Open Immunol J.* 1:13–19 (2008)
- ⁵⁹ Gioia, C., Agrati, C., Castilletti, C., Capobianchi, M.R., Martini, F., Influenza pandemics, immune cross-reactivity, and pandemic control strategies. *J Infect Dis.* 198(2):294-5; author reply 295-6 (2008)
- ⁶⁰ Center for Disease Control, Serum Cross-Reactive Antibody Response to a Novel Influenza (H1N1) Virus After Vaccination with seasonal influenza vaccine, *MMWR weekly Vol.* 58(19)521 (2009)
- ⁶¹ Cheng, X., Eisenbraun, M., Xu, Q., Zhou, H., Kulkarni, D., Subbarao, K., Kemble, G., Jin, H., H5N1 vaccine-specific B cell responses in ferrets primed with live attenuated seasonal influenza vaccines. *PLoS ONE.* 4(2):e4436 (2009)
- ⁶² Knossow, M., Gaudier, M., Douglas, A., Barrère, B., Bizebard, T., Barbey, C., Gigant, B., Skehel, J.J.; Mechanism of neutralization of influenza virus infectivity by Antibodies, *Virology* 302(2):294-8 (2002)
- ⁶³ Knossow, M., Skehel, J.J.; Variation and infectivity neutralization in influenza, *Immunology* 119(1):1-7 (2006)
- ⁶⁴ Zebedee, S.L., Lamb, R.A.; Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions, *J Virol.* 62(8):2762-72 (1988)
- ⁶⁵ Wrammert, J., Smith, K., Miller, J., Langley, W.A., Kokko, K., Larsen, C., Zheng, N.Y., Mays, I., Garman, L., Helms, C., James, J., Air, G.M., Capra, J.D., Ahmed, R., Wilson, P.C., Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. *Nature* 453(7195):667-71 (2008)
- ⁶⁶ Zhao, G., Lin, Y., Du, L., Guan, J., Sun, S., Sui, H., Kou, Z., Chan, C.C., Guo, Y., Jiang, S., Zheng, B.J., Zhou, Y., An M2e-based multiple antigenic peptide vaccine protects mice from lethal challenge with divergent H5N1 influenza viruses. *Viol J.* 7:9 (2010)
- ⁶⁷ Pejoski, D., Zeng, W., Rockman, S., Brown, L.E., Jackson, D.C., A lipopeptide based on the M2 and HA proteins of influenza A viruses induces protective antibody. *Immunol Cell Biol.* PubMed PMID: 20177411 (2010)
- ⁶⁸ Fiers, W., De Filette, M., El Bakkouri, K., Schepens, B., Roose, K., Schotsaert, M., Birkett, A., Saelens, X., M2e-based universal influenza A vaccine. *Vaccine* 27(45):6280-3 (2009)
- ⁶⁹ Fu, T.M., Grimm, K.M., Citron, M.P., Freed, D.C., Fan, J., Keller, P.M., Shiver, J.W., Liang, X., Joyce, J.G., Comparative immunogenicity evaluations of influenza A virus M2 peptide as recombinant virus like particle or conjugate vaccines in mice and monkeys. *Vaccine* 27(9):1440-7 (2009)
- ⁷⁰ www.flu.lanl.gov/epitopes.html
- ⁷¹ Rimmelzwaan, G.F., Boon, A.C., Voeten, J.T., Berkhoff, E.G., Fouchier, R.A., Osterhaus, A.D., Sequence variation in the influenza A virus nucleoprotein associated with escape from cytotoxic T lymphocytes. *Virus Res.* 103(1-2):97-100 (2004)

-
- ⁷² Rimmelzwaan, G.F., Kreijtz, J.H., Bodewes, R., Fouchier, R.A., Osterhaus, A.D., Influenza virus CTL epitopes, remarkably conserved and remarkably variable. *Vaccine* 27(45):6363-5 (2009)
- ⁷³ Lo, C.Y., Wu, Z., Misplon, J.A., Price, G.E., Pappas, C., Kong, W.P., Tumpey, T.M., Epstein, S.L., Comparison of vaccines for induction of heterosubtypic immunity to influenza A virus: cold-adapted vaccine versus DNA prime-adenovirus boost strategies. *Vaccine* 26(17):2062-72 (2008)
- ⁷⁴ Lalor, P.A., Webby, R.J., Morrow, J., Rusalov, D., Kaslow, D.C., Rolland, A., Smith, L.R., Plasmid DNA-based vaccines protect mice and ferrets against lethal challenge with A/Vietnam/1203/04 (H5N1) influenza virus. *J Infect Dis.* 197(12):1643-52 (2008)
- ⁷⁵ Tompkins, S.M., Zhao, Z.S., Lo, C.Y., Misplon, J.A., Liu, T., Ye, Z., Hogan, R.J., Wu, Z., Benton, K.A., Tumpey, T.M., Epstein, S.L., Matrix protein 2 vaccination and protection against influenza viruses, including subtype H5N1. *Emerg Infect Dis.* 13(3):426-35 (2007)
- ⁷⁶ Kreijtz, J.H.C., de Mutsert, G., van Baalen, C.A., Fouchier, R.A.M., Osterhaus, A.D.M.E., Rimmelzwaan, G.F. Cross.Recognition of Avian H5N1 Influenza Virus by Human Cytotoxic T-Lymphocyte Populations Directed to Human Influenza A Virus, *J Virol.* 82(11)5161-66 (2008)
- ⁷⁷ Bui, H.H., Peters, B., Assarsson, E., Mbawuike, I., Sette, A.; Ab and T cell epitopes of influenza A virus, knowledge and opportunities, *Proc Natl Acad Sci* 104(1):246-51 (2007)
- ⁷⁸ Lipatov, A.S., Hoffmann, E., Salomon, R., Yen, H.L., Webster, R.G., Crossprotectiveness and immunogenicity of influenza A/Duck/Singapore/3/97(H5) vaccines against infection with A/Vietnam/1203/04(H5N1) virus in ferrets. *J Infect Dis.* 194:1040–3 (2006)
- ⁷⁹ Matsuoka, Y., Lamirande, E.W., Subbarao, K., The mouse model for influenza. *Curr Protoc Microbiol.* Chapter 15:Unit 15G.3 (2009)
- ⁸⁰ Lipatov, A., et al., Neurovirulence in Mice of H5N1 Influenza Virus Genotypes Isolated from Hong Kong Poultry in 2001, *J Virol.* 77(6)3816-23 (2003)
- ⁸¹ Geeraedts, F., Goutagny, N., Hornung, V., Severa, M., de Haan, A., Pool, J., Wilschut, J., Fitzgerald, K.A., Huckriede, A., Superior immunogenicity of inactivated whole virus, H5N1 influenza vaccine is primarily controlled by Toll-like receptor signalling. *PLoS Pathog.* 4(8):e1000138 (2008)
- ⁸² Collin, N., de Radiguès, X.; World Health Organization H1N1 Vaccine Task Force. Vaccine production capacity for seasonal and pandemic (H1N1) 2009 influenza. *Vaccine* 27(38):5184-6 (2009)
- ⁸³ Dunnill, P.; A DNA flu vaccine in practice, *Nat Biotechnol.* 24(2):139 (2006)
- ⁸⁴ Leroux-Roels, I., Leroux-Roels, G., Current status and progress of pre-pandemic and pandemic influenza vaccine development. *Expert Rev Vaccines.* 8(4):401-23 (2009)
- ⁸⁵ http://www.pei.de/cIn_042/nn_517712/DE/arzneimittel/impfstoffe/influenza/influenza-node.html_nnn=true
- ⁸⁶ <http://www.ema.europa.eu/influenza/vaccines/>

-
- ⁸⁷ Wang, Z., Tobler, S., Roayaei, J., Eick, A., Live attenuated or inactivated influenza vaccines and medical encounters for respiratory illnesses among US military personnel. *JAMA* 301(9):945-53 (2009)
- ⁸⁸ Sendi, P. et al., Intranasal Flu Vaccine in a working population, *Clinical Infectious Diseases* 38:974-80 (2004)
- ⁸⁹ Kopecky-Bromberg, S.A., Fraser, K.A., Pica, N., Carnero, E., Moran, T.M., Franck, R.W., Tsuji, M., Palese, P., Alpha-C-galactosylceramide as an adjuvant for a live attenuated influenza virus vaccine. *Vaccine* 27(28):3766-74 (2009)
- ⁹⁰ Talaat, K.R., Karron, R.A., Callahan, K.A., Luke, C.J., Dilorenzo, S.C., Chen, G.L., Lamirande, E.W., Jin, H., Coelingh, K.L., Murphy, B.R., Kemble, G., Subbarao, K., A live attenuated H7N3 influenza virus vaccine is well tolerated and immunogenic in a Phase I trial in healthy adults. *Vaccine* 27(28):3744-53 (2009)
- ⁹¹ Watanabe, S., Watanabe, T., Kawaoka, Y., Influenza A virus lacking M2 protein as a live attenuated vaccine. *J Virol.* 2009 Jun;83(11):5947-50 (2009)
- ⁹² Miyaki, C., Quintilio, W., Miyaji, E.N., Botosso, V.F., Kubrusly, F.S., Santos, F.L., Iourtov, D., Higashi, H.G., Raw, I., Production of H5N1 (NIBRG-14) inactivated whole virus and split virion influenza vaccines and analysis of immunogenicity in mice using different adjuvant formulations. *Vaccine* 28(13):2505-9 (2010)
- ⁹³ Subbarao, K., Chen, H., Swayne, D., Mingay, L., Fodor, E., Brownlee, G., Xu, X., Lu, X., Katz, J., Cox, N., Matsuoka, Y., Evaluation of a genetically modified reassortant H5N1 influenza A virus vaccine candidate generated by plasmid-based reverse genetics. *Virology* 305(1):192-200 (2003)
- ⁹⁴ Horimoto, T., Takada, A., Fujii, K., Goto, H., Hatta, M., Watanabe, S., Iwatsuki-Horimoto, K., Ito, M., Tagawa-Sakai, Y., Yamada, S., Ito, H., Ito, T., Imai, M., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Lim, W., Guan, Y., Peiris, M., Kawaoka, Y., The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate. *Vaccine* 24(17):3669-76 (2006)
- ⁹⁵ Hoffmann, E., Lipatov, A.S., Webby, R.J., Govorkova, E.A., Webster, R.G., Role of specific hemagglutinin amino acids in the immunogenicity and protection of H5N1 influenza virus vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(36):12915-20 (2005)
- ⁹⁶ Takahashi, Y., Hasegawa, H., Hara, Y., Ato, M., Ninomiya, A., Takagi, H., Odagiri, T., Sata, T., Tashiro, M., Kobayashi, K., Protective immunity afforded by inactivated H5N1 (NIBRG-14) vaccine requires antibodies against both hemagglutinin and neuraminidase in mice. *J Infect Dis.* 199(11):1629-37 (2009)
- ⁹⁷ Takahashi Y, Hasegawa H, Hara Y, Ato M, Ninomiya A, Takagi H, Odagiri T, Sata T, Tashiro M, Kobayashi K. Protective Immunity Afforded by Inactivated H5N1 (NIBRG-14) Vaccine Requires Antibodies against Both Hemagglutinin and Neuraminidase in Mice. *J Infect Dis.* 199(11):1629-37 (2009)

-
- ⁹⁸ Takada, A., Kuboki, N., Okazaki, K., Ninomiya, A., Tanaka, H., Ozaki, H., Itamura, S., Nishimura, H., Enami, M., Tashiro, M., Shortridge, K.F., Kida, H., Avirulent Avian influenza virus as a vaccine strain against a potential human pandemic. *J Virol.* 73(10):8303-7 (1999)
- ⁹⁹ Karron RA, Talaat K, Luke C, Callahan K, Thumar B, Dilorenzo S, McAuliffe J, Schappell E, Suguitan A, Mills K, Chen G, Lamirande E, Coelingh K, Jin H, Murphy BR, Kemble G, Subbarao K. Evaluation of two live attenuated cold-adapted H5N1 influenza virus vaccines in healthy adults. *Vaccine* 27(36):4953-60 (2009)
- ¹⁰⁰ Fan S, Gao Y, Shinya K, Li CK, Li Y, Shi J, Jiang Y, Suo Y, Tong T, Zhong G, Song J, Zhang Y, Tian G, Guan Y, Xu XN, Bu Z, Kawaoka Y, Chen H. Immunogenicity and protective efficacy of a live attenuated H5N1 vaccine in nonhuman primates. *PLoS Pathog.* 5(5):e1000409 (2009)
- ¹⁰¹ Yang SG, Wo JE, Li MW, Mi FF, Yu CB, Lv GL, Cao HC, Lu HF, Wang BH, Zhu H, Li LJ. Construction and cellular immune response induction of HA-based alphavirus replicon vaccines against human-avian influenza (H5N1). *Vaccine* May 15 (2009)
- ¹⁰² Hoelscher, M.A., Garg, S., Bangari, D.S., Belser, J.A., Lu, X., Stephenson, I., Bright, R.A., Katz, J.M., Mittal, S.K., Sambhara, S., Development of adenoviral-vector-based pandemic influenza vaccine against antigenically distinct human H5N1 strains in mice. *Lancet* 367(9509):475-81 (2006)
- ¹⁰³ Gao, W., Soloff, A.C., Lu, X., Montecalvo, A., Nguyen, D.C., Matsuoka, Y., Robbins, P.D., Swayne, D.E., Donis, R.O., Katz, J.M., Barratt-Boyes, S.M., Gambotto, A., Protection of mice and poultry from lethal H5N1 avian influenza virus through adenovirus-based immunization. *J Virol.* 80(4):1959-64 (2006)
- ¹⁰⁴ Dorrell, L., O'Callaghan, C.A., Britton, W., Hambleton, S., McMichael, A., Smith, G.L., Rowland-Jones, S., Blanchard, T.J., Recombinant modified vaccinia virus Ankara efficiently restimulates human cytotoxic T lymphocytes in vitro. *Vaccine* 19(2-3):327-36 (2000)
- ¹⁰⁵ Epstein, S.L., Misplon, J.A., Lawson, C.M., Subbarao, E.K., Connors, M., Murphy, B.R., Beta2-microglobulin-deficient mice can be protected against influenza A infection by vaccination with vaccinia-influenza recombinants expressing hemagglutinin and neuraminidase. *J Immunol.* 150(12):5484-93 (1993)
- ¹⁰⁶ Mingxiao, M., Ningyi, J., Zhenguo, W., Ruilin, W., Dongliang, F., Min, Z., Gefen, Y., Chang, L., Leili, J., Kuoshi, J., Yingjiu, Z., Construction and immunogenicity of recombinant fowlpox vaccines coexpressing HA of AIV H5N1 and chicken IL18. *Vaccine* 24(20):4304-11 (2006)
- ¹⁰⁷ Liu, M.A., McClements, W., Ulmer, J.B., Shiver, J., Donnelly, J., Immunization of non-human primates with DNA vaccines. *Vaccine* 15(8):909-12 (1997)
- ¹⁰⁸ Fu, T.M., Guan, L., Friedman, A., Ulmer, J.B., Liu, M.A., Donnelly, J.J., Induction of MHC class I-restricted CTL response by DNA immunization with ubiquitin-influenza virus nucleoprotein fusion antigens. *Vaccine* 16(18):1711-7 (1998)

-
- ¹⁰⁹ Bender, B.S., Ulmer, J.B., DeWitt, C.M., Cottey, R., Taylor, S.F., Ward, A.M., Friedman, A., Liu, M.A., Donnelly, J.J., Immunogenicity and efficacy of DNA vaccines encoding influenza A proteins in aged mice. *Vaccine* 16(18):1748-55. Erratum in: *Vaccine* 1999 Mar 17;17(11-12):1581 (1998)
- ¹¹⁰ Epstein, S.L., Tumpey, T.M., Misplon, J.A., Lo, C.Y., Cooper, L.A., Subbarao, K., Renshaw, M., Sambhara, S., Katz, J.M., DNA vaccine expressing conserved influenza virus proteins protective against H5N1 challenge infection in mice. *Emerg Infect Dis.* 8(8):796-801 (2002)
- ¹¹¹ Epstein, S.L., Stack, A., Misplon, J.A., Lo, C.Y., Mostowski, H., Bennink, J., Subbarao, K., Vaccination with DNA encoding internal proteins of influenza virus does not require CD8(+) cytotoxic T lymphocytes: either CD4(+) or CD8(+) T cells can promote survival and recovery after challenge. *Int Immunol.* 12(1):91-101 (2000)
- ¹¹² Okuda K, Ihata A, Watabe S, Okada E, Yamakawa T, Hamasima K, et al., Protective immunity against influenza A virus induced by immunization with DNA plasmid containing influenza M gene, *Vaccine* 19:3681–91 (2001)
- ¹¹³ Arrington, J., Braun, R.P., Dong, L., Fuller, D.H., Macklin, M.D., Umlauf, S.W., Wagner, S.J., Wu, M.S., Payne, L.G., Haynes, J.R., Plasmid vectors encoding cholera toxin or the heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli* are strong adjuvants for DNA vaccines. *J Virol.* 76(9):4536-46 (2002)
- ¹¹⁴ Watabe, S., Xin, K.Q., Ihata, A., Liu, L.J., Honsho, A., Aoki, I., Hamajima, K., Wahren, B., Okuda, K., Protection against influenza virus challenge by topical application of influenza DNA vaccine. *Vaccine* 19(31):4434-44 (2001)
- ¹¹⁵ Fu, T.M., Friedman, A., Ulmer, J.B., Liu, M.A., Donnelly, J.J., Protective cellular immunity: cytotoxic T-lymphocyte responses against dominant and recessive epitopes of influenza virus nucleoprotein induced by DNA immunization. *J Virol.* 71(4):2715-21 (1997)
- ¹¹⁶ Epstein, S.L., Kong, W.P., Misplon, J.A., Lo, C.Y., Tumpey, T.M., Xu, L., Nabel, G.J., Protection against multiple influenza A subtypes by vaccination with highly conserved nucleoprotein. *Vaccine* 23(46-47):5404-10 (2005)
- ¹¹⁷ Wiesener, N., Schütze, T., Lapp, S., Lehmann, M., Jarasch-Althof, N., Wutzler, P., Henke, A., Analysis of different DNA vaccines for protection of experimental influenza a virus infection. *Viral Immunol.* 24(4):321-30 (2011)
- ¹¹⁸ Chen, Z., Sahashi, Y., Matsuo, K., Asanuma, H., Takahashi, H., Iwasaki, T., Suzuki, Y., Aizawa, C., Kurata, T., Tamura, S., Comparison of the ability of viral protein-expressing plasmid DNAs to protect against influenza. *Vaccine* 16(16):1544-9 (1998)
- ¹¹⁹ Kendirgi, F., Yun, N.E., Linde, N.S., Zacks, M.A., Smith, J.N., Smith, J.K., McMicken, H., Chen, Y., Paessler, S., Novel linear DNA vaccines induce protective immune responses against lethal infection with influenza virus type A/H5N1. *Hum Vaccin.* 2008 Nov-Dec;4(6):410-9 (2008)
- ¹²⁰ Galarza JM, Latham T, Cupo A. Virus-like particle (VLP) vaccine conferred complete protection against a lethal influenza virus challenge. *Viral Immunol.* 18:244–51 (2005)

-
- ¹²¹ Kang SM, Yoo DG, Lipatov AS, Song JM, Davis CT, Quan FS, Chen LM, Donis RO, Compans RW. Induction of long-term protective immune responses by influenza H5N1 virus-like particles. *PLoS ONE*. 2009;4(3):e4667 (2009)
- ¹²² Quan FS, Yoo DG, Song JM, Clements JD, Compans RW, Kang SM. Kinetics of immune responses to influenza virus-like particles and dose-dependence of protection with a single vaccination. *J Virol*. 83(9):4489-97 (2009)
- ¹²³ Quan FS, Steinhauer D, Huang C, Ross TM, Compans RW, Kang SM. A bivalent influenza VLP vaccine confers complete inhibition of virus replication in lungs. *Vaccine* 26(26):3352-61 (2008)
- ¹²⁴ Kang SM, Song JM, Quan FS, Compans RW. Influenza vaccines based on virus-like particles. *Virus Res*. Apr 15 (2009)
- ¹²⁵ Quan FS, Compans RW, Nguyen HH, Kang SM. Induction of heterosubtypic immunity to influenza virus by intranasal immunization. *J Virol*. 82(3):1350-9 (2008)
- ¹²⁶ Quan FS, Huang C, Compans RW, Kang SM. Virus-like particle vaccine induces protective immunity against homologous and heterologous strains of influenza virus. *J Virol*. 81(7):3514-24 (2007)
- ¹²⁷ Guillonneau C, Mintern JD, Hubert FX, Hurt AC, Besra GS, Porcelli S, Barr IG, Doherty PC, Godfrey DI, Turner SJ. Combined NKT cell activation and influenza virus vaccination boosts memory CTL generation and protective immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(9):3330-5 (2009)
- ¹²⁸ Hasegawa H, Ichinohe T, Aina A, Tamura S, Kurata T. Development of mucosal adjuvants for intranasal vaccine for H5N1 influenza viruses. *Ther Clin Risk Manag*. 5(1):125-32 (2009)
- ¹²⁹ Herbert AS, Heffron L, Sundick R, Roberts PC. Incorporation of membrane-bound, mammalian-derived immunomodulatory proteins into influenza whole virus vaccines boosts immunogenicity and protection against lethal challenge. *Virology*. 6:42 (2009)
- ¹³⁰ Banzhoff A, Pellegrini M, Del Giudice G, Fragapane E, Groth N, Podda A. MF59-adjuvanted vaccines for seasonal and pandemic influenza prophylaxis. *Influenza Other Respi Viruses*. 2(6):243-9 (2008)
- ¹³¹ Huang MH, Huang CY, Lin SC, Chen JH, Ku CC, Chou AH, Liu SJ, Chen HW, Chong P, Leng CH. Enhancement of potent antibody and T-cell responses by a single-dose, novel nanoemulsion-formulated pandemic influenza vaccine. *Microbes Infect*. Apr 1 (2009)
- ¹³² Galli G, Hancock K, Hoschler K, DeVos J, Praus M, Bardelli M, Malzone C, Castellino F, Gentile C, McNally T, Del Giudice G, Banzhoff A, Brauer V, Montomoli E, Zambon M, Katz J, Nicholson K, Stephenson I. Fast rise of broadly cross-reactive antibodies after boosting long-lived human memory B cells primed by an MF59 adjuvanted prepandemic vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(19):7962-7 (2009)
- ¹³³ Forrest HL, Khalenkov AM, Govorkova EA, Kim JK, Del Giudice G, Webster RG. Single- and multiple-clade influenza A H5N1 vaccines induce cross protection in ferrets. *Vaccine*. May 8 (2009)

-
- ¹³⁴ Clark TW, Pareek M, Hoschler K, Dillon H, Nicholson KG, Groth N, Stephenson I. Trial of 2009 influenza A (H1N1) monovalent MF59-adjuvanted vaccine. *N Engl J Med.* 361(25):2424-35 (2009)
- ¹³⁵ Martinez, O., Tsibane, T., Basler, C.F., Neutralizing anti-influenza virus monoclonal antibodies: therapeutics and tools for discovery. *Int Rev Immunol.* 28(1):69-92 (2009)
- ¹³⁶ Le, Q.M., Kiso, M., Someya, K., Sakai, Y.T., Nguyen, T.H., Nguyen, K.H., Pham, N.D., Ngyen, H.H., Yamada, S., Muramoto, Y., Horimoto, T., Takada, A., Goto, H., Suzuki, T., Suzuki, Y., Kawaoka, Y.; Asian flu: Isolation of a drug-resistant H5N1 virus, *Nature* 437(7062):1108, Erratum in: *Nature.* 2005 Dec 8;438(7069):754 (2005)
- ¹³⁷ de Jong, M.D., Tran, T.T., Truong, H.K., Vo, M.H., Smith, G.J., Nguyen, V.C., Bach, V.C., Phan, T.Q., Do, Q.H., Guan, Y., Peiris, J.S., Tran, T.H., Farrar, J., Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection, *New England Journal of Medicine* 353(25):2667-72 (2005)
- ¹³⁸ Russell, R.J., Kerry, P.S., Stevens, D.J., Steinhauer, D.A., Martin, S.R., Gamblin, S.J., Skehel, J.J., Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(46):17736-41 (2008)
- ¹³⁹ Hilleman, M.R., Bunyak, E.B., McAleer, W.J., McLean, A.A., Human hepatitis B vaccine. In Krugmann S, Sherlock S (eds), *Proceedings of the European Symposium on hepatitis B.* Rahway: Merck Sharp and Dohme International, 1981: 120-139 (1981)
- ¹⁴⁰ McAleer, W.J., Bunyak, E.B., Maigetter, R.Z., Wampler, D.E., Miller, W.J., Hilleman, M.R., Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* 307: 178-180 (1984)
- ¹⁴¹ Fan, J., Liang, X., Horton, M.S., Perry, H.C., Citron, M.P., Heidecker, G.J., Fu, T.M., Joyce, J., Przysiecki, C.T., Keller, P.M., Garsky, V.M., Ionescu, R., Rippeon, Y., Shi, L., Chastain, M.A., Condra, J.H., Davies, M.E., Liao, J., Emini, E.A., Shiver, J.W., Preclinical study of influenza virus A M2 peptide conjugate vaccines in mice, ferrets, and rhesus monkeys. *Vaccine* 22(23-24):2993-3003 (2004)
- ¹⁴² Haynes, J.R., Dokken, L., Wiley, J.A., Cawthon, A.G., Bigger, J., Harmsen, A.G., Richardson, C., Influenza-pseudotyped Gag virus-like particle vaccines provide broad protection against highly pathogenic avian influenza challenge. *Vaccine* 27(4):530-41 (2009)
- ¹⁴³ Ionescu, R.M., Przysiecki, C.T., Liang, X., Garsky, V.M., Fan, J., Wang, B., Troutman, R., Rippeon, Y., Flanagan, E., Shiver, J., Shi, L., Pharmaceutical and immunological evaluation of human papillomavirus viruslike particle as an antigen carrier. *J Pharm Sci.* 95(1):70-9 (2006)
- ¹⁴⁴ Denis, J., Acosta-Ramirez, E., Zhao, Y., Hamelin, M.E., Koukavica, I., Baz, M., Abed, Y., Savard, C., Pare, C., Lopez Macias, C., Boivin, G., Leclerc, D., Development of a universal influenza A vaccine based on the M2e peptide fused to the papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform. *Vaccine* 26(27-28):3395-403 (2008)
- ¹⁴⁵ Bessa, J., Schmitz, N., Hinton, H.J., Schwarz, K., Jegerlehner, A., Bachmann, M.F., Efficient induction of mucosal and systemic immune responses by virus-like particles administered intranasally: implications for vaccine design. *Eur J Immunol.*38(1):114-26 (2008)

-
- ¹⁴⁶ Schotsaert, M., De Filette, M., Fiers, W., Saelens, X., Universal M2 ectodomain-based influenza A vaccines: preclinical and clinical developments. *Expert Rev Vaccines*. 8(4):499-508 (2009)
- ¹⁴⁷ Slepushkin, V.A., Katz, J.M., Black, R.A., Gamble, W.C., Rota, P.A., Cox, N.J., Protection of mice against influenza A virus challenge by vaccination with baculovirus-expressed M2 protein. *Vaccine* 13(15):1399-402 (1995)
- ¹⁴⁸ Pieters, J., MHC class II restricted antigen presentation, *Curr Opin Immunol*. 9(1)89-96 (1997)
- ¹⁴⁹ Jondal, M., Schirmbeck, R., Reimann, J., MHC class I-restricted CTL responses to exogenous antigens, *Immunity* 5(4):295-302 (1996)
- ¹⁵⁰ Feng, J., Zhang, M., Mozdzanowska, K., Zharikova, D., Hoff, H., Wunner, W., Couch, R.B., Gerhard, W., Influenza A virus infection engenders a poor antibody response against the ectodomain of matrix protein 2. *Virology* 343(1):102 (2006)
- ¹⁵¹ Mozdzanowska, K., Zharikova, D., Cudic, M., Otvos, L., Gerhard, W., Roles of adjuvant and route of vaccination in antibody response and protection engendered by a synthetic matrix protein 2-based influenza A virus vaccine in the mouse. *Virology* 357(1):118 (2007)
- ¹⁵² Adar, Y., Singer, Y., Levi, R., Tzehoval, E., Perk, S., Banet-Noach, C., Nagar, S., Arnon, R., Ben-Yedidia, T., A universal epitope-based influenza vaccine and its efficacy against H5N1. *Vaccine* 27(15):2099-107 (2009)
- ¹⁵³ Wang, B.Z., Quan, F.S., Kang, S.M., Bozja, J., Skountzou, I., Compans, R.W., Incorporation of membrane-anchored flagellin into influenza virus-like particles enhances the breadth of immune responses. *J Virol*. 82(23):11813-23. Epub 2008 Sep 10. (2008)
- ¹⁵⁴ Fu, N., Khan, S., Quinten, E., de Graaf, N., Pemberton, A.J., Rivett, A.J., Melief, C.J.M., Ossendorp, F., Effective CD8+ T cell priming and tumor protection by enterotoxin B subunit-conjugated peptides targeted to dendritic cells, *Vaccine* 27(38):5252-58 (2009)
- ¹⁵⁵ Eliasson, D.G., El Bakkouri, K., Schön, K., Ramne, A., Festjens, E., Löwenadler, B., Fiers, W., Saelens, X., Lycke, N., CTA1-M2e-DD: a novel mucosal adjuvant targeted influenza vaccine. *Vaccine* 26(9):1243-52 (2008)
- ¹⁵⁶ Prabakaran, M., Velumani, S., He, F., Karuppanan, A.K., Geng, G.Y., Yin, L.K., Kwang, J., Protective immunity against influenza H5N1 virus challenge in mice by intranasal co-administration of baculovirus surface-displayed HA and recombinant CTB as an adjuvant. *Virology* 380(2):412-20 (2008)
- ¹⁵⁷ Ernst, W.A., Kim, H.J., Tumpey, T.M., Jansen, A.D., Tai, W., Cramer, D.V., Adler-Moore, J.P., Fujii, G.. Protection against H1, H5, H6 and H9 influenza A infection with liposomal matrix 2 epitope vaccines. *Vaccine* 24(24):5158-68 (2006)
- ¹⁵⁸ Yang, K., Whalen, B.J., Tirabassi, R.S., Selin, L.K., Levchenko, T.S., Torchilin, V.P., Kislaukis, E.H., Guberski, D.L.. A DNA vaccine prime followed by a liposome-encapsulated protein boost confers enhanced mucosal immune responses and protection *J Immunol*. 180(9):6159-67 (2008)

-
- ¹⁵⁹ Uchida, M., Natsume, H., Kishino, T., Seki, T., Ogihara, M., Juni, K., Kimura, M., Morimoto, Y., Immunization by particle bombardment of antigen-loaded poly-(DL-lactide-co-glycolide) microspheres in mice. *Vaccine* 24(12):2120-30 (2006)
- ¹⁶⁰ del Rio, B., Dattwyler, R.J., Aroso, M., Neves, V., Meirelles, L., Seegers, J.F., Gomes-Solecki, M., Oral immunization with recombinant lactobacillus plantarum induces a protective immune response in mice with Lyme disease. *Clin Vaccine Immunol.* 15(9):1429-35 (2008)
- ¹⁶¹ Bodewes, R., Kreijtz, J.H., Baas, C., Geelhoed-Mieras, M.M., de Mutsert G., van Amerongen, G., van den Brand, J.M., Fouchier, R.A., Osterhaus, A.D., Rimmelzwaan, G.F., Vaccination against human influenza A/H3N2 virus prevents the induction of heterosubtypic immunity against lethal infection with avian influenza A/H5N1 virus. *PLoS One* 4(5):e5538 (2009)
- ¹⁶² Kreijtz, J.H., Bodewes, R., van den Brand, J.M., de Mutsert, G., Baas, C., van Amerongen, G., Fouchier, R.A., Osterhaus, A.D., Rimmelzwaan, G.F., Infection of mice with a human influenza A/H3N2 virus induces protective immunity against lethal infection with influenza A/H5N1 virus. *Vaccine* 27(36):4983-9 (2009)
- ¹⁶³ Carnero, E., Li, W., Borderia, A.V., Moltedo, B., Moran, T., García-Sastre, A., Optimization of human immunodeficiency virus gag expression by newcastle disease virus vectors for the induction of potent immune responses. *J Virol.* 83(2):584-97 (2009)
- ¹⁶⁴ Zhan, X., Slobod, K.S., Krishnamurthy, S., Luque, L.E., Takimoto, T., Jones, B., Surman, S., Russell, C.J., Portner, A., Hurwitz, J.L., Sendai virus recombinant vaccine expressing hPIV-3 HN or F elicits protective immunity and combines with a second recombinant to prevent hPIV-1, hPIV-3 and RSV infections. *Vaccine* 2008 Jun 25;26(27-28):3480-8 (2008)
- ¹⁶⁵ Tang, D.C., Zhang, J., Toro, H., Shi, Z., Van Kampen, K.R., Adenovirus as a carrier for the development of influenza virus-free avian influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines* 8(4):469-81 (2009)
- ¹⁶⁶ Patel, A., Tikoo, S., Kobinger, G., A porcine adenovirus with low human seroprevalence is a promising alternative vaccine vector to human Adenovirus 5 in an H5N1 virus disease model. *PLoS One* 5(12):e15301 (2010)
- ¹⁶⁷ Lin, J., Calcedo, R., Vandenberghe, L.H., Bell, P., Somanathan, S., Wilson, J.M., A new genetic vaccine platform based on an adeno-associated virus isolated from a rhesus macaque. *J Virol.* 83(24):12738-50 (2009)
- ¹⁶⁸ Calcedo, R., Vandenberghe, L.H., Gao, G., Lin, J., Wilson, J.M., Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *J Infect Dis.* 199(3):381-90 (2009)
- ¹⁶⁹ Lin, S.W., Hensley, S.E., Tatsis, N., Lasaro, M.O., Ertl, H.C., Recombinant adeno-associated virus vectors induce functionally impaired transgene product-specific CD8+ T cells in mice. *J Clin Invest.* 117(12):3958-70 (2007)
- ¹⁷⁰ Donsante, A., Miller, D.G., Li, Y., Vogler, C., Brunt, E.M., Russell, D.W., Sands, M.S., AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science* 317(5837):477 (2007)

-
- ¹⁷¹ He, F., Madhan, S., Kwang, J., Baculovirus vector as a delivery vehicle for influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines* 8(4):455-67 (2009)
- ¹⁷² Thompson, J.M., Whitmore, A.C., Staats, H.F., Johnston, R., The contribution of type I interferon signaling to immunity induced by alphavirus replicon vaccines. *Vaccine* 26(39):4998-5003 (2008)
- ¹⁷³ Barefoot, B., Thornburg, N.J., Barouch, D.H., Yu, J.S., Sample, C., Johnston, R.E., Liao, H.X., Kepler, T.B., Haynes, B.F., Ramsburg, E., Comparison of multiple vaccine vectors in a single heterologous prime-boost trial. *Vaccine* 26(48):6108-18 (2008)
- ¹⁷⁴ Yang, S.G., Wo, J.E., Li, M.W., Mi, F.F., Yu, C.B., Lv, G.L., Cao, H.C., Lu, H.F., Wang, B.H., Zhu, H., Li, L.J., Expression of H5N1 influenza virus hemagglutinin protein fused with protein transduction domain in an alphavirus replicon system. *J Virol Methods* 163(1):31-9 (2010)
- ¹⁷⁵ Dai, B., Yang, L., Yang, H., Hu, B., Baltimore, D., Wang, P., HIV-1 Gag-specific immunity induced by a lentivector-based vaccine directed to dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(48):20382-7 (2009)
- ¹⁷⁶ Coutant, F., Frenkiel, M.P., Despres, P., Charneau, P., Protective antiviral immunity conferred by a nonintegrative lentiviral vector-based vaccine. *PLoS One* 3(12):e3973 (2008)
- ¹⁷⁷ Schwartz, J.A., Buonocore, L., Suguitan, A.L. Jr., Silaghi, A., Kobasa, D., Kobinger, G., Feldmann, H., Subbarao, K., Rose, J.K., Potent vesicular stomatitis virus-based avian influenza vaccines provide long-term sterilizing immunity against heterologous challenge. *J Virol* 84(9):4611-8 (2010)
- ¹⁷⁸ Geisbert, T.W., Daddario-Dicaprio, K.M., Lewis, M.G., Geisbert, J.B., Grolla, A., Leung, A., Paragas, J., Matthias, L., Smith, M.A., Jones, S.M., Hensley, L.E., Feldmann, H., Jahrling, P.B., Vesicular stomatitis virus-based ebola vaccine is well-tolerated and protects immunocompromised nonhuman primates. *PLoS Pathog* 4(11):e1000225 (2008)
- ¹⁷⁹ Rimmelzwaan, G.F., Sutter, G., Candidate influenza vaccines based on recombinant modified vaccinia virus Ankara. *Expert Rev Vaccines* 8(4):447-54 (2009)
- ¹⁸⁰ Corbett, M., Bogers, W.M., Heeney, J.L., Gerber, S., Genin, C., Didierlaurent, A., Oostermeijer, H., Dubbes, R., Braskamp, G., Lerondel, S., Gomez, C.E., Esteban, M., Wagner, R., Kondova, I., Mooij, P., Balla-Jhagjhoorsingh, S., Beenhakker, N., Koopman, G., van der Burg, S., Kraehenbuhl, J.P., Le Pape, A., Aerosol immunization with NYVAC and MVA vectored vaccines is safe, simple, and immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(6):2046-51 (2008)
- ¹⁸¹ Donnelly, J.J., Ulmer, J.B., Liu, M.A., Protective efficacy of intramuscular immunization with naked DNA. *Ann N Y Acad Sci* 772:40-6 (1995)
- ¹⁸² Szécsi, J., Gabriel, G., Edfeldt, G., Michelet, M., Klenk, H.D., Cosset, F.L., DNA vaccination with a single-plasmid construct coding for viruslike particles protects mice against infection with a highly pathogenic avian influenza A virus. *J Infect Dis* 200(2):181-90 (2009)
- ¹⁸³ Neumann, G., Watanabe, T., Ito, H., Watanabe, S., Goto, H., Gao, P., Hughes, M., Perez, D.R., Donis, R., Hoffmann, E., Hobom, G., Kawaoka, Y., Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(16):9345-50 (1999)

-
- ¹⁸⁴ Hoffmann, E., Neumann, G., Kawaoka, Y., Hobom, G., Webster, R.G., A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11):6108-13 (2000)
- ¹⁸⁵ Jones, S., Evans, K., McElwaine-Johnn, H., Sharpe, M., Oxford, J., Lambkin-Williams, R., Mant, T., Nolan, A., Zambon, M., Ellis, J., Beadle, J., Loudon, P.T., DNA vaccination protects against an influenza challenge in a double-blind randomised placebo-controlled phase 1b clinical trial. *Vaccine* 27(18):2506-12 (2009)
- ¹⁸⁶ McCormack, S., Stöhr, W., Barber, T., Bart, P.A., Harari, A., Moog, C., Ciuffreda, D., Cellerai, C., Cowen, M., Gamboni, R., Burnet, S., Legg, K., Brodnicki, E., Wolf, H., Wagner, R., Heeney, J., Frachette, M.J., Tartaglia, J., Babiker, A., Pantaleo, G., Weber, J., EV02: a Phase I trial to compare the safety and immunogenicity of HIV DNA-C prime-NYVAC-C boost to NYVAC-C alone. *Vaccine* 26(25):3162-74 (2008)
- ¹⁸⁷ Roos, A.K., Pavlenko, M., Charo, J., Egevad, L., Pisa, P., Induction of PSA-specific CTLs and anti-tumor immunity by a genetic prostate cancer vaccine, *Prostate* 62(3):217 (2005)
- ¹⁸⁸ Pavlenko, M., Roos, A.K., Lundqvist, A., Palmborg, A., Miller, A.M., Ozenci, V., Bergman, B., Egevad, L., Hellstrom, M., Kiessling, R., Masucci, G., Wersall, P., Nilsson, S., Pisa, P., A phase I trial of DNA vaccination with a plasmid expressing prostate-specific antigen in patients with hormone-refractory prostate cancer, *Br J Cancer* 91(4):688 (2004)
- ¹⁸⁹ Mincheff, M., Tchakarov, S., Zoubak, S., Loukinov, D., Botev, C., Altankova, I., Georgiev, G., Petrov, S., Meryman, H.T., Naked DNA and adenoviral immunizations for immunotherapy of prostate cancer: a phase I/II clinical trial, *Eur Urol.* 38(2):208 (2000)
- ¹⁹⁰ Lay, M., Callejo, B., Chang, S., Hong, D.K., Lewis, D.B., Carroll, T.D., Matzinger, S., Fritts, L., Miller, C.J., Warner, J.F., Liang, L., Fairman, J., Cationic lipid/DNA complexes (JVRS-100) combined with influenza vaccine (Fluzone((R))) increases antibody response, cellular immunity, and antigenically drifted protection. *Vaccine* 27(29):3811-20 (2009)
- ¹⁹¹ Mann, J.F., Shakir, E., Carter, K.C., Mullen, A.B., Alexander, J., Ferro, V.A., Lipid vesicle size of an oral influenza vaccine delivery vehicle influences the Th1/Th2 bias in the immune response and protection against infection. *Vaccine* 27(27):3643-9 (2009)
- ¹⁹² Ishii, Y., Nakae, T., Sakamoto, F., Matsuo, K., Matsuo, K., Quan, Y.S., Kamiyama, F., Fujita, T., Yamamoto, A., Nakagawa, S., Okada, N., A transcutaneous vaccination system using a hydrogel patch for viral and bacterial infection. *J Control Release* 131(2):113-20 (2008)
- ¹⁹³ Zheng, L., Wang, F., Yang, Z., Chen, J., Chang, H., Chen, Z., A single immunization with HA DNA vaccine by electroporation induces early protection against H5N1 avian influenza virus challenge in mice. *BMC Infect Dis.* 9:17 (2009)
- ¹⁹⁴ Laddy, D.J., Yan, J., Khan, A.S., Andersen, H., Cohn, A., Greenhouse, J., Lewis, M., Manischewitz, J., King, L.R., Golding, H., Draghia-Akli, R., Weiner, D.B., Electroporation of synthetic DNA antigens

-
- offers protection in nonhuman primates challenged with highly pathogenic avian influenza virus. *J Virol.* 2009 May;83(9):4624-30. Epub 2009 Feb 11 (2009)
- ¹⁹⁵ Zhu, Q., Zarnitsyn, V.G., Ye, L., Wen, Z., Gao, Y., Pan, L., Skountzou, I., Gill, H.S., Prausnitz, M.R., Yang, C., Compans, R.W., Immunization by vaccine-coated microneedle arrays protects against lethal influenza virus challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(19):7968-73 (2009)
- ¹⁹⁶ Skountzou, I., Quan, F.S., Jacob, J., Compans, R.W., Kang, S.M., Transcutaneous immunization with inactivated influenza virus induces protective immune responses. *Vaccine* 24(35-36):6110-9 (2006)
- ¹⁹⁷ Ding, Z., Verbaan, F.J., Bivas-Benita, M., Bungener, L., Huckriede, A., van den Berg, D.J., Kersten, G., Bouwstra, J.A., Microneedle arrays for the transcutaneous immunization of diphtheria and influenza in BALB/c mice. *J Control Release* 136(1):71-8 (2009)
- ¹⁹⁸ Bramson, J., Dayball, K., Eveleigh, C., Wan, Y.H., Page, D., Smith, A., Enabling topical immunization via microporation: a novel method for pain-free and needle-free delivery of adenovirus-based vaccines. *Gene Ther* 10(3):251-60 (2003)
- ¹⁹⁹ Strid, J., Hourihane, J., Kimber, I., Callard, R., Strobel, S., Disruption of the stratum corneum allows potent epicutaneous immunization with protein antigens resulting in a dominant systemic Th2 response. *Eur J Immunol.* 34(8):2100-9 (2004)
- ²⁰⁰ Takigawa, M., Tokura, Y., Hashizume, H., Yagi, H., Seo, N., Percutaneous peptide immunization via corneum barrier-disrupted murine skin for experimental tumor immunoprophylaxis. *Ann N Y Acad Sci.* 941:139-46 (2001)
- ²⁰¹ Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R., and Sanford, J.C., High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living Cells, *Nature* 327:70-73 (1987)
- ²⁰² Klein, T.M., Gradriel, T., Fromm, M.E., and Sanford, J.C., Factors influencing gene delivery into Zea mays cells by highvelocity microprojectiles, *Bio/Technology* 6:559-563 (1988)
- ²⁰³ Yang, N., Burkholder, J., Roberts, B., Martinell, B., McCabe, D., In vivo and in vitro gene transfer to mammalian cells by particle bombardment, *PNAS* 87:9568 (1990)
- ²⁰⁴ Ulmer, J.B., Donnelly, J.J., Parker, S.E., Rhodes, G.H., Felgner, P.L., Dwarki, V.J., Gromkowski, S.H., Deck, R.R., DeWitt, C.M., Friedman, A., Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259(5102):1745-9 (1993)
- ²⁰⁵ Pertmer, T.M., Eisenbraun, M.D., McCabe, D., Prayaga, S.K., Fuller, D.H., Haynes, J.R., Gene gun-based nucleic acid immunization: elicitation of humoral and cytotoxic T lymphocyte responses following epidermal delivery of nanogram quantities of DNA, *Vaccine* 13(15):1427-30 (1995)
- ²⁰⁶ Fensterle, J., Grode, L., Hess, J., Kaufmann, S.H.E., Effective DNA Vaccination Against Listeriosis by Prime/Boost Inoculation with the Gene Gun, *J Immunol.* 163:4510-18 (1999)
- ²⁰⁷ Johnston, S.A., Barry, M.A., Genetic to genomic vaccination, *Vaccine* 15(8):808-9 (1997)
- ²⁰⁸ Barry, M.A., Barry, M.E., Johnston, S.A., Production of monoclonal antibodies by genetic immunization, *Biotechniques* 16(4):616 (1994)

-
- ²⁰⁹ Yoshida, A., Nagata, T., Uchijima, M., Higashi, T., Koide, Y., Advantage of Gene-Gun mediated over intramuscular inoculation of plasmid DNA vaccine in reproducible induction of specific immune responses, *Vaccine* 18:1725 (2000)
- ²¹⁰ Trimble, C., Lin, C.T., Hung, C.F., Pai, S., Juang, J., He, L., Gillison, M., Pardoll, D., Wu, L., Wu, T.C., Comparison of the CD8+ T cell responses and antitumor effects generated by DNA vaccine administered through gene gun, biojector, and syringe. *Vaccine* 21(25-26):4036-42 (2003)
- ²¹¹ Rao, S.S., Gomez, P., Mascola, J.R., Dang, V., Krivulka, G.R., Yu, F., Lord, C.I., Shen, L., Bailer, R., Nabel, G.J., Letvin, N.L., Comparative evaluation of three different intramuscular delivery methods for DNA immunization in a nonhuman primate animal model. *Vaccine* 24(3):367-73 (2006)
- ²¹² Heckert, R.A., Elankumaran, S., Oshop, G.L., Vakharia, V.N., A novel transcutaneous plasmid-dimethylsulfoxide delivery technique for avian nucleic acid immunization. *Vet Immunol Immunopathol* 89(1-2):67-81 (2002)
- ²¹³ Dupuis, M., Denis-Mize, K., Woo, C., Goldbeck, C., Selby, M.J., Chen, M., Otten, G.R., Ulmer, J.B., Donnelly, J.J., Ott, G., McDonald, D.M., Distribution of DNA vaccines determines their immunogenicity after intramuscular injection in mice. *J Immunol* 165(5):2850-8 (2000)
- ²¹⁴ Donnelly, J.J., Friedman, A., Martinez, D., Montgomery, D.L., Shiver, J.W., Motzel, S.L., Ulmer, J.B., Liu, M.A., Preclinical efficacy of a prototype DNA vaccine: enhanced protection against antigenic drift in influenza virus. *Nat Med* 1(6):583-7 (1995)
- ²¹⁵ Nitta, Y., Kawamoto, S., Halbert, C., Iwata, A., Miller, A.D., Miyazaki, J., Allen, M.D., A CMV-actin-globin hybrid promoter improves adeno-associated viral vector gene expression in the arterial wall in vivo. *J Gene Med* 7(10):1348-55 (2005)
- ²¹⁶ Komiya, E., Kondoh, M., Mizuguchi, H., Fujii, M., Utoguchi, N., Nakanishi, T., Watanabe, Y., Characteristics of transcription-regulatory elements for gene expression from plasmid vectors in human trophoblast cell lines. *Placenta* 27(9-10):934-8 (2006)
- ²¹⁷ Smith, R.L., Traul, D.L., Schaack, J., Clayton, G.H., Staley, K.J., Wilcox, C.L., Characterization of promoter function and cell-type-specific expression from viral vectors in the nervous system. *J Virol.* 74(23):11254-61 (2000)
- ²¹⁸ Bros, M., Ross, X.L., Pautz, A., Reske-Kunz, A.B., Ross, R., The human fascin gene promoter is highly active in mature dendritic cells due to a stage-specific enhancer, *J Immunol.* 15;171(4):1825 (2003)
- ²¹⁹ Weber, F., Schaffner W., Enhancer activity correlates with the oncogenic potential of avian retroviruses. *EMBO J.* 4(4):949-56 (1985)
- ²²⁰ Laimins, L.A., Khoury, G., Gorman, C., Howard, B., Gruss, P., Host-specific activation of transcription by tandem repeats from simian virus 40 and Moloney murine sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79(21):6453-7 (1982)
- ²²¹ Sroller, V., Vilchez, R.A., Stewart, A.R., Wong, C., Butel, J.S., Influence of the viral regulatory region on tumor induction by simian virus 40 in hamsters. *J Virol.* 82(2):871-9 (2008)

-
- ²²² Goh S., Good, L., Plasmid selection in *Escherichia coli* using an endogenous essential gene marker. *BMC Biotechnol.* 11;8:61 (2008)
- ²²³ Darquet, A.M., Cameron, B., Wils, P., Scherman, D., Crouzet, J., A new DNA vehicle for nonviral gene delivery: supercoiled minicircle. *Gene Ther.* 4(12):1341-9 (1997)
- ²²⁴ Dean, D.A., Import of plasmid DNA into the nucleus is sequence specific. *Exp Cell Res.* 230(2):293-302 (1997)
- ²²⁵ Munkonge, F.M., Amin, V., Hyde, S.C., Green, A.M., Pringle, I.A., Gill, D.R., Smith, J.W., Hooley, R.P., Xenariou, S., Ward, M.A., Leeds, N., Leung, K.Y., Chan, M., Hillery, E., Geddes, D.M., Griesenbach, U., Postel, E.H., Dean, D.A., Dunn, M.J., Alton, E.W., Identification and functional characterization of cytoplasmic determinants of plasmid DNA nuclear import. *J Biol Chem.* 284(39):26978-87 (2009)
- ²²⁶ Kornberg, R.D., The molecular basis of eukaryotic transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(32):12955-61 (2007)
- ²²⁷ Zeng, G., Yu, R.K., Cloning and transcriptional regulation of genes responsible for synthesis of gangliosides. *Curr Drug Targets.* 9(4):317-24 (2008)
- ²²⁸ Shaw, G., Kamen, R., A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 46(5):659-67 (1986)
- ²²⁹ Krays, V., Marinx, O., Shaw, G., Deschamps, J., Huez, G., Translational blockade imposed by cytokine-derived UA-rich sequences. *Science* 245(4920):852-5 (1989)
- ²³⁰ Akashi, M., Shaw, G., Hachiya, M., Elstner, E., Suzuki, G., Koeffler, P., Number and location of AUUUA motifs: role in regulating transiently expressed RNAs. *Blood* 83(11):3182-7 (1994)
- ²³¹ Rajagopalan, L.E., Burkholder, J.K., Turner, J., Culp, J., Yang, N.S., Malter, J.S., Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mRNA stabilization enhances transgenic expression in normal cells and tissues. *Blood* 86(7):2551-8 (1995)
- ²³² Cheadle, C., Fan, J., Cho-Chung, Y.S., Werner, T., Ray, J., Do, L., Gorospe, M., Becker, K.G., Stability regulation of mRNA and the control of gene expression. *Ann N Y Acad Sci.* 1058:196-204 (2005)
- ²³³ Hartikka, J., Sawdey, M., Cornefert-Jensen, F., Margalith, M., Barnhart, K., Nolasco, M., Vahlsing, H.L., Meek, J., Marquet, M., Hobart, P., Norman, J., Manthorpe, M., An improved plasmid DNA expression vector for direct injection into skeletal muscle. *Hum Gene Ther.* 7(10):1205-17 (1996)
- ²³⁴ Kozak, M., An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* 15(20):8125-48 (1987)
- ²³⁵ Olafsdóttir, G., Svansson, V., Ingvarsson, S., Marti, E., Torsteinsdóttir, S., In vitro analysis of expression vectors for DNA vaccination of horses: the effect of a Kozak sequence. *Acta Vet Scand.* 50:44 (2008)
- ²³⁶ Tokunaga, T., Yamamoto, H., Shimada, S., Abe, H., Fukuda, T., Fujisawa, Y., Furutani, Y., Yano, O., Kataoka, T., Sudo, T., et al., Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from

-
- Mycobacterium bovis BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst.* 72(4):955-62 (1984)
- ²³⁷ Krieg, A.M., Yi, A.K., Matson, S., Waldschmidt, T.J., Bishop, G.A., Teasdale, R., Koretzky, G.A., Klinman, D.M., CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374(6522):546-9 (1995)
- ²³⁸ Higgins, D., Marshall, J.D., Traquina, P., Van Nest, G., Livingston, B.D., Immunostimulatory DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines* 6(5):747-59 (2007)
- ²³⁹ Sato, Y., Roman, M., Tighe, H., Lee, D., Corr, M., Nguyen, M.D., Silverman, G.J., Lotz, M., Carson, D.A., Raz, E., Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* 273(5273):352-4 (1996)
- ²⁴⁰ Hanke, T., Schneider, J., Gilbert, S.C., Hill, A.V., McMichael, A., DNA multi-CTL epitope vaccines for HIV and Plasmodium falciparum: immunogenicity in mice, *Vaccine* 16(4):426 (1998)
- ²⁴¹ Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Häsler, K., Fleckenstein, B., Schaffner, W., A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 41(2):521-30 (1985)
- ²⁴² Haas, J., Park, E.C. Seed, B., Codon Usage limitation in the expression of HIV-1 envelope, *Curr Biol.* 6:315 (1996)
- ²⁴³ Grantham, R., Gautier, C., Gouy, M., Mercier, R., Pavé, A., Codon catalog usage and the genome hypothesis, *Nucleic Acids Res.* 8(1)49 (1980)
- ²⁴⁴ Nakamura, Y., Wada, K.N., Wada, Y., Doi, H., Knaya, S., Gojobori, T., Ikemura, T., Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases, *Nucleic Acids Res.* 24(1)214 (1996)
Aktualisierte Codon-Datenbank herunterladen unter: <ftp://ftp.kazusa.or.jp/pub/codon/current>
- ²⁴⁵ Ikemura, T., Correlation between the Abundance of E.coli Transfer RNAs and the Occurrence of the respective Codons in its Protein Genes: A proposal for a Synonymous Codon Choice that is Optimal for the E.coli Translational System, *J Mol Biol.* 151:389-409 (1981)
- ²⁴⁶ Atkins, J.F., Gesteland, R.F., Reid, B.R., Anderson, C.W., Normal tRNAs promote ribosomal frameshifting, *Cell* 18:1119-1131 (1979)
- ²⁴⁷ Vinner, L., Nielsen, H.V., Bryder, K., Corbet, S., Nielsen, C., Fomsgaard, A., Gene Gun DNA vaccination with Rev-independent synthetic HIV-1 gp160 envelope gene using mammalian codons, *Vaccine* 17:2166 (1999)
- ²⁴⁸ Gregor, P.D., Wolchok, J.D., Ferrone, C.R., Buchinshky, H., Guevara-Patino, J.A., Perales, M.A., Mortazavi, F., Bacich, D., Heston, W., Latouche, J.B., Sadelain, M., Allison, J.P., Scher, H.I., Houghton, A.N., CTLA-4 blockade in combination with xenogeneic DNA vaccines enhances T-cell responses, tumor immunity and autoimmunity to self antigens in animal and cellular model systems, *Vaccine* 22(13-14):1700-8 (2004)

-
- ²⁴⁹ Kotsopoulou, E., Kim, V.N., Kingsman, A.J., Kingsman, S.M., Mitrophanous, K.A., A Rev-Independent Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)- Based Vector That Exploits a Codon-Optimized HIV-1 gag-pol Gene. *J Virol.* 74(10):4839 (2000)
- ²⁵⁰ Theodossis, A., Guillonneau, C., Welland, A., Ely, L.K., Clements, C.S., Williamson, N.A., Webb, A.I., Wilce, J.A., Mulder, R.J., Dunstone, M.A., Doherty, P.C., McCluskey, J., Purcell, A.W., Turner, S.J., Rossjohn, J., Constraints within major histocompatibility complex class I restricted peptides: presentation and consequences for T-cell recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(12):5534-9 (2010)
- ²⁵¹ Zhong, W., Liu, F., Dong, L., Lu, X., Hancock, K., Reinherz, E.L., Katz, J.M., Sambhara, S., Significant impact of sequence variations in the nucleoprotein on CD8 T cell-mediated cross-protection against influenza A virus infections. *PLoS One* 5(5):e10583 (2010)
- ²⁵² Wahl, A., McCoy, W., Schafer, F., Bardet, W., Buchli, R., Fremont, D.H., Hildebrand, W.H., T-cell tolerance for variability in an HLA class I-presented influenza A virus epitope. *J Virol.* 83(18):9206-14 (2009)
- ²⁵³ Bower, J.F., Yang, X., Sodroski, J., Ross, T.M., Elicitation of neutralizing antibodies with DNA vaccines expressing soluble stabilized human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein trimers conjugated to C3d. *J Virol.* 78(9):4710-9 (2004)
- ²⁵⁴ De Filette, M., Martens, W., Roose, K., Deroo, T., Vervalle, F., Bentahir, M., Vandekerckhove, J., Fiers, W., Saelens, X., An influenza A vaccine based on tetrameric ectodomain of matrix protein 2. *J Biol Chem.* 283(17):11382-7 (2008)
- ²⁵⁵ Fu, T.M., Freed, D.C., Horton, M.S., Fan, J., Citron, M.P., Joyce, J.G., Garsky, V.M., Casimiro, D.R., Zhao, Q., Shiver, J.W., Liang, X., Characterizations of four monoclonal antibodies against M2 protein ectodomain of influenza A virus. *Virology* 385(1):218-26 (2009)
- ²⁵⁶ Asa, P.B., Cao, Y., Garry, R.F., Antibodies to squalene in Gulf War syndrome. *Exp Mol Pathol.* 68(1):55-64 (2000)
- ²⁵⁷ Asa, P.B., Wilson, R.B., Garry, R.F., Antibodies to squalene in recipients of anthrax vaccine. *Exp Mol Pathol.* 73(1):19-27 (2002)
- ²⁵⁸ Alving, C.R., Grabenstein, J.D., Re: Antibodies to squalene in Gulf War Syndrome. *Exp Mol Pathol.* 68(3):196-8 (2000)
- ²⁵⁹ Del Giudice, G., Fracapane, E., Bugarini, R., Hora, M., Henriksson, T., Palla, E., O'hagan, D., Donnelly, J., Rappuoli, R., Podda, A., Vaccines with the MF59 adjuvant do not stimulate antibody responses against squalene. *Clin Vaccine Immunol.* 13(9):1010-3 (2006)
- ²⁶⁰ Phillips, C.J., Matyas, G.R., Hansen, C.J., Alving, C.R., Smith, T.C., Ryan, M.A., Antibodies to squalene in US Navy Persian Gulf War veterans with chronic multisymptom illness. *Vaccine* 27(29):3921-6 (2009)
- ²⁶¹ Petrik, M.S., Wong, M.C., Tabata, R.C., Garry, R.F., Shaw, C.A., Aluminum adjuvant linked to Gulf War illness induces motor neuron death in mice. *Neuromolecular Med.* 9(1):83-100 (2007)

-
- ²⁶² Shaw, C.A., Petrik, M.S., Aluminum hydroxide injections lead to motor deficits and motor neuron degeneration. *J Inorg Biochem.* 103(11):1555-62 (2009)
- ²⁶³ Eisenbarth, S.C., Colegio, O.R., O'Connor, W., Sutterwala, F.S., Flavell, R.A., Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature.* 453(7198):1122-6 (2008)
- ²⁶⁴ Afonso, L.C., Scharton, T.M., Vieira, L.Q., Wysocka, M., Trinchieri, G., Scott, P., The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science* 263(5144):235-7 (1994)
- ²⁶⁵ Toka, F.N., Pack, C.D., Rouse, B.T., Molecular adjuvants for mucosal immunity. *Immunol Rev.* 199:100-12 (2004)
- ²⁶⁶ Huang, A.Y., Golumbek, P., Ahmadzadeh, M., Jaffee, E., Pardoll, D., Levitsky, H., Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* 264(5161):961-5 (1994)
- ²⁶⁷ Del Vecchio, M., Bajetta, E., Canova, S., Lotze, M.T., Wesa, A., Parmiani, G., Anichini, A., Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clin Cancer Res.* 13(16):4677-85 (2007)
- ²⁶⁸ Vilaysane, A., Muruve, D.A., The innate immune response to DNA. *Semin Immunol.* 21(4):208-14 (2009)
- ²⁶⁹ Mor, G., Singla, M., Steinberg, A.D., Hoffman, S.L., Okuda, K., Klinman, D.M., Do DNA vaccines induce autoimmune disease? *Hum Gene Ther.* 8(3):293-300. (1997)
- ²⁷⁰ Silva C.L., Bonato, V.L., dos Santos-Júnior, R.R., Zárata-Bladés, C.R., Sartori A., Recent advances in DNA vaccines for autoimmune diseases. *Expert Rev Vaccines* 8(2):239-52 (2009)
- ²⁷¹ Garren H., DNA vaccines for autoimmune diseases. *Expert Rev Vaccines* 8(9):1195-203 (2009)
- ²⁷² Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., Akira, S., A Toll-like Receptor recognizes Bacterial DNA, *Nature* 408(6813):740-5 (2000)
- ²⁷³ Klinman, D.M., Yi, A.K., Beaucage, S.L., Conover, J., Krieg, A.M., CpG motifs present in bacteria rapidly induce Lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma, *PNAS* 93(7):2879 (1994)
- ²⁷⁴ Sato, Y., Roman, M., Tighe, H., Lee, D., Corr, M., Nguyen, M.D., Silverman, G.J., Lotz, M., Carson, D.A., Raz, E., Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization, *Science* 273:352 (1996)
- ²⁷⁵ Pavlenko, M., Induction of T-cell responses against PSA by Plasmid DNA Vaccination, Doctoral Thesis, Karolinska Institutet, Stockholm (2005)
- ²⁷⁶ Wu, F., Yuan, X.Y., Li, J., Chen, Y.H., The co-administration of CpG-ODN influenced protective activity of influenza M2e vaccine. *Vaccine* 27(32):4320-4 (2009)
- ²⁷⁷ Grossmann, C., Tenbusch, M., Nchinda, G., Temchura, V., Nabi, G., Stone, G.W., Kornbluth, R.S., Uberla, K., Enhancement of the priming efficacy of DNA vaccines encoding dendritic cell-targeted antigens by synergistic toll-like receptor ligands. *BMC Immunol.* 10:43 (2009)

-
- ²⁷⁸ Iparraguirre, A., Tobias, J.W., Hensley, S.E., Masek, K.S., Cavanagh, L.L., Rendl, M., Hunter, C.A., Ertl, H.C., von Andrian, U.H., Weninger, W., Two distinct activation states of plasmacytoid dendritic cells induced by influenza virus and CpG 1826 oligonucleotide. *J Leukoc Biol.* 83(3):610-20 (2008)
- ²⁷⁹ Gregoriadis, G., Saffie, R., de Souza, J.B., Liposome-mediated DNA vaccination. *FEBS Lett.* 402(2-3):107-10 (1997)
- ²⁸⁰ Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., Behr, J.P., A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(16):7297-301 (1995)
- ²⁸¹ Midoux, P., Monsigny, M., Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. *Bioconjug Chem.* 10(3):406-11 (1999)
- ²⁸² Regnström, K., Ragnarsson, E.G., Köping-Höggård, M., Torstensson, E., Nyblom, H., Artursson, P., PEI - a potent, but not harmless, mucosal immuno-stimulator of mixed T-helper cell response and FasL-mediated cell death in mice. *Gene Ther.* 10(18):1575-83 (2003)
- ²⁸³ Hagenaaers, N., Verheul, R.J., Mooren, I., de Jong P.H.J.L.F., Mastrobattista, E., Glansbeek, H.L., Heldens, J.G.M., van den Bosch, H., Hennink, W.E., Jiskoot, W., Relationship between structure and adjuvanticity of N,N,N-trimethyl chitosan (TMC) structural variants in a nasal influenza vaccine, *Journal of Controlled Release* 140:2,126-133 (2009)
- ²⁸⁴ Cruz, P.E., Khalil, P.L., Dryden, T.D., Chiou, H.C., Fink, P.S., Berberich, S.J., Bigley, N.J., A novel immunization method to induce cytotoxic T-lymphocyte responses (CTL) against plasmid-encoded herpes simplex virus type-1 glycoprotein D. *Vaccine* 17(9-10):1091-9 (1999)
- ²⁸⁵ Jiang, H.L., Kim, T.H., Kim, Y.K., Park, I.Y., Cho, M.H., Cho, C.S., Efficient gene delivery using chitosan-polyethylenimine hybrid systems. *Biomed Mater.* 3(2):25013 (2008)
- ²⁸⁶ Lam, A.P., Dean, D.A., Progress and prospects: nuclear import of nonviral vectors. *Gene Ther.* 17(4):439-47 (2010)
- ²⁸⁷ Glover, D.J., Leyton, D.L., Moseley, G.W., Jans, D.A., The efficiency of nuclear plasmid DNA delivery is a critical determinant of transgene expression at the single cell level. *J Gene Med.* 12(1):77-85 (2010)
- ²⁸⁸ Suzuki, T., Futaki, S., Niwa, M., Tanaka, S., Ueda, K., Sugiura, Y., Possible existence of common internalization mechanisms among arginine-rich peptides. *J Biol Chem.* 277(4):2437-43 (2002)
- ²⁸⁹ Schwarze, S.R., Ho, A., Vocero-Akbani, A., and Dowdy, S.F., In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 285(5433):1569-72 (1999)
- ²⁹⁰ Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., Sugiura, Y., Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol Chem.* 276(8):5836-40 (2001)
- ²⁹¹ Michiue, H., Tomizawa, K., Wei, F.Y., Matsushita, M., Lu, Y.F., Ichikawa, T., Tamiya, T., Date, I., Matsui, H., The NH2 terminus of influenza virus hemagglutinin-2 subunit peptides enhances the

-
- antitumor potency of polyarginine-mediated p53 protein transduction. *J Biol Chem.* 280(9):8285-9 (2005)
- ²⁹² Abes, S., Turner, J.J., Ivanova, G.D., Owen, D., Williams, D., Arzumanov, A., Clair, P., Gait, M.J., Lebleu, B., Efficient splicing correction by PNA conjugation to an R6-Penetratin delivery peptide. *Nucleic Acids Res.* 35(13):4495-502. Erratum in: *Nucleic Acids Res.* 2007;35(21):7396 (2007)
- ²⁹³ Grunwald, J., Rejtar, T., Sawant, R., Wang, Z., Torchilin, V.P., TAT Peptide and Its Conjugates: Proteolytic Stability. *Bioconjug Chem.* 2009 Jul 14 (2009)
- ²⁹⁴ Chauhan, A., Tikoo, A., Kapur, A.K., Singh, M., The taming of the cell penetrating domain of the HIV Tat: myths and realities. *J Control Release* 117(2):148-62 (2007)
- ²⁹⁵ Huq, I., Ping, Y.H., Tamilarasu, N., Rana, T.M., Controlling human immunodeficiency virus type 1 gene expression by unnatural peptides. *Biochemistry* 38(16):5172-7 (1999)
- ²⁹⁶ Wadia, J.S., Stan, R.V., Dowdy, S.F., Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med.* 10(3):310-5 (2004)
- ²⁹⁷ Ohmori, N., Niidome, T., Wada, A., Hirayama, T., Hatakeyama, T., Aoyagi, H., The enhancing effect of anionic alpha-helical peptide on cationic peptide-mediating transfection systems. *Biochem Biophys Res Commun.* 235(3):726-9 (1997)
- ²⁹⁸ Lo, S.L., Wang, S., An endosomolytic Tat peptide produced by incorporation of histidine and cysteine residues as a nonviral vector for DNA transfection. *Biomaterials* 29(15):2408-14 (2008)
- ²⁹⁹ Wagner, E., Plank, C., Zatloukal, K., Cotten, M., Birnstiel, M.L., Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(17):7934-8 (1992)
- ³⁰⁰ Nguyen, J., Xie, X., Neu, M., Dumitrascu, R., Reul, R., Sitterberg, J., Bakowsky, U., Schermuly, R., Fink, L., Schmehl, T., Gessler, T., Seeger, W., Kissel, T., Effects of cell-penetrating peptides and pegylation on transfection efficiency of polyethylenimine in mouse lungs. *J Gene Med.* 10(11):1236-46 (2008)
- ³⁰¹ Sirsi, S.R., Schray, R.C., Guan, X., Lykens, N.M., Williams, J.H., Erney, M.L., Lutz, G.J., Functionalized PEG-PEI copolymers complexed to exon-skipping oligonucleotides improve dystrophin expression in mdx mice. *Hum Gene Ther.* 19(8):795-806 (2008)
- ³⁰² Sawant, R.R., Sawant, R.M., Kale, A.A., Torchilin, V.P., The architecture of ligand attachment to nanocarriers controls their specific interaction with target cells. *J Drug Target* 16(7):596-600 (2008)
- ³⁰³ Kale, A.A., Torchilin, V.P., "Smart" drug carriers: PEGylated TATp-modified pH-sensitive liposomes. *J Liposome Res.* 17(3-4):197-203 (2007)
- ³⁰⁴ Ko, Y.T., Kale, A., Hartner, W.C., Papahadjopoulos-Sternberg, B., Torchilin, V.P., Self-assembling micelle-like nanoparticles based on phospholipid-polyethyleneimine conjugates for systemic gene delivery. *J Control Release* 133(2):132-8 (2009)
- ³⁰⁵ Hatakeyama, H., Akita, H., Kogure, K., Harashima, H., A Novel Nonviral Gene Delivery System: Multifunctional Envelope-Type Nano Device. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2009 Mar 28 (2009)

-
- ³⁰⁶ Akita, H., Kudo, A., Minoura, A., Yamaguti, M., Khalil, I.A., Moriguchi, R., Masuda, T., Danev, R., Nagayama, K., Kogure, K., Harashima, H., Multi-layered nanoparticles for penetrating the endosome and nuclear membrane via a step-wise membrane fusion process. *Biomaterials* 30(15):2940-9 (2009)
- ³⁰⁷ Knauf, M., Diplomarbeit, Freie Universität Berlin
- ³⁰⁸ Stemmer, W.P., Crameri, A., Ha, K.D., Brennan, T.M., Heyneker, H.L., Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides. *Gene* 164(1):49-53 (1995)
- ³⁰⁹ Cello, J., Paul, A.V., Wimmer, E., Chemical synthesis of Poliovirus cDNA: Generation of Infectious Virus in the Absence of Natural Template, *Science* 297(5583):1016 (2002)
- ³¹⁰ Mullis K.B., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51 Pt 1:263-73 (1986)
- ³¹¹ Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K., Pease, L.R., Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 77(1):61-8 (1989)
- ³¹² Cline, J., Braman, J.C., Hogrefe, H.H., PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 24(18):3546-51 (1996)
- ³¹³ Winship, P.R., An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethyl sulphoxide. *Nucleic Acids Res.* 17(3):1266 (1989)
- ³¹⁴ Masoud, S.A., Johnson, L.B., White, F.F., The sequence within two primers influences the optimum concentration of dimethyl sulfoxide in the PCR. *PCR Methods Appl.* 2(1):89-90 (1992)
- ³¹⁵ Varadaraj, K., Skinner, D.M., Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G + C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases. *Gene* 140(1):1-5 (1994)
- ³¹⁶ Sathe, G.M., O'Brien, S., McLaughlin, M.M., Watson, F., Livi, G.P., Use of polymerase chain reaction for rapid detection of gene insertions in whole yeast cells. *Nucleic Acids Res.* 19(17):4775 (1991)
- ³¹⁷ Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *PNAS USA* 74(12):5463 (1977)
- ³¹⁸ Smith, L.M., Sanders, J.Z., Kaiser, R.J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C.R., Heiner, C., Kent, S.B., Hood, L.E., Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321(6071):674-9 (1986)
- ³¹⁹ Prober, G.M., Trainor, G.L., Dam, R.J., Hobbs, F.W., Robertson, C.W., Zagursky, R.J., Cocuzza, A.J., Jensen, M.A., Baumeister, K., A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides, *Science* 238:336-341 (1987)
- ³²⁰ Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227:680-685 (1970)

-
- ³²¹ Schägger, H., Aquila, H., Von Jagow, G., Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal Biochem.* 173(1):201-5 (1988)
- ³²² Blum, H., Beier, H., Gross, H.J., Improved silver staining of plant protein, RNA & DNA in PAA gels, *Electrophoresis* 8:93-99 (1987)
- ³²³ Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W., Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focussing gels with clear background at nanogram sensitivity using CBB G-250 and R-250, *Electrophoresis* 9:255-262 (1988)
- ³²⁴ Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from poly-acrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354 (1979)
- ³²⁵ Kyhse-Andersen, J., Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 10, 203-209 (1984)
- ³²⁶ Gultekin, H., Heermann, K.H., The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix. *Anal Biochem.* 172(2):320-9 (1988)
- ³²⁷ Haan, C., Behrmann, I., A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background. *J Immunol Methods.* 318(1-2):11-9 (2007)
- ³²⁸ Kaulfuß, S., Modulation von Makrophagenfunktionen durch das Murine Zytomegalievirus (MCMV), Dissertation an der FU Berlin
- ³²⁹ Little, C., *Report of the Committee on Genetic Form and Nomenclature.* *The American Naturalist* **55**(637):175-178 (1921)
- ³³⁰ Potter, M. (ed) *The BALB/c mouse. Current Topics in Microbiol. Immunol.* 122. Springer-Verlag, Berlin (1985)
- ³³¹ Engvall E., Perlmann P., Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochem.* 8:871-874 (1971)
- ³³² Czerkinsky, C.C., Svennerholm, A.M., Ganglioside GM1 Enzyme-Linked Immunospot Assay for Simple Identification of Heat-labile Enterotoxin-Producing *Escherichia coli*, *J Clin Microbiol.* 17(6)965 (1983)
- ³³³ Murali-Krishna, K., Altman, J.D., Suresh, M., Sourdive, D.J., Zajac, A.J., Miller, J.D., Slansky, J., Ahmed, R., Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection, *Immunity* 8(2):177-87 (1998)
- ³³⁴ Le, T.T., Drane, D., Malliaros, J., Cox, J.C., Rothel, L., Pearse, M., Woodberry, T., Gardner, J., Suhrbier, A., Cytotoxic T cell polyepitope vaccines delivered by ISCOMs, *Vaccine* 19(32):4669-75 (2001)
- ³³⁵ Gaush, C.R., Smith, T.F., Replication and plaque assay of influenza virus in an established line of canine kidney cells. *Appl Microbiol.* 16(4):588-94 (1968)

-
- ³³⁶ Matrosovich, M., Matrosovich, T., Garten, W., Klenk, H.D., New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays. *Virology* 3:63 (2006)
- ³³⁷ Gao, Y., Nankya, I., Abraha, A., Troyer, R.M.; Nelson, K.N., Rubio, A., Arts, E.J.; Calculating HIV-1 Infectious Titre Using a Virtual TCID50 Method; *Methods in Molecular Biology* Vol. 485 Page 27-35 (2008)
- ³³⁸ http://www.charite.de/tierschutz/download/Abbruchkriterien-Berliner-TSchB_2Auflage2009.pdf
- ³³⁹ Sambrook, J.; Russell, D.W.; *Molecular Cloning, a laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press Third Edition (2001)
- ³⁴⁰ Kuroda, E., Yamashita, U., Mechanisms of Enhanced Macrophage-Mediated Prostaglandin E2 Production and its suppressive role in Th1 Activation in Th2-dominant BALB/C mice, *J Immunol* 170:757-764 (2003)
- ³⁴¹ Watanabe, H., Numata, K., Ito, T., Takagi, K., Matsukawa, A., Innate Immune Response in Th1- and Th2-Dominant Mouse Strains, *Shock* 22(5):460-466 (2004)
- ³⁴² Schulte, S., Sukhova, G.K., Libby, P., Genetically Programmed Biases in Th1 and Th2 Immune Responses Modulate Atherogenesis, *Am. J. Pathol.* 172 issue 6 Pages 1500-1508 (2008)
- ³⁴³ Lu, Y., Sjöstrand, M., Malmhäll, C., Rådinger, M., Jeurink, P., Lötvall, J., Bossios, A., New production of eosinophils and the corresponding TH1/TH2 balance in the lungs after allergen exposure in BALB/c and C57BL/6 mice. *Scand J Immunol.* 71(3):176-85 (2010)
- ³⁴⁴ Fukunaga, J., Abe, M., Murai, A., Akitake, Y., Hosokawa, M., Takahashi, M., Comparative study to elucidate the mechanism underlying the difference in airway hyperresponsiveness between two mouse strains. *Int Immunopharmacol* 7:1852-61 (2007)
- ³⁴⁵ Herz, U., Braun, A., Ruckert, R., Renz, H., Various immunological phenotypes are associated with increased airway responsiveness. *Clin Exp Allergy* 28:625-34 (1998)
- ³⁴⁶ Mestas, J., Hughes, C.C., Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol.* 172(5):2731-8 (2004)
- ³⁴⁷ Fan, S., Deng, G., Song, J., Tian, G., Suo, Y., Jiang, Y., Guan, Y., Bu, Z., Kawaoka, Y., Chen, H., Two amino acid residues in the matrix protein M1 contribute to the virulence difference of H5N1 avian influenza viruses in mice. *Virology* 384(1):28-32 (2009)
- ³⁴⁸ Daneshian, M., Wendel, A., Hartung, T., von Aulock, S., High sensitivity pyrogen testing in water and dialysis solutions, *J Immunol Methods* 336(1):64-70 (2008)
- ³⁴⁹ Taveira da Silva, A. M., Kaulbach, H. C., Chuidian, F. S., Lambert, D. R., Suffredini, A. F., Danner, R. L. (1993) Brief report: shock and multiple-organ dysfunction after self-administration of Salmonella endotoxin *N. Engl. J. Med.* 328, 1457-1460 (1993)
- ³⁵⁰ Sauter, C., Wolfensberger, C., Interferon in human serum after injection of endotoxin *Lancet* 2, 852-853 (1980)

-
- ³⁵¹ Misplon, J.A., Lo, C.Y., Gabbard, J.D., Tompkins, S.M., Epstein, S.L., Genetic control of immune responses to influenza A matrix 2 protein (M2). *Vaccine* 28(36):5817-27 (2010)
- ³⁵² Ulmer, J.B., Fu, T.M., Deck, R.R., Friedman, A., Guan, L., DeWitt, C., Liu, X., Wang, S., Liu, M.A., Donnelly, J.J., Caulfield, M.J., Protective CD4+ and CD8+ T cells against influenza virus induced by vaccination with nucleoprotein DNA. *J Virol.* 72(7):5648-53 (1998)
- ³⁵³ Kreijtz, J.H., Bodewes, R., van Amerongen, G., Kuiken, T., Fouchier, R.A., Osterhaus, A.D., Rimmelzwaan, G.F., Primary influenza A virus infection induces cross-protective immunity against a lethal infection with a heterosubtypic virus strain in mice. *Vaccine* 25(4):612-20 (2007)
- ³⁵⁴ Kreijtz, J.H., Bodewes, R., van den Brand, J.M., de Mutsert, G., Baas, C., van Amerongen, G., Fouchier, R.A., Osterhaus, A.D., Rimmelzwaan, G.F., Infection of mice with a human influenza A/H3N2 virus induces protective immunity against lethal infection with influenza A/H5N1 virus. *Vaccine* 27(36):4983-9 (2009)
- ³⁵⁵ Adar, Y., Singer, Y., Levi, R., Tzeheval, E., Perk, S., Banet-Noach, C., Nagar, S., Arnon, R., Ben-Yedidia, T., A universal epitope-based influenza vaccine and its efficacy against H5N1 Vaccine 27(15):2099-107 (2009)
- ³⁵⁶ Ulmer, J.B., Deck, R.R., DeWitt, C.M., Friedman, A., Donnelly, J.J., Liu, M.A., Protective immunity by intramuscular injection of low doses of influenza virus DNA vaccines. *Vaccine* 12(16):1541-4. (1994)
- ³⁵⁷ Donnelly, J.J., Friedman, A., Ulmer, J.B., Liu, M.A., Further protection against antigenic drift of influenza virus in a ferret model by DNA vaccination. *Vaccine* 15(8):865-86 (1997)
- ³⁵⁸ Ulmer, J.B., Deck, R.R., DeWitt, C.M., Fu, T.M., Donnelly, J.J., Caulfield, M.J., Liu, M.A., Expression of a viral protein by muscle cells in vivo induces protective cell-mediated immunity. *Vaccine* 15(8):839-41 (1997)
- ³⁵⁹ Lee, L.Y., Ha do, L.A., Simmons, C., de Jong, M.D., Chau, N.V., Schumacher, R., Peng, Y.C., McMichael, A.J., Farrar, J.J., Smith, G.L., Townsend, A.R., Askonas, B.A., Rowland-Jones, S., Dong, T., Memory T cells established by seasonal human influenza A infection cross-react with avian influenza A (H5N1) in healthy individuals. *J Clin Invest.* 118(10):3478-90 (2008)
- ³⁶⁰ Roti, M., Yang, J., Berger, D., Huston, L., James, E.A., Kwok, W.W., Healthy human subjects have CD4+ T cells directed against H5N1 influenza virus. *J Immunol.* 180(3):1758-68 (2008)
- ³⁶¹ Barefoot, B.E., Sample, C.J., Ramsburg, E.A., Recombinant Vesicular Stomatitis Virus Expressing Influenza Nucleoprotein Induces CD8 T-Cell Responses That Enhance Antibody-Mediated Protection after Lethal Challenge with Influenza Virus, *Clin Vacc Immunol.* 16(4):488-98 (2009)
- ³⁶² Murakami, S., Iwasa, A., Iwatsuki-Horimoto, K., Ito, M., Kiso, M., Kida, H., Takada, A., Nidom, C.A., Mai le, Q., Yamada, S., Imai, H., Sakai-Tagawa, Y., Kawaoka, Y., Horimoto, T., Cross-clade protective immunity of H5N1 influenza vaccines in a mouse model. *Vaccine* 26(50):6398-404 (2008)

-
- ³⁶³ Rao, S.S., Kong, W.P., Wei, C.J., Van Hoeven, N., Gorres, J.P., Nason, M., Andersen, H., Tumpey, T.M., Nabel, G.J., Comparative efficacy of hemagglutinin, nucleoprotein, and matrix 2 protein gene-based vaccination against H5N1 influenza in mouse and ferret. *PLoS One* 5(3):e9812 (2010)
- ³⁶⁴ Wei, C.J., Boyington, J.C., McTamney, P.M., Kong, W.P., Pearce, M.B., Xu, L., Andersen, H., Rao, S., Tumpey, T.M., Yang, Z.Y., Nabel, G.J., Induction of broadly neutralizing H1N1 influenza antibodies by vaccination. *Science* 329(5995):1060-4 (2010)
- ³⁶⁵ Zheng, L., Wang, F., Yang, Z., Chen, J., Chang, H., Chen, Z., A single immunization with HA DNA vaccine by electroporation induces early protection against H5N1 avian influenza virus challenge in mice. *BMC Infect Dis.* 2009 Feb 12;9:17 (2009)
- ³⁶⁶ Patel, A., Tran, K., Gray, M., Li, Y., Ao, Z., Yao, X., Kobasa, D., Kobinger, G.P., Evaluation of conserved and variable influenza antigens for immunization against different isolates of H5N1 viruses. *Vaccine* 27(23):3083-9 (2009)
- ³⁶⁷ Fu, T.M., Guan, L., Friedman, A., Schofield, T.L., Ulmer, J.B., Liu, M.A., Donnelly, J.J., Dose dependence of CTL precursor frequency induced by a DNA vaccine and correlation with protective immunity against influenza virus challenge. *J Immunol.* 162(7):4163-70 (1999)
- ³⁶⁸ Kreijtz, J.H., Suezter, Y., de Mutsert, G., van Amerongen, G., Schwantes, A., van den Brand, J.M., Fouchier, R.A., Löwer, J., Osterhaus, A.D., Sutter, G., Rimmelzwaan, G.F., MVA-based H5N1 vaccine affords cross-clade protection in mice against influenza A/H5N1 viruses at low doses and after single immunization. *PLoS One* 4(11):e7790 (2009)
- ³⁶⁹ <http://news.sciencemag.org/scienceinsider/2009/05/who-considers-r.html>
- ³⁷⁰ WHO Global Alert and Response Pandemic H1N1
http://www.who.int/csr/don/2010_04_09/en/index.html
- ³⁷¹ Rimmelzwaan, G.F., McElhaney, J.E., Correlates of protection: novel generations of influenza vaccines. *Vaccine* 26 Suppl 4:D41-4 (2008)
- ³⁷² Brown, L.E., Kelso, A., Prospects for an influenza vaccine that induces cross-protective cytotoxic T lymphocytes. *Immunol Cell Biol.* 2009 May;87(4):300-8. (2009)
- ³⁷³ Nicholson, K.G., Influenza and vaccine development: a continued battle. *Expert Rev Vaccines* 8(4):373-4 (2009)
- ³⁷⁴ Salomon, R., Webster, R.G., The influenza virus enigma. *Cell* 136(3):402-10 (2009)
- ³⁷⁵ Song, M.S., Oh, T.K., Pascua, P.N., Moon, H.J., Lee, J.H., Baek, Y.H., Woo, K.J., Yoon, Y., Sung, M.H., Poo, H., Kim, C.J., Choi, Y.K., Investigation of the biological indicator for vaccine efficacy against highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 virus challenge in mice and ferrets. *Vaccine* 27(24):3145-52 (2009)
- ³⁷⁶ Thueng-in, K., Maneewatch, S., Srimanote, P., Songserm, T., Tapchaisri, P., Sookrung, N., Tongtawe, P., Channarong, S., Chaicumpa, W., Heterosubtypic immunity to influenza mediated by liposome adjuvanted H5N1 recombinant protein vaccines. *Vaccine* 28(41):6765-77 (2010)

-
- ³⁷⁷ Matsui, M., Kohyama, S., Suda, T., Yokoyama, S., Mori, M., Kobayashi, A., Taneichi, M., Uchida, T., A CTL-based liposomal vaccine capable of inducing protection against heterosubtypic influenza viruses in HLA-A*0201 transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 391(3):1494-9 (2010)
- ³⁷⁸ Furuya, Y., Chan, J., Regner, M., Lobigs, M., Koskinen, A., Kok, T., Manavis, J., Li, P., Müllbacher, A., Alsharifi, M., Cytotoxic T cells are the predominant players providing cross-protective immunity induced by {gamma}-irradiated influenza A viruses. *J Virol.* 84(9):4212-21 (2010)
- ³⁷⁹ Furuya, Y., Regner, M., Lobigs, M., Koskinen, A., Müllbacher, A., Alsharifi, M., Effect of inactivation method on the cross-protective immunity induced by whole 'killed' influenza A viruses and commercial vaccine preparations. *J Gen Virol.* 91(Pt 6):1450-60 (2010)
- ³⁸⁰ Alsharifi, M., Furuya, Y., Bowden, T.R., Lobigs, M., Koskinen, A., Regner, M., Trinidad, L., Boyle, D.B., Müllbacher, A., Intranasal flu vaccine protective against seasonal and H5N1 avian influenza infections. *PLoS One* 4(4):e5336 (2009)
- ³⁸¹ Ichinohe, T., Aina, A., Nakamura, T., Akiyama, Y., Maeyama, J., Odagiri, T., Tashiro, M., Takahashi, H., Sawa, H., Tamura, S., Chiba, J., Kurata, T., Sata, T., Hasegawa, H., Induction of cross-protective immunity against influenza A virus H5N1 by an intranasal vaccine with extracts of mushroom mycelia. *J Med Virol.* 82(1):128-37 (2010)
- ³⁸² Price, G.E., Soboleski, M.R., Lo, C.Y., Misplon, J.A., Pappas, C., Houser, K.V., Tumpey, T.M., Epstein, S.L., Vaccination focusing immunity on conserved antigens protects mice and ferrets against virulent H1N1 and H5N1 influenza A viruses. *Vaccine* 27(47):6512-21 (2009)
- ³⁸³ Rimmelzwaan, G.F., Fouchier, R.A., Osterhaus, A.D., Influenza virus-specific cytotoxic T lymphocytes: a correlate of protection and a basis for vaccine development. *Curr Opin Biotechnol.* 18(6):529-36 (2007)
- ³⁸⁴ Patel, A., Tran, K., Gray, M., Li, Y., Ao, Z., Yao, X., Kobasa, D., Kobinger, G.P., Evaluation of conserved and variable influenza antigens for immunization against different isolates of H5N1 viruses. *Vaccine* 27(23):3083-9 (2009)
- ³⁸⁵ Vita, R., Zarebski, L., Greenbaum, J.A., Emami, H., Hoof, I., Salimi, N., Damle, R., Sette, A., Peters, B., The immune epitope database 2.0. *Nucleic Acids Res.* 38(Database issue):D854-62 (2010) <http://immuneepitope.org/>
- ³⁸⁶ Adamo, J.E., Liu, T., Schmeisser, F., Ye, Z., Optimizing viral protein yield of influenza virus strain A/Vietnam/1203/2004 by modification of the neuraminidase gene. *J Virol.* 2009 May;83(9):4023-9 (2009)
- ³⁸⁷ Corti, D., Voss, J., Gambelin, S.J., Codoni, G., Macagno, A., Jarrossay, D., Vachieri, S.G., Pinna, D., Minola, A., Vanzetta, F., Silacci, C., Fernandez-Rodriguez, B.M., Agatic, G., Bianchi, S., Giacchetto-Sasselli, I., Calder, L., Sallusto, F., Collins, P., Haire, L.F., Temperton, N., Langedijk, J.P., Skehel, J.J., Lanzavecchia, A., A Neutralizing Antibody Selected from Plasma Cells That Binds to Group 1 and Group 2 Influenza A Hemagglutinins. *Science* [Epub ahead of print] (2011)

-
- ³⁸⁸ Ekiert, D.C., Bhabha, G., Elsliger, M.A., Friesen, R.H., Jongeneelen, M., Throsby, M., Goudsmit, J., Wilson, I.A., Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. *Science* 324(5924):246-51 (2009)
- ³⁸⁹ Ekiert, D.C., Friesen, R.H., Bhabha, G., Kwaks, T., Jongeneelen, M., Yu, W., Ophorst, C., Cox, F., Korse, H.J., Brandenburg, B., Vogels, R., Brakenhoff, J.P., Kompier, R., Koldijk, M.H., Cornelissen, L.A., Poon, L.L., Peiris, M., Koudstaal, W., Wilson, I.A., Goudsmit, J., A Highly Conserved Neutralizing Epitope on Group 2 Influenza A Viruses. *Science* [Epub ahead of print] (2011)
- ³⁹⁰ Kashyap, A.K., Steel, J., Oner, A.F., Dillon, M.A., Swale, R.E., Wall, K.M., Perry, K.J., Faynboym, A., Ilhan, M., Horowitz, M., Horowitz, L., Palese, P., Bhatt, R.R., Lerner, R.A., Combinatorial antibody libraries from survivors of the Turkish H5N1 avian influenza outbreak reveal virus neutralization strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(16):5986-91 (2008)
- ³⁹¹ Sandbulte, M.R., Jimenez, G.S., Boon, A.C., Smith, L.R., Treanor, J.J., Webby, R.J., Cross-reactive neuraminidase antibodies afford partial protection against H5N1 in mice and are present in unexposed humans. *PLoS Med.* 4(2):e59 (2007)
- ³⁹² De Filette, M., Martens, W., Roose, K., et al., An Influenza A Vaccine Based on Tetrameric Ectodomain of Matrix protein 2. *J Biol Chem.* 24:6597–6601 (2008)
- ³⁹³ Liu, W., Peng, Z., Liu, Z., Lu, Y., Ding, J., Chen, Y.H., High epitope density in a single recombinant protein molecule of the extracellular domain of influenza A virus M2 protein significantly enhances protective immunity. *Vaccine* 23(3):366-71 (2004)
- ³⁹⁴ Zhao, G., Lin, Y., Du, L., Guan, J., Sun, S., Sui, H., Kou, Z., Chan, C.C., Guo, Y., Jiang, S., Zheng, B.J., Zhou, Y., An M2e-based multiple antigenic peptide vaccine protects mice from lethal challenge with divergent H5N1 influenza viruses. *Virology* 7:9 (2010)
- ³⁹⁵ Heinen, P.P., Rijsewijk, F.A., de Boer-Luijze, E.A., Bianchi, A.T., Vaccination of pigs with a DNA construct expressing an influenza virus M2-nucleoprotein fusion protein exacerbates disease after challenge with influenza A virus. *J Gen Virol.* 83(Pt 8):1851-9 (2002)
- ³⁹⁶ Jelinek, I., Leonard, J.N., Price, G.E., Brown, K.N., Meyer-Manlapat, A., Goldsmith, P.K., Wang, Y., Venzon, D., Epstein, S.L., Segal, D.M., TLR3-specific double-stranded RNA oligonucleotide adjuvants induce dendritic cell cross-presentation, CTL responses, and antiviral protection. *J Immunol.* 186(4):2422-9 (2011)
- ³⁹⁷ Cook, S.E., Park, I.K., Kim, E.M., Jeong, H.J., Park, T.G., Choi, Y.J., Akaike, T., Cho, C.S., Galactosylated polyethylenimine-graft-poly(vinyl pyrrolidone) as a hepatocyte-targeting gene carrier. *J Control Release* 105(1-2):151-63 (2005)