

Evaluierung von Nukleoprotein-kodierenden AAV-Vektoren als breitenwirksame Influenza- Impfstoffe

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

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

vorgelegt von

KATHARINA FIDDEKE

aus Frankfurt (Oder)

2016

Aus dem Robert Koch-Institut.

Angefertigt unter der Betreuung von Dr. Stephen Norley, Robert Koch-Institut, Berlin.

Oktober 2013 bis Oktober 2016

Erstgutachter: Prof. Dr. Norbert Bannert, Robert Koch-Institut, Berlin

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel, Freie Universität Berlin

Tag der Disputation: 20. Januar 2017

DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. Norbert Bannert dafür, dass er mir das Thema innerhalb seiner Arbeitsgruppe anvertraut hat und mir so die Arbeit ermöglichte. Dankend habe ich das Projekt unter der Förderung des Europäischen Forschungskonsortiums UNISEC bearbeitet. Ein besonderer Dank gilt Dr. Stephen Norley für die Betreuung. Die konstruktive Zusammenarbeit erlaubte eine zielorientierte Bearbeitung des Themas unter Zulassung eigener Ideen, wofür ich ihm überaus dankbar bin. Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel für die Übernahme der Gutachtertätigkeit, womit er die Voraussetzung für die Promotion an der Freien Universität Berlin schaffte.

Für die umfassende Hilfe bei den Tierexperimenten danke ich Annette Dietrich, Patricia Mützlitz und Stefanie Bessing. Bei Nicole Norley möchte ich mich für die ausgiebige Unterstützung im Zellkulturlabor bedanken. Für die technische Unterstützung während dieser Arbeit danke ich weiterhin Dr. Kazimierz Madela, Gudrun Holland und Dr. Michael Laue vom RKI, Phillip Born und Dr. Wouter Hinrichs von der Universität Gröningen sowie Laura Hildebrandt vom BCRT der Charité. Ganz besonders danke ich Dr. Oliver Hohn für seine Bereitschaft sich Fragen aller Art anzunehmen. In unzähligen, wertvollen Gesprächen habe ich sehr viel gelernt und immer eine Menge Spaß gehabt. In diesem Sinne möchte ich auch Dr. Veronika Lausch, Dr. Benjamin Gabriel, Nadine Weser, Daniel Demminger, Elena Plotzki und den weiteren Mitarbeitern des Instituts für die überaus angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Ich kann mich glücklich schätzen wunderbare Freunde an meiner Seite zu wissen, mit denen ich so gerne feiere, entspanne, fröhlich und nachdenklich bin. Ihr Lieben, vielen Dank für die schöne Zeit vor, zwischen und nach der Arbeit. Meinem Freund Erik danke ich zusätzlich aufrichtig für das gewissenhafte Korrekturlesen.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, die mir letztendlich diese Ausbildung ermöglicht haben. Für die bedingungslose Unterstützung, Förderung und ihr Vertrauen in mich danke ich ihnen und meiner Schwester von ganzem Herzen.

INHALTSVERZEICHNIS

DANKSAGUNG.....	3
INHALTSVERZEICHNIS	4
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	8
TABELLENVERZEICHNIS.....	10
1 EINLEITUNG.....	11
1.1 Das Influenzavirus – Aufbau und Replikation	11
1.2 Ein Rückblick auf über 400 Jahre Influenza.....	14
1.3 Therapie und Vorbeugung einer Influenza-Infektion: Die Geschichte von Hase und Igel.....	16
1.3.1 Antivirale Therapie	16
1.3.2 Saisonale Influenza-Impfstoffe.....	17
1.3.3 Pandemische Influenza-Impfstoffe.....	20
1.3.4 Breitenwirksame oder universelle Influenza-Impfstoffe.....	25
1.4 Adenovirus-assoziierte Viren als Hoffnungsträger der Gentherapie.....	29
1.4.1 Struktur und Replikation Adenovirus-assoziiierter Viren.....	29
1.4.2 Etablierung von AAVs als virale Vektoren in der Gentherapie	30
1.4.3 AAV-basierte Influenza-Impfstoffe	33
1.5 Ziel der Arbeit.....	37
2 MATERIAL.....	38
2.1 Software	38
2.2 Enzyme	38
2.3 Kits.....	39
2.4 Oligonukleotide.....	39
2.5 Plasmide	40
2.6 Rekombinante Proteine und Peptide.....	41
2.7 Laborgeräte	41
2.8 Chemikalien	42
2.9 Puffer und Lösungen	45
2.10 Pro- und Eukaryotische Zellen und deren Wachstumsmedien.....	47
2.11 Antikörper.....	48

INHALTSVERZEICHNIS

2.12	Antibiotika.....	49
3	METHODEN	50
3.1	Zellkultur und Zell-basierte Methoden.....	50
3.1.1	Transfektion	50
3.1.2	Transduktion.....	50
3.1.3	Durchflusszytometrie	50
3.1.4	Zelllyse.....	51
3.1.5	IFN- γ ELISpot	51
3.1.6	Bestimmung der Influenza-Viruslast in Lungen	52
3.2	DNA-basierte Methoden	53
3.2.1	Transformation	53
3.2.2	DNA-Präparation	54
3.2.3	Restriktionsverdau	54
3.2.4	Agarose-Gelelektrophorese	54
3.2.5	Mutagenese	54
3.2.6	Klonierung.....	54
3.2.7	Sequenzierung	56
3.2.8	Quantitative Real-Time PCR.....	57
3.3	Protein-basierte Methoden.....	58
3.3.1	Herstellung rekombinanter Proteine	58
3.3.2	ELISA	58
3.3.3	SDS-PAGE	59
3.3.4	Westernblot	60
3.3.5	Immunfluoreszenz	60
3.3.6	Herstellung rekombinanter AAV Präparationen	61
3.4	Arbeiten mit Tieren.....	64
3.4.1	Haltungsbedingungen.....	64
3.4.2	Immunisierungen	64
3.4.3	Blutentnahme und Gewinnung von Serum	65
3.4.4	Infektion mit Influenza (Belastung).....	65
3.4.5	Einzelzellpräparation der Lymphozyten der Maus	65
3.4.6	Injektion von Zellen	66

INHALTSVERZEICHNIS

3.4.7	<i>In vivo</i> Imaging.....	67
3.4.8	Lungenentnahme.....	67
3.4.9	Histologie.....	68
4	ERGEBNISSE	72
4.1	Produktion und Kontrolle von AAV-Präparationen	72
4.1.1	Optimierung des Produktionsformats in Spinner Flaschen und Quantifizierung hergestellter AAV Präparationen	72
4.1.2	Überprüfung der Reinheit, Transfektionseffizienz <i>in vitro</i> und Stabilität gegenüber Gefriertrocknung der AAVs.....	74
4.1.3	Untersuchung der Stabilität von AAV9-Vektoren gegenüber Lyophilisieren	76
4.2	Überprüfung der AAV-vermittelten Transgenexpression und Immunantwort <i>in vivo</i>	79
4.3	Homologe Schutzwirkung der AAV-vermittelten Nukleoproteine von Influenza H1N1pdm09 und PR8.....	85
4.4	Heterologe Schutzwirkung des AAV-vermitteltes Influenza H1N1pdm09 Nukleoproteins	88
4.5	Einfluss des immunodominanten CD8 ⁺ T-Zell Epitops NP ₃₆₆₋₃₇₄ auf heterologen Schutz90	
4.6	Untersuchung einer CD8 ⁺ T-Zell Epitopkette relevanter Influenza-Subtypen bezüglich Immunogenität und Schutzwirkung.....	93
4.7	Untersuchung der Funktionalität Zytotoxischer T-Zellen <i>in vivo</i>	94
4.7.1	Etablierung des Tests zur Untersuchung der CTL-Effizienz im lebenden Tier	95
4.7.2	Mittels Epitopkette induzierte Zytotoxische T-Zellen sind <i>in vivo</i> nicht funktionell	98
4.8	Reduktion der Viruslast nach Infektion mit PR8.....	99
5	DISKUSSION	101
5.1	Von der Produktion zur Lagerung rekombinanter AAV9-Vektoren	102
5.2	AAV9-basierte Immunisierung induziert Lang-anhaltende Transgenexpression und Immunantwort in Bl/6-Mäusen	104
5.3	Homologer Schutz nach AAV9-vermittelter Immunisierung mit Influenza Nukleoproteinen	106
5.4	Fehlender heterologer Schutz nach AAV9-vermittelter Immunisierung mit Influenza NP _{pdm09}	108

INHALTSVERZEICHNIS

5.5	Immunodominantes Epitop NP ₃₆₆₋₃₇₄ trägt entscheidend zu protektivem Effekt bei	110
5.6	Fehlender Schutz nach Immunisierung mit CD8 ⁺ T-Zell-Epitopkette.....	111
5.7	Zusammenfassende Darstellung.....	114
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	117
	LITERATUR.....	121
	ANHANG	140
	Vektorkarten	140
	Abkürzungen.....	143
	Unternehmensverzeichnis	149
	EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	151

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Struktur des Influenza A-Virus.....	12
Abbildung 2: Historie der influenza-Pandemien von 1700 bis 2000.....	14
Abbildung 3: Militärkrankenhaus während der Spanischen Grippe in Camp Funston, Kansas, USA.....	14
Abbildung 4: AAV-Struktur und Synthese rekombinanter Partikel	31
Abbildung 5: Kontrolle der AAV Partikel und deren Transduktionseffizienz <i>in vitro</i> ..	76
Abbildung 6: Luciferase-Aktivität nach Transduktion von HEK 293T Zellen mit rekonstituierten lyophilisierten AAV-Luci Partikeln.....	78
Abbildung 7: Transgenexpression nach intramuskulärer (i.m.) und intranasaler (i.n.) Applikation von AAV9-Luci in Bl/6 Albino-Mäusen.....	80
Abbildung 8: AAV- und Luciferase-spezifische humorale Immunantwort im Serum nach intramuskulärer und intranasaler Applikation von AAV9-Luci in Bl/6 Albino- Mäusen.....	81
Abbildung 9: MHC-Klasse-I-spezifische extrazelluläre Färbung mittels FITC- markiertem anti-H2-Db Antikörper in der Durchflusszytometrie.	84
Abbildung 10: Zelluläre Luciferase-spezifische Immunantwort.....	85
Abbildung 11: AAV- und NP-spezifische Antikörper-Antworten in Mäusen, immunisiert mit AAV-NP oder AAV-leer.....	86
Abbildung 12: Immunisierung mit NP _{pdm09} (grün) oder NP _{PR8} (blau): CD8 ⁺ T-Zell Antworten (oben), Überlebensrate (mitte) und Gewichte (unten) im homologen Belastungsmodell.	88
Abbildung 13: Immunisierung mit AAV9-NP _{pdm09} : Überlebensrate (links) und Gewichte (rechts) nach heterologer Infektion mit Influenza H1N1 PR8.....	90
Abbildung 14: Immunisierung mit NP _{V371M} : CD8 ⁺ T-Zell Antworten (oben links), Überlebensrate (oben rechts) und Gewichte (unten links) nach letaler Belastung mit PR8. Unten links: Histopathologie von Schnitten der Lunge belasteter Tiere.	92
Abbildung 15: Immunisierung mit der Epitopkette: T-Zell-Antworten (oben links), Überlebensrate (oben rechts) und Gewichte (unten links) nach letaler Belastung mit PR8. Unten links: Histopathologie von Schnitten der Lunge belasteter Tiere.	94

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 16: Schema des Assays zur Ermittlung der Effizienz der CTLs mittels <i>in vivo</i> Imaging.....	96
Abbildung 17: Vorversuch des <i>in vivo</i> CTL-Assays. Detektion Luciferase-exprimierender MC57G Zellen <i>in vivo</i>	97
Abbildung 18: Vergleich der Funktionalität zytotoxischer T-Zellen, induziert von AAV-NP _{PR8} -immunisierten Mäusen oder AAV-leer-immunisierten Mäusen, anhand des <i>in vivo</i> CTL Assays.	98
Abbildung 19: Nutzung des <i>in vivo</i> CTL Assays zum Vergleich der Funktionalität zytotoxischer T-Zellen, induziert von Mäusen, immunisiert mit AAV-vermittelter Epitopkette oder AAV-leer.	98
Abbildung 20: Viruslast (A) und Korrelation mit Gewicht (B) drei Tage nach Infektion mit PR8 in Lungen immunisierter Mäuse.....	100
Abbildung 21: Anforderungen an einen breitenwirksamen Influenza-Impfstoff	115

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Enzyme.....	38
Tabelle 2: Kits.....	39
Tabelle 3: Oligonukleotide.....	39
Tabelle 4: Plasmide.....	40
Tabelle 5: Rekombinante Proteine und Peptide.....	41
Tabelle 6 Laborgeräte.....	41
Tabelle 7 Erworbene Chemikalien.....	43
Tabelle 8: Hergestellte Puffer und Lösungen.....	45
Tabelle 9: Zelllinien mit entsprechendem Wachstumsmedium.....	47
Tabelle 10: Antikörper.....	48
Tabelle 11 Antibiotika für Zellkultur- und Bakterienkulturmedien.....	49
Tabelle 12: <i>Pfu</i> -PCR Reaktionsansatz.....	55
Tabelle 13: <i>Pfu</i> -PCR Thermocycler Programm.....	55
Tabelle 14: Ligation Pipettierschema.....	56
Tabelle 15: Sequenzierreaktion: Pipettierschema.....	56
Tabelle 16: Sequenzierreaktion: Thermocycler Programm.....	57
Tabelle 17: TaqMan qPCR Pipettierschema für 25 µl-Ansatz.....	57
Tabelle 18: TaqMan qPCR Thermocycler Programm.....	58
Tabelle 19: Pipettierschema für vier 1,5 mm Gele.....	59
Tabelle 20: PEI-Transfektionsansatz für 1 l Suspensionszellkultur in Spinnerflasche ...	61
Tabelle 21: Zusammensetzung des Iodixanal-Gradienten und Volumina einzelner Lösungen in einem Ultrazentrifugations (UZ)-Röhrchen.....	62
Tabelle 22: 50 µl-Reaktionsansatz für DNase-Verdau.....	63
Tabelle 23: Alkoholreihe zur Dehydrierung und Einbettung der Lungen.....	68
Tabelle 24: Reagenzienreihe zur Rehydrierung und Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Schnitte. Anschließende Dehydrierung mittels Ethanolreihe, gefolgt von Intermedium zum Eindecken.....	69
Tabelle 25: Reagenzienreihe zur Rehydrierung der Schnitte vor Immunohistochemie	70
Tabelle 26: Vergleich innerhalb dieser Arbeit untersuchter, gängiger adhärenter Kultivierungsformate zur AAV Produktion mit Spinner Flaschen.....	74
Tabelle 27: Luciferase-spezifischer Antikörper und Luciferase-neutralisierende Antikörper nach Immunisierung mit AAV9-Luci.....	82

1 EINLEITUNG

1.1 DAS INFLUENZAVIRUS – AUFBAU UND REPLIKATION

Influzaviren gehören zur Familie der Orthomyxoviridae, welche umhüllte Viren mit einzelsträngiger, negativ-orientierter RNA sind. Da von den drei bestehenden Gattungen, Influenza A, B und C, vor allem Influenza A-Viren humanpathologisch relevant sind, beschränkt sich die Beschreibung von Struktur und Replikation hier allein auf diese Gattung. Wie in Abbildung 1 gezeigt, enthalten die kugeligen oder sphärisch ellipsoiden Partikel acht Gensegmente, welche für 16 Proteine kodieren. Das Glykoprotein Hämagglutinin (HA), Neuraminidase (NA), Matrixprotein 1 (M1) und Matrixprotein 2 (M2) sind strukturelle Proteine, die das Viruspartikel formen. M1 bildet eine Kapsidhülle, welche von einer Lipidmembran umgeben ist. M2 ist auf dem gleichen Gensegment wie M1 kodiert und bildet einen Ionenkanal, der in der Hülle des Virus verankert ist. Es wurde zudem ein Protein M42 identifiziert, das die Funktion von M2 übernehmen kann. Die Expression und tatsächliche Beteiligung an der Replikation sind für M42 jedoch noch nicht hinreichend aufgeklärt (1). HA und NA sind ebenfalls in der Hülle verankert, ragen jedoch deutlich als Spikes über die Virusoberfläche hinaus. Da sie M2 überdecken, sind sie im Zuge einer humoralen Immunreaktion Haupterkennungsregion von Antikörpern. Innerhalb des Kapsids befindet sich der Ribonukleoprotein-Komplex: das virale Genom ist an das Nukleoprotein (NP) gebunden, welches über ein Kernlokalisierungssignal den Transport in den Zellkern vermittelt. Daran sind außerdem die replikationsrelevanten Bestandteile der RNA-Polymerase PB1, PB2 und PA (B = basisch, A = sauer (engl. *acidic*)) gebunden. Ein nicht-strukturelles Genomsegment (N) kodiert für das Protein NS1, welches als Antagonist einer antiviralen Antwort dient, und das Protein NS2, welches nuklearen Export vermittelt. Weitere nicht-strukturelle Proteine sind PA-X, das die zelluläre Genexpression unterdrückt (1), PA-N155 und PA-N182 (2), welche beide wahrscheinlich eine Rolle während der Replikation spielen und das N40-Protein (3), dessen Funktion bis dato unklar ist (zusammenfassend dargestellt in (4)).

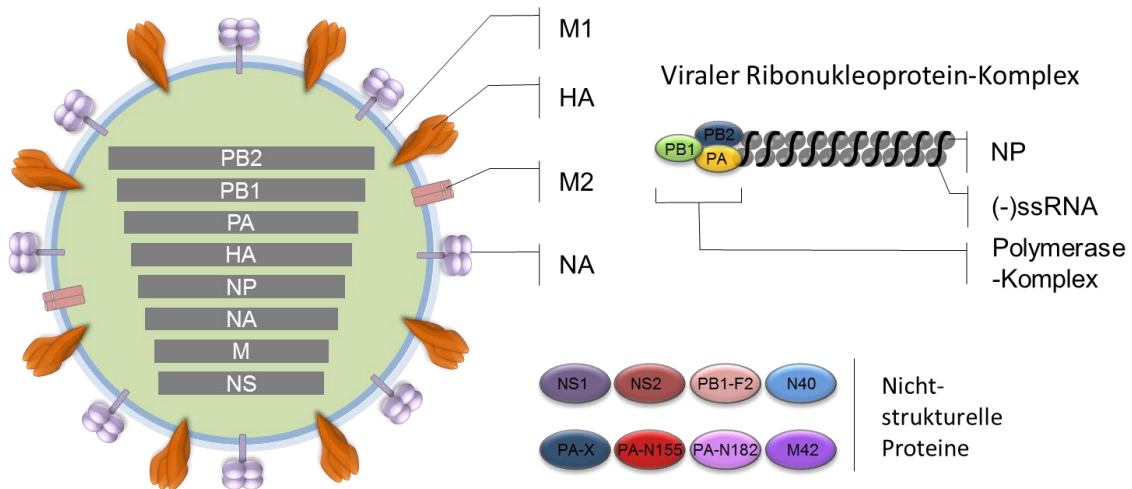


Abbildung 1: Struktur des Influenza A-Virus.

Das Viruspartikel wird von den drei Strukturproteinen Hämagglutinin (HA), Neuraminidase (NA) und Matrixprotein 1 (M1) gebildet. Der Ionenkanal, bestehend aus Matrixprotein M2, kann funktionell auch durch das Protein M42 ersetzt werden. Intern befindet sich der Ribonukleoprotein-Komplex, bestehend aus viralem Genom, dem RNA-bindenden Protein Nukleoprotein (NP) und den replikationsrelevanten Proteinen PB1, PB2 und PA. Nicht-strukturelle Proteine sind NS1 und NS2, die der Unterbindung einer zellulären viralen Abwehr und des nuklearen Exportes dienen. Weitere nicht-strukturelle Proteine sind das Apoptose-einleitende PB1-F2, sowie N40, PA-X, PA-N155, PA-N182, deren Funktionen nicht vollständig geklärt sind. P steht für Polymerase, B für basisch, A für sauer (engl. *acidic*). Modifiziert nach (4).

Der Kontakt zwischen Virus und Wirtszelle findet über HA statt, dessen Spikes an Sialinsäure auf der Oberfläche der Zellen bindet. Humane Influenzaviren binden bevorzugt α -2,6-verknüpfte Sialinsäure auf Epithelzellen des oberen respiratorischen Traktes, während aviäre Grippeviren primär an α -2,3-verknüpfter Sialinsäure binden. Diese sind im Menschen auf Zellen des unteren respiratorischen Trakt vorhanden (5,6). Die Expression beider Sialinsäuren in Schweinen erklärt die Sonderstellung der Tiere bei der Entstehung neuer Virus-Varianten. Im Schwein können Vogelgrippeviren und humane Grippeviren Zellen ko-infizieren und dabei durch Austausch der Gensegmente neue Subtypen bilden (Reassortment) (zusammenfassend dargestellt in (7)). Durch Rezeptor-vermittelte Endozytose wird das Virus in Endosomen aufgenommen, in denen ein geringer pH-Wert von 5-6 eine Konformationsänderung des HA's durch Protonierung der Untereinheit HA1 bewirkt. Dadurch löst sich die Untereinheit HA2 von HA1 ab und penetriert unter Bildung einer Verankerung die Wirtsmembran. In der Folgeaktion verkürzt sich das HA durch Umklappen. Durch

den daraus entstehenden direkten Kontakt der Virus- und Wirtsmembran können diese miteinander fusionieren (zusammenfassend dargestellt in (7,8)). Auch das M2-Protein spielt bei der Fusion eine entscheidene Rolle. Durch die saure Umgebung im Endosomen öffnet sich der M2-Ionenkanal und säuert das innere des Virions an. Dies fördert die Konformationsänderung des HA zur Fusion und ermöglicht die Freisetzung des Ribonukleoprotein-Komplexes in das Zytosol (9).

Der Import des Ribonukleoprotein-Komplexes erfolgt über Kernlokalisierungssignale. Jedes der Komplex-Proteine (NP, PB1, PB2 und PA) enthält solch ein Signal. Der Kern-Import erfolgt über den CRM1-abhängigen Weg, was zusammenfassend in (10) dargestellt ist.

Die negativ-orientierte Einzelstrang-RNA wird im Kern durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase, bestehend aus PB1, PB2 und PA, in positiv-orientierte RNA und mRNA umgeschrieben. Das Virus bedient sich bei der Synthese des komplementären Stranges und bei der Replikation des Virusgenoms diverser zellulärer Mechanismen. Beispielsweise wird virale mRNA der Gensegmente 7 und 8, welche mehrere Proteine kodieren, mittels zellulärem Spleiß-Apparat prozessiert. Gleichzeitig unterbindet NS1 das Spleißen zellulärer mRNAs (zusammenfassend dargestellt (11)). Die virale mRNA wird in das Zytosol exportiert, wo die frühe Translation der Proteine PB1, PB2, PA, NP, NS1 und PB1-F2 eingeleitet wird. Im Zellkern bilden sich daraufhin neue Ribonukleoprotein-Komplexe, die CRM1-abhängig wieder exportiert werden. NS2, M1, M2, HA und NA werden als späte Proteine synthetisiert. An der Membran des apikalen Bereichs der Wirtszelle kommt es schließlich zur Assemblierung der Viruspartikel unter Einschluss der Ribonukleoprotein-Komplexe (zusammenfassend dargestellt in (12)).

Ausschlaggebend für die starke Variabilität der Viren ist die hohe Fehlerrate der RNA-Polymerase, die bei Replikation zu Mutationen im Genom der Nachkommen führt (Antigendrift). Bleiben die neu assemblierten Viren infektiös und replikationskompetent, kann sich eine neue Driftvariante verbreiten. Zusätzlich können vollkommen neue Virusvarianten durch Antigen shift entstehen, was durch Austausch von Gensegmenten verschiedener Virusvarianten nach Ko-Infektion einer Zelle auftritt (Antigen shift). Da zu diesen neuen Varianten in der Regel keine

Grundimmunität in der Bevölkerung besteht, bergen diese Varianten pandemisches Potential.

1.2 EIN RÜCKBLICK AUF ÜBER 400 JAHRE INFLUENZA

Etymologisch geht die Bezeichnung Influenza (*ital.* Einfluss) auf die bis in das Mittelalter verbreitete Annahme zurück, eine Krankheit sei Ursache der

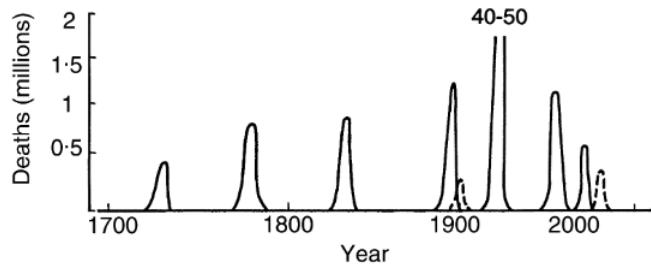


Abbildung 2: Historie der influenza-Pandemien von 1700 bis 2000. Übernommen von Potter (2001) (14).

Planetenkonstellationen (13). Der Ursprung der echten Grippe ist nicht datierbar. Erste Publikationen stammen aus dem Jahr 1650, wobei Berichte über

Ausbrüche weitaus früher zurückdatieren (14). Influenza-

Pandemien müssen zwei Kriterien erfüllen, um als solche spezifiziert werden zu können: Die Infektion breitet sich ausgehend von einer Region über den gesamten Globus aus. Auslöser einer Influenza-Pandemie ist eine neue Virusvariante, die beispielsweise durch den Austausch genetischen Materials zwischen verschiedenen Virusvarianten entsteht (Reassortment), was in hohen Übertragungsraten und rascher Verbreitung resultiert.



Abbildung 3: Militärkrankenhaus während der Spanischen Grippe in Camp Funston, Kansas, USA.

Original aus dem *National Museum of Health and Medicine*, USA (231).

Die erste wissenschaftlich belegte Pandemie ereignete sich im Jahr 1580. Sie entwickelte sich in Asien, breitete sich nach Afrika und schließlich auch nach Europa aus

(15). Potter (14) stellte zusammenfassend dar, dass belegte Influenza-Pandemien seit dem Jahr 1700 unvorhersehbar und in unregelmäßigen Abständen auftreten (siehe Abbildung 2). Als wohl gravierendste Pandemie kann die Spanische Grippe (siehe Abbildung 3) angeführt werden, der im Jahr 1918 weltweit 25 - 50 Millionen Menschen erlagen (16,17). Bis zum Ausbruch von HIV rankte diese Pandemie mit der ersten und zweiten Pest-Pandemie (Justianische Pest und Schwarzer Tod) auf den ersten drei

Plätzen der weltweit dramatischsten Krankheitsausbrüche in der Geschichte der Menschheit (14,18).

Trotz intensiver Forschung stellt das Grippevirus bis heute eine unkontrollierbare Gefahr dar. Epidemien treten zwar zyklisch planbar auf, können jedoch in ihrer Intensität nicht eingeschätzt werden (18). Pandemien können jederzeit auftreten. So appelliert David Nabarro, der Leiter einer der WHO untergeordneten Beratergruppe für Ausbrüche und Notfälle mit gesundheitsrelevanten und humanitären Konsequenzen (*Advisory Group on Reform of WHO's Work in Outbreaks and Emergencies with Health and Humanitarian Consequences*):

“Act as though a pandemic influenza will start tomorrow. Don't think we can wait around and not worry it won't start for six months or one year.

Once, it starts it is too late to prepare.”(19).

Nichtdestotrotz wurden auch auf die letzte Pandemie im Jahr 2009 keine ausreichenden Vorbereitungsmaßnahmen getroffen. Das Virus vom Subtyp A H1N1 verbreitete sich in 214 Nationen. Die WHO meldete noch im Jahr 2009 18.000 Influenza-bedingte Todesfälle (20,21). Spätere Schätzungen, die auch Fälle einbezogen, die nicht im Labor bestätigt oder aufgrund fehlender Zugangsmöglichkeiten zu medizinischen Einrichtungen schlichtweg nicht gemeldet wurden, gehen davon aus, dass die Pandemie bis zu 579.000 Opfer forderte (22,23). Die WHO warnt jedoch auch vor der Entwicklung von humanpathogenen Varianten der aviären Subtypen H5N1 und H7N9, welche bereits in wenigen Fällen in Asien zoonotisch auf den Menschen übergegangen sind (24). Vor allem der enge Kontakt zu Geflügel fördert die Entstehung dieser Varianten. Für den Fall einer H5N1-Pandemie wurde in den USA ein Impfstoff der Firma Sanofi Pasteur Inc. zugelassen und national bevorratet (25). Auch in der Europäischen Union wurde 2008 ein pandemischer Impfstoff zugelassen. Adjuvanrix wird von GlaxoSmithKline produziert, ist jedoch nicht kommerziell verfügbar (26). Da jedoch das Virus weiter mutiert, kann kein Schutz garantiert werden. Daher fordert und fördert die WHO innerhalb des GAP (engl. *Global Action Plan for Influenza Vaccines*) die Entwicklung neuer Impfstoffe, die schnell auf Nachfrage produzierbar sind und/oder breitenwirksam gegen verschiedene Subtypen schützen (27).

1.3 THERAPIE UND VORBEUGUNG EINER INFLUENZA-INFEKTION: DIE GESCHICHTE VON HASE UND IGEL

Die Behandlung einer bestehenden Influenza-Infektion beinhaltet direkte antivirale oder symptomatische Therapie. Die symptomatische Therapie ist bei Patienten, die nicht einer Risikogruppe angehören, in der Regel ausreichend. Dabei wird der Körper bei der Bekämpfung des Virus unterstützt, ohne dass unmittelbar selbst auf das Virus eingewirkt wird. Dazu können Analgetika, Antipyretika bei starker Temperaturerhöhung, Nasensprays und bei zusätzlichen bakteriellen Infektionen Antibiotika verabreicht werden. Besteht ein erhöhtes Risiko eines schweren Verlaufs, wird eine antivirale Therapie empfohlen. Außerdem sollte zur Absicherung der Diagnose eine spezifische Labordiagnostik mittels PCR, Antigennachweis mittels ELISA, Viruskultur oder Serologie zum Antikörpernachweis erwogen werden, woraufhin die Therapie entsprechend angepasst werden kann. Neben allgemeinen Standardhygienemaßnahmen wie Händewaschen stellt eine Impfung die effektivste präventive Maßnahme gegen Influenza dar (28).

1.3.1 ANTIVIRALE THERAPIE

Es gibt zwei Klassen von antiviralen Mitteln gegen Influenza. Die M2-Membranproteinhemmer Amantadin und Rimantadin blockieren den Membran-gebundenen Ionenkanal M2. Dies kann in der zulässigen Dosis jedoch ausschließlich bei Influenza A-Viren erreicht werden (29). M2-Hemmer werden in der Praxis nicht mehr angewendet, da die zirkulierenden Subtypen A H1N1 und H3N2 vollständig resistent gegen die Wirkstoffe sind (28). Die zweite Klasse der Neuraminidasehemmer umfasst Zanamivir und Oseltamivir. Die Wirkstoffe binden an die Neuraminidase, wodurch die Knospung des Virus inhibiert ist und das Virus sich nicht von der Zelle abschnüren kann (30). Durch die Mutation H275Y im Neuraminidase-Gen (31) entwickelten alle Viren des Subtyps H1N1 der Saison 2007/2008 und 2008/2009 eine Resistenz gegenüber Oseltamivir. Da jedoch die Variante H1N1 der Pandemie 2009 die saisonalen Subtypen vollständig verdrängte, gilt H1N1 wieder als suszeptibel gegenüber Oseltamivir. Gegen Zanamivir sind keine Resistenzen bekannt (28,32). Neuere Metaanalysen diverser Studien über Oseltamivir stellten keinen positiven Effekt auf die Anzahl oder Dauer der

Krankenhausaufenthalte, sowie die Wahrscheinlichkeit und Schwere einer Pneumonie fest und zweifelten zudem den Nutzen der Therapeutika gegenüber deren Risiken und Kosten an (30,33,34).

1.3.2 SAISONALE INFLUENZA-IMPfstOFFE

Die wirkungsvollste Art der Prävention ist die saisonale Grippeimpfung. Auf der nördlichen Hemisphäre, wo Influenza mit Beginn der kalten Jahreszeit auftritt, wird die Impfung empfohlen. In Deutschland sieht die Ständige Impfkommision (STIKO) eine Impfung für Risikogruppen wie Personen ab 60 Jahren, chronisch Kranke oder auch Personen mit erhöhtem beruflichem Risiko, wie beispielsweise Ärzte, vor (35). Eine Empfehlung der Zusammensetzung des saisonalen Impfstoffes wird jährlich von der WHO jeweils für die nördliche und die südliche Hemisphäre herausgegeben (36,37). Die Impfstoffe bestehen aus drei (TIV, engl. *trivalent influenza vaccine*) oder vier (QIV, engl. *quadrivalent influenza vaccine*) Influenza-Stämmen. QIV-Impfstoffe enthalten neben den zwei Influenza A-Subtypen (bislang H1N1 und H3N2) und einem B-Subtyp einen zweiten B-Subtyp. Die Auswahl der Impfstämme erfolgt dabei mehrere Monate vor der bevorstehenden Influenza-Saison. Für den Impfstoff der nördlichen Hemisphäre erfolgt die Bestimmung basierend auf immunologischer und genetischer Charakterisierung der zirkulierenden Viren der letzten Saison so schon im Februar - März (38). In Europa erklärt die Europäische Arzneimittel-Agentur (EMA, engl. *European Medicines Agency*) basierend auf der Aussage der WHO konkret, welche Stämme für die Produktion eines Impfstoffes verwendet werden sollten. In Deutschland prüft das Paul-Ehrlich-Institut die Impfstoffe und entscheidet über deren Zulassung (39). Neben gängigen Impfstoffen, die auf inaktivierten Viren basieren (Totimpfstoffe), wurden bereits 2003 in den USA und 2012 in Deutschland lebend-attenuierte Influenza-Viren (Lebendimpfstoffe) zugelassen, die intranasal als Nasenspray verabreicht werden (39). Im Vergleich zu Totimpfstoffen zeigten Lebendimpfstoffe bei Kindern und Jugendlichen, jedoch nicht bei Erwachsenen (40) eine bessere Schutzwirkung gegen eine diagnostizierte Influenza-Infektion (41–43). Die Attenuierung wird durch die Adaption an geringere (25 °C) oder höhere (38 - 39 °C) Temperaturen als der menschlichen Körpertemperatur erreicht. Dadurch beschränkt

sich die Replikation auf die oberen Atemwege des Impflings, was eine protektive lokale Immunantwort induziert (zusammenfassend dargestellt in (44)).

Die diversen Totimpfstoffe werden einerseits als virale Partikel produziert. Diese können RNA enthalten (WIV, engl. *whole inactivated virus*) oder ohne Genom als Virosomen synthetisiert werden, was jedoch mit einem Verlust der inherenten Immunogenität einhergeht (45). Die Inaktivierung erfolgt mit Hilfe von Chemikalien wie Formaldehyd. Andererseits werden auch Untereinheiten-Vakzine (engl. *subunit*) angeboten: *Split*-Vakzine umfassen dabei alle Komponenten eines Virus (externe und interne Proteine, als auch RNA), wobei *Subunit*-Vakzine nur die außenständigen Proteine HA und NA enthalten. Die Spaltung der Komponenten erfolgt nach Inaktivierung zusätzlich mit Hilfe von Tensiden. Heutzutage werden hauptsächlich *Split*- und *Subunit*-Vakzine verabreicht, da WIVs zu starken Nebenwirkungen neigten. Dies war hauptsächlich auf Verunreinigungen aus der Produktion zurückzuführen. Mit der Entwicklung reinerer *Subunit*-Vakzine wurden WIV nahezu vom Markt verdrängt (39). Heutige, moderne Produktionsmethoden ermöglichen jedoch die erneute Etablierung von weniger reaktiven WIVs (zusammenfassend dargestellt in (38)).

Produktionsplattformen

Die saisonalen Grippeimpfstoffe werden hauptsächlich in infizierten embryonalen Hühnereiern produziert. Die Europäische Union veranlasste 2007 die Zulassung eines *Subunit*-Vakzins, das in Zellkultur (MDCK-Zellen, engl. *Madin-Darby canine kidney*) hergestellt wird (Optaflu) (46). Die Produktion von Influenza-Impfstoffen in Zellkultur wird aufgrund zahlreicher Vorteile gegenüber der konventionellen Herstellung in Hühnereiern forciert: Personen, die allergisch gegen Hühnereiweiß reagieren, können dennoch geimpft werden. Die erforderliche Menge an Pathogen-freien Eiern würde im Falle einer Pandemie nicht genügen, um ausreichend Impfdosen für die Weltbevölkerung zu produzieren. Die Produktion in Zellkultur ist dagegen einfach skalierbar, automatisierbar und standardisierbar (46,47). Außerdem können nicht alle Influenza-Varianten effizient in Eiern replizieren. Zellen in Kultur bieten in diesem Fall mehr Möglichkeiten hohe Titer von Viren zu produzieren. Dazu können schnellwachsende Virusvarianten mittels reverser Genetik synthetisiert werden.

Erwähnenswert ist außerdem, dass Zellkultur-basierte Impfstoffe strukturell oder antigenetisch stärker den zirkulierenden Viren als den in Hühnereiern produzierten Viren ähneln. Weiterhin zeigen in Zellen produzierte Impfstoffe stärkere Kreuzreaktivität, während die Schutzwirkung nicht beeinträchtigt ist (zusammenfassend dargestellt in (48)). Des Weiteren besitzen zunehmend aviäre Varianten wie H5N1 pandemisches Potential. Diese Vogelgrippeviren können schlecht in Hühnereiern vermehrt werden, weshalb besonders die Entwicklung Zellkultur-basierter Systeme verfolgt wird (49,50). Präpandemische Impfstoffe, produziert in Zellkultur, sind bereits in der EU, den USA und Japan zugelassen (38).

Neben MDCK-Zellen werden außerdem Vero-Zellen zur Produktion von Influenza-Impfstoffen verwendet und weitere Zelllinien als Produzenten gesucht. Dazu gehören humane embryonale Zellen der Retina (PER.C6), oder auch die embryonale Zelllinie AGE1.CR aus der Retina der Moschusente (zusammenfassend dargestellt in (38,48,51)).

Aktivierung einer Antikörper-Antwort

Allen Formulierungen der saisonalen Grippeimpfstoffe gemein ist, dass sie auf die Induktion einer humoralen Immunantwort gegen das Hämagglutinin abzielen. Der Schutz bei Exposition gegenüber Influenza korreliert dabei mit dem HI-Titer einer Serumprobe. Der HI-Titer wird anhand des Hämagglutinationshemmtests (HI, engl. *heamagglutinin inhibition*) bestimmt. Der Test beruht auf der Reaktion der Influenzaviren mit der Sialinsäure auf der Oberfläche roter Blutzellen. Bindet das Virus an die Zellen, verhindert es durch deren Quervernetzung das Absinken der Zellen. Stattdessen bildet sich ein flächiger Niederschlag (Hämagglutination). Sind in einer Serumprobe, die dem Test beigefügt wird, jedoch Hämagglutinin-spezifische Antikörper vorhanden, blockieren sie die Quervernetzung der Blutzellen. Es kommt wiederum zum Absinken der Zellen. Nach erfolgreicher Impfung blockieren HA-spezifische Antikörper das Virus und verhindern so ein Eindringen des Virus in die Zielzellen. Ein HI-Titer von 40, also die höchste Verdünnung des Serums, die die Hämagglutination verhindert, korreliert bei Erwachsenen mit einer Reduktion des Risikos eine Influenza-Infektion zu erhalten um 50 % (52–54). Die determinierten HA-spezifischen Antikörper richten sich dabei sehr spezifisch nur gegen das HA des getesteten Stammes. Kleinste Abweichungen der zirkulierenden Stämme während der

Grippezeitung zu dem HA des Impfstammes verhindern die Interaktion der Antikörper mit dem Virus. Tatsächlich mutieren jedoch gerade die Gene des Hämagglutinins sehr schnell (siehe Seite 13), was zu einer Diskrepanz zwischen induzierter HA-spezifischer Antikörperantwort durch Impfung und infektiösem Virus führt. Durch diese Fehlanpassung reduziert sich die Effektivität der saisonalen Grippezeitung stark. Die Effektivität umfasste so in den USA zwischen 2004 und 2016 eine Spanne von 10 % bis 60 % (55,56). Dem Bericht der Arbeitsgemeinschaft Influenza des Robert Koch-Instituts zufolge führte eine deutliche Heterogenität der zirkulierenden Stämme zu den Impfstämmen auch in Deutschland zuletzt in der Saison 2012/13 und 2014/15 zu einer erhöhten Exzess-Mortalität (57). Dies unterstreicht, dass die Entwicklung wirkungsvoller saisonaler Grippezeitung intensiviert werden sollte. Eine alleinige Antikörperantwort gegen das HA reicht demnach nicht aus, um zuverlässig gegen veränderte oder neuartige Virustypen zu schützen. Die Forschung und Industrie fokussiert sich daher auf eine neue Generation Subtyp- oder HA-unabhängiger Impfstoffe.

1.3.3 PANDEMISCHE INFLUENZA-IMPfstOFFE

Vögel sind die Wirte und folglich das natürliche Reservoir aller Influenza A-Subtypen. Der Subtyp H5N1 kann jedoch sporadisch auch auf den Menschen übertragen werden, was in 60 % der Fälle zum Tod führt (58). Seit 2003 meldete die WHO hunderte Todesfälle durch H5N1, wobei die Infizierten in den meisten Fällen direkten Kontakt mit infiziertem Geflügel hatten. Wenige Fälle einer Übertragung von Mensch zu Mensch sind dennoch bekannt und weitere Übertragungen können nicht ausgeschlossen werden (59). Da von der Zoonose H5N1 also ein pandemisches Potential ausgeht, ordnete die WHO 2006 dem Erreger die Pandemie-Warnstufe 3 (Alarmphase) zu. Demnach besteht das Risiko, dass das Virus als Folge von Mutation oder Reassortmentierung (beispielsweise mit H1N1) von Mensch zu Mensch übertragbar werden könnte (60). Auch für H9N2, H7N7, H10N7 (61) und kürzlich H7N9 (2013) (62) konnte direkte Transmission von Vögeln auf Menschen nachgewiesen werden. Die Gefahr einer Pandemie ausgehend von zoonotischen Subtypen wie H5N1 ist demnach als hoch einzuschätzen. Das Fehlen einer Grundimmunität in der Bevölkerung gegen diese Stämme erfordert die Entwicklung

von Impfstoffen, die bei Ausbruch mittels neuer Technologien, unabhängig von der Produktion in Hühnereiern, schnell einer großen Population zur Verfügung gestellt werden können. Des Weiteren evolviert das HA permanent, was wieder zu der Diskrepanz zwischen konventionellen Impfstoffen und potentiell pandemischem Virus führt. Dennoch konzentrierte sich die Forschung zunächst auf die Entwicklung H5-spezifischer pandemischer Impfstoffe.

Inaktivierte Split- oder Subunit-Vakzine

Aus Versuchen mit inaktiviertem H5-Virus oder rekombinanten H5 wurde ersichtlich, dass diese Art Impfstoff verglichen zu humanen Subtypen nur schwach immunogen ist (zusammenfassend dargestellt in (61)). Den meisten inaktivierten pandemischen Impfstoffen muss daher ein Adjuvans zugesetzt werden. Verwendet wird Aluminiumhydroxid oder Aluminiumphosphat, kurz Alum, was über eine Verlängerung der Absorption des Antigens im Körper und eine Rekrutierung von Antigen-präsentierenden Zellen die Immunogenität verstärkt. Alum wird bei diversen Impfstoffen eingesetzt. Ein weiteres zugelassenes Adjuvans ist MF59, eine Öl-in-Wasser-Emulsion, das Makrophagen zur Injektionsstelle akquiriert und die Produktion von Chemokinen fördert. Dem pandemischen H1N1-Impfstoff von 2009 wurde AS03 zugesetzt, welches ebenfalls die Synthese von Chemokinen und Zytokinen veranlasst und zusätzlich Zellen der angeborenen Immunantwort rekrutiert. Während Alum in klinischen Studien keine positiven Effekte auf die Immunogenität von pandemischen inaktivierten *Split-* oder *Subunit-*Vakzinen zeigte, verbesserte MF59 und AS03 die Stärke der HI-Titer und induzierte neutralisierende Antikörper gegen den Impfstamm sowie kreuzreaktive Antikörper gegen heterologe H5N1-Stämme (zusammenfassend dargestellt in (63)).

Inaktivierte Vollvirus-Vakzine (WIV)

Der Vorteil von Vollvirus-Impfstoffen gegenüber *Split-*Vakzinen ist, dass antigenetische Struktur vollständig erhalten bleibt. In Hühnereiern als auch in Zellkultur generierte WIVs wurden klinisch getestet. Die untersuchten Impfstoff-Kandidaten erfüllten die Kriterien an den HI-Titer und induzierten außerdem B-Gedächtniszellen und kreuzreaktive CD4⁺ T-Zellen. Eine zweite

Immunisierung (Prime/Boost-Strategie) konnte die Dauer der Immunantwort verlängern. Die Zugabe des Adjuvans Alum führte zu einer Steigerung der Anzahl der Probanden mit protektivem HI-Titer. Neuere Technologien nutzen zudem reverse Genetik zur Optimierung der Impfstämme durch die Kombination der internen Proteine humaner Varianten mit denen der aviären Subtypen. So vereinen sie die Antigene der aviären Stämme mit den Replikationseigenschaften der etablierten humanen Viren (38,61,63).

Bei erwachsenen und älteren Probanden waren die Impfstoffe gegenüber den Split-Vakzinen hinsichtlich der Stärke der Immunantwort überlegen und gut verträglich, doch bei Kindern kann es durch WIV zu unerwünschten Nebenwirkungen wie Fieber kommen (63,64).

Attenuierte Lebendimpfstoffe

Die Entwicklung attenuierter H5N1-Viren als pandemische Impfstoffe birgt Nachteile (zusammenfassend dargestellt in (63)). Die H5N1-Viren wirken schädlich auf Hühnereier, was die Produktion beeinträchtigen kann. Außerdem ist die Verträglichkeit nicht in allen Altersgruppen erwiesen, sodass die Impfstoffe nur in bestimmten Populationen anwendbar sind. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass die abgeschwächten Viren auf andere Menschen übertragen werden. Zusätzlich besteht bei intakten Viren die Möglichkeit der Ko-Infektion mit pathogenen Influenzaviren, was zur Ausbildung neuer Reassortanten führen könnte. Dennoch sind die Impfstoffe attraktiv, da sie durch die natürliche Infektion und Replikation im oberen respiratorischen Trakt zusätzlich zu der humoralen systemischen Immunantwort auch eine mukosale Immunantwort (IgA) und eine zelluläre Immunität hervorrufen.

So wurde diese Art der Impfstoffe durch die Reassortierung der HA- und NA-Gensegmente von H5-Viren mit den restlichen Gensegmenten humaner Virusvarianten erzeugt, was in verbesserter Replikation in Hühnereiern oder Zellkultur sowie erhöhter Immunität in Patienten resultierte. Dennoch besteht die Gefahr einer Kreuzung der Impfviren mit pandemischen Viren, weshalb modernere, weniger Risiko-behaftete Systeme untersucht werden (zusammenfassend dargestellt in (63)).

In Deutschland zugelassene präpandemische (gegen H1N1 und H5N1) und pandemische (gegen H1N1) Impfstoffe sind daher *Split*- oder *Subunit*-Vakzine oder WIV, die meist ein Adjuvans enthalten (65,66).

Rekombinante Proteine, VLPs, DNA-Vakzine

Rekombinant produziertes HA (rHA) wurde als immunogen und sicher in Studien zu saisonalen Grippe-Impfstoffen bewertet. Die Proteine werden bevorzugt mittels Baculoviren in Insektenzellen in großen Mengen synthetisiert. Mittels Baculoviren produziertes rH5 induzierte innerhalb einer klinischen Studie funktionale Antikörper und nach Prime-Boost-Immunisierung eine lang anhaltende Immunantwort (67).

Virusartige Partikel (VLP, engl. *virus like particles*) wurden als Influenza-Impfstoffe mittels Baculoviren in Insektenzellen hergestellt. Die rekombinanten Proteine HA, NA, M1 assemblieren eigenständig unter der Bildung von Viruspartikeln (68,69). Auch M2 wurde mit eingesetzt (70). Diese Systeme zeigten im Tiermodell vielversprechende Resultate. In einer klinischen Studie wurde die Sicherheit eines VLPs als pandemisches Vakzin im Menschen bewiesen, löste jedoch nur moderate Immunantworten aus (71).

Eine Alternative zur Protein-basierten Immunisierung stellt die DNA-Immunisierung dar. Dabei wird Antigen-kodierende DNA direkt intramuskulär oder intradermal appliziert. Dies führt in den Zellen lokal zur Expression des Antigens, woraufhin MHC-abhängige Prozessierung und Präsentation des Antigens an CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten folgt. Der Vorteil dieser Art der Immunisierung ist in der Sicherheit gegenüber Lebendimpfstoffen und in der sehr einfachen und schnellen Produktion (in *Escherichia coli*) begründet (72). Anfänglich war eine geringe Immunogenität ein Problem von DNA Vakzinen (73,74). Schnell wurden jedoch optimierte Plasmide und Transgene entwickelt, die zu einer stärkeren Transgenexpression führten. Alternative Applikationsrouten oder die Zugabe von Adjuvantien unterstützt die Aufnahme der DNA in die Zielzellen. Des Weiteren wird durch Zugabe von genetischen (Plasmid)-Adjuvantien die Expression von Zytokinen, Chemokinen oder anderen kostimulierenden Molekülen induziert, was die Immunogenität von DNA-Vakzinen verbessert (73,75–78). Die Art der Prozessierung und Präsentation hat den positiven Nebeneffekt, dass mittels Prime/Boost-Immunisierung kreuzreaktive Antikörper

induziert werden können. In einer ersten klinischen Studie zu pandemischen DNA-basierten Impfstoffen wurden nach Verabreichung von adjuvantierter H5-kodierender DNA in Abhängigkeit von Dosis und Art der Verabreichung protektive HI-Titer ermittelt (79). Interessanterweise wurde beobachtet, dass die HA-basierte DNA-Immunsierung als Prime-Immunsierung in Kombination mit inaktiviertem *Subunit*-Vakzin die Stärke der Immunantwort deutlich steigern konnte (80). DNA-basierte Methoden werden daher zur Verbesserung der Qualität Protein-basierter pandemischer Impfstoffe detaillierter untersucht (63).

Vektor-basierte pandemische Impfstoffe

Mittels apathogener oder modifizierter Viren können beliebige Influenza-Gene in Zielzellen eingebracht werden. Der Vorteil gegenüber DNA-Immunsierung ist, dass auf die Zugabe ko-stimulierender Moleküle oder Adjuvantien vollständig verzichtet werden kann (81). Vektoren können wie DNA-Vakzine gegenüber konventionellen Impfstoffen jedoch sehr viel schneller und skalierbarer hergestellt werden. Wie auch Lebendimpfstoffe können Vektor-basierte Impfstoffe sowohl Antikörper-Antworten als auch eine zelluläre (CD4⁺, CD8⁺) Immunität auslösen. Wie von de Vries und Rimmelzwaan zusammengefasst, wurden im Tiermodell diverse Vektoren für den Transfer des HA aviärer Varianten untersucht (81). Dazu zählen die von den Pockenviren abgeleiteten MVA-Vektoren (engl. *modified vaccinia virus Ankara*), welche auch vielversprechende Ergebnisse in Primaten erzielten (82) und daraufhin in einer klinischen Studie der Phase 1/2a auch am Menschen getestet wurden. MVA-H5 induzierte neutralisierende Antikörper gegen homologe und heterologe H5N1 und H5N8-Viren (83,84). Im Fokus der Forschung stehen auch Adenovirale Vektoren (Ad). Ein Adenoviraler Vektor, der das H5 kodiert, führte in einer klinischen Studie als Prime-Immunsierung zur Steigerung der Immunogenität eines inaktivierten H5N1-Impfstoffes (85). Ein zu überwindender Nachteil von Adenoviren ist seine starke intrinsische Immunogenität, die zu unerwünschten Nebenwirkungen führen kann (81). Außerdem ist eine hohe Anzahl der Bevölkerung (~80 %) aufgrund der natürlichen Infektion seropositiv für Adenovirus (86–91). Für Vektoren, die auf humane Adenoviren basieren, besteht daher das Risiko der Neutralisierung durch präexistierende Antikörper, einhergehend mit deutlicher Reduktion oder gänzlicher

Verhinderung der Transgenexpression. Alternative nicht-humane Adenoviren werden als Alternative untersucht (92–95).

Ein effektiver Schutz gegen unvorhergesehene Virus-Varianten kann jedoch nur mittels kreuzreaktiver oder breitenwirksamer, d.h. Subtyp-übergreifender Impfstoffe gewährleistet werden. Virale Vektoren bieten über HA-basierte (monovalente) Impfstoffe hinaus eine große Fülle an Möglichkeiten multivalente Vakzine zu synthetisieren, da die Gensequenzen beliebig kombiniert werden können.

1.3.4 BREITENWIRKSAME ODER UNIVERSELLE INFLUENZA-IMPfstOFFE

Da das Hämagglutinin permanent mutiert und so dem durch neutralisierende Antikörper vermittelten Immundruck ausweichen kann, ist die Basis einer breitenwirksamen Immunantwort die Aktivierung einer zellulären Reaktion gegen konservierte, weniger schnell evolvierende Virus-Proteine wie dem Nukleoprotein oder M1 (96,97). Wie oben beschrieben, fordert und fördert die WHO die Entwicklung eines universellen Influenza-Impfstoffes, um im Falle einer Pandemie schnell handlungsfähig zu sein. Angestrebt sei die Zulassung von mindestens einem universellen Influenza-Impfstoff bis 2020. Experten und WHO-Verantwortliche erachten das Erreichen dieses Ziels jedoch als kritisch (98). Einigkeit herrscht auch nicht darüber, anhand welcher Parameter die protektive Wirkung eines solchen Impfstoffes ermittelt werden soll. Da universelle Impfstoffe nicht wie bei HA-basierten Vakzinen über neutralisierende Antikörper sondern durch eine komplexere Immunantwort schützen sollen, müssen die Verfahren zur Ermittlung einer protektiven Wirkung, also die mit dem Schutz korrelierenden immunologischen Parameter (COP, engl. *correlates of protection*), überarbeitet werden.

Ansätze für breitenwirksame oder universelle Impfstoffe sehen unter anderem die Induktion von Antikörpern, spezifisch gegen die Ektodomäne des M2 Proteins (M2e), vor. Studien belegen einen kreuzreaktiven, protektiven Effekt durch M2e-induzierte Antikörper-vermittelte Zytotoxizität, Komplement-vermittelte Zytotoxizität und Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Phagozytose (99–102). Auch NA-spezifische Antikörper können die Replikation des Virus inhibieren (98,103). Assays zur Ermittlung M2e- und NA-spezifischer Antikörper wurden entwickelt, müssen jedoch

noch bezüglich der Korrelation mit einer Schutzwirkung getestet werden. Zusätzlich zu einer systematischen Immunantwort im Serum (Serum IgG) soll zukünftig auch die mukosale Immunität (IgA) im respiratorischen Trakt ermittelt und die Befähigung als COP erörtert werden.

Von Interesse ist auch Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität (ADCC, engl. *antibody dependent cellular cytotoxicity*), über die infizierte Zellen zerstört und Chemokine und Zytokine akquiriert werden können. Es ist jedoch unklar, wie Impfstoffe modifiziert werden müssen, um gezielt diese Art der Immunreaktion auszulösen und wie ADCC mit einem protektiven Effekt korreliert. Gezeigt werden konnte bisher, dass ADCC während der Grippepandemie 2009 (H1N1pdm09) eine Rolle bei dem Schutz von älteren Menschen, die bereits einmal mit einer pandemischen H1N1-Variante in Kontakt gekommen waren, spielte (104).

Ein rekombinanter Impfstoffkandidat M-001 (Multimeric-001, Biondavax, Israel), der aus konservierten Peptiden der Proteine HA (Stammregion), M1 und NP besteht zeigt vielversprechende Ergebnisse in Tierversuchen und klinischen Studien. Der Impfstoff ist genauer zusammengesetzt aus Triplikaten linearer Epitope der drei Proteine, die zu einem Protein zusammengefasst sind. Das Protein wird linear in *E. coli* synthetisiert. In klinischen Studien der Phase 1 und 2 zeigte der Impfstoff keine oder nur milde, transiente Nebenwirkungen und wurde folglich als sicher eingestuft. Bezüglich der Immunogenität wurde das Protein nach alleiniger Verabreichung oder als Prime-Immunsierung in Kombination mit TIV getestet. Nach alleiniger Injektion von adjuvantiertem M-001 konnten Steigerungen des Serum IgG-Titers und die Induktion einer zellulären Immunantwort nachgewiesen werden. In Kombination mit TIV (H1N1, H3N2 oder Influenza B) konnte M-001 eine deutliche Erhöhung der HI-Titer und eine Steigerung der Anzahl von Probanden mit protektivem HI-Titer bewirken und außerdem die Reaktivität gegenüber evolvierenden Stämmen erweitern. Dies unterstreicht, dass dieser Impfstoffkandidat als Prime-Immunsierung vor einer Pandemie zur Verbesserung der Stärke und Kreuzreaktivität HA-spezifischer Impfstoffe dienen kann (105,106).

Ein weiterer Ansatz verfolgt die Entwicklung replikations-inkompetenter Influenzaviren als Lebendimpfstoffe, die Zellen transduzieren können, so eine

natürliche Infektion vortäuschen, jedoch nicht streuen können. Replikationsrelevante Proteine der Viren werden dabei durch reverse Genetik deletiert oder funktionell beeinträchtigt. Das verhindert eine mögliche Übertragung auf andere Menschen und mindert das Risiko der Entstehung und Verbreitung von Reassortanten aus Impfvirus und pandemischem oder zirkulierendem Virus (107,108).

Ein großer Forschungszweig konzentriert sich auf die Induktion kreuzreaktiver T-Zellen durch konservierte Proteine. T-Zell-Antworten können mittels ELISpot Assay oder genauer durch die Bestimmung von Zytokin-Profilen (Intrazelluläre Zytokinfärbung) von aktivierten T-Zellen bestimmt werden. Unklar ist jedoch noch, wie eine protektive Wirkung mit der T-Zell-Antwort korreliert (109). Da die Proteine von der zellulären Maschinerie prozessiert und über MHC-Moleküle auf der Oberfläche präsentiert werden müssen, werden Ansätze verfolgt, bei denen die Antigene mittels viraler Vektoren oder Plasmiden (DNA-Vakzine) übertragen werden.

Das Unternehmen SEEK (London, Großbritannien) entwickelte einen rekombinanten Impfstoff, der aus einer Mischung aus Epitopen besteht. FLU-v enthält vier Polypeptide, welche konservierte CD8⁺ T-Zell Epitope der Proteine M1, NP (Influenza A), NP (Influenza B) und M2 enthalten. Im Tierversuch induzierte FLU-v kreuzreaktive CD8⁺ T-Zell-Antworten gegen H1N1, H3N3 und einen Influenza B-Stamm (110). In einer klinischen Studie Phase 1 wurde die Sicherheit nach Verabreichung des adjuvantierten Impfstoffes festgestellt. Bei Gabe einer hohen Dosis konnte bei allen Studienteilnehmern eine zelluläre Immunantwort detektiert werden (111). In der klinische Phase 1b-Studie korrelierte die Immunisierung mit reduzierten Symptomen und geschwächter Streuung eines Belastungsvirus des Subtyps H3N2 (112). FLU-v gilt daher als potentieller breitenwirksamer Impfstoffkandidat. Die klinische Studie der Phase 2 begann im Juli 2016 (113).

Wie bereits illustriert (siehe Seite 24) werden verschiedene Vektoren wie Adenovirale Vektoren, MVAs, modifizierte Herpesviren oder Alphaviren, untersucht. Insbesondere die Entwicklung MVA- und Adenovirus-basierter Impfstoffe wird forciert (114). In Tierversuchen konnten MVA-kodiertes HA und NP in Abhängigkeit der Vakzinierungsstrategie (Prime-Boost) und der Art der Verabreichung (intramuskulär, intranasal, intradermal) protektive Immunantworten auslösen (115,116). In Makaken

reduzierte ein MVA-HA+NP die Vermehrung des Virus. Großen Einfluss hatte dabei die Induktion von ADCC (117). Ein simianer Adenoviraler Vektor (ChAdOx1), welcher die Proteine M1 und NP kodiert, löste in einer klinischen Phase 1 Studie Dosis-abhängige T-Zell Antworten aus. Der Vektor hat den Vorteil, dass in der menschlichen Bevölkerung keine Antikörper aufgrund eines vorherigen Kontakt zu humanen Adenoviren auftreten (118). Hessel *et al.* führen Mausexperimente mit einem MVA-basierten Impfstoff, der konservierte Proteine kodiert, durch. Den Ergebnissen zufolge spielte das NP eine entscheidene Rolle bei der Vermittlung einer breitenreaktiven Immunität gegen die Stämme H5N1, H9N2 und H7N1, da es auch als alleiniges Antigen (monovalent) anders als die anderen untersuchten Proteine eine protektive Wirkung zeigte (119).

In der Gentherapie werden Adenovirus-assoziierte Viren (AAV) für die Übertragung von Nukleinsäuren verwendet. Diese Viren bedeuten auch für die Entwicklung universeller Influenza-Impfstoffe ein großes Potential und wurden aus diesem Grund als Vektorsystem für die hier vorliegende Arbeit ausgewählt. Sie sollen daher näher diskutiert werden.

1.4 ADENOVIRUS-ASSOZIIERTE VIREN ALS HOFFNUNGSTRÄGER DER GENTHERAPIE

Adeno-assoziierte Viren (AAVs) wurden im Zuge gentherapeutischer Studien und Anwendungen gut charakterisiert und sind zunehmend auch für die Übertragung eines Antigens bei Immunisierungen interessant. Die Entwicklung und Vorteile der AAVs sollen im Folgenden dargestellt werden.

1.4.1 STRUKTUR UND REPLIKATION ADENOVIRUS-ASSOZIIERTER VIREN

Adenovirus-assoziierte Viren wurden erstmals als Kontamination einer Adenovirus-Präparation in den 1960er Jahren entdeckt (120,121). Sie wurden bald darauf als Dependovirus beschrieben. AAVs sind ohne die Helferfunktionen von Herpesviren oder Adenoviren in eukaryotischen Zellen nicht replikations-kompetent. Die Arbeit von Neil Blacklow zeigte, dass sich die Viren zwar im Menschen verbreiten, jedoch nicht mit einer Krankheit assoziiert sind (122). Die nicht-umhüllten Viren sind mit etwa 20 nm sehr klein und bilden ikosaedrische Viruspartikel. Das Genom ist ein entweder positiv oder negativ orientierter DNA-Einzelstrang mit einer Länge von ca. 4,7 kb (123). An den Enden befinden sich repetitive Sequenzen, ITRs (engl. *inverted terminal repeats*), innerhalb derer sich die zwei offenen Leserahmen *rep* und *cap* befinden. Die Region *rep* kodiert für die Replikations-relevanten, nicht-strukturellen Proteine Rep78, Rep68, Rep52 und Rep40. Die drei Kapsidproteine VP1 (87 kDa), VP2 (72 kDa) und VP3 (62 kDa) werden von überlappenden Sequenzen in *cap* kodiert. Die Transkription aller drei Kapsid-Proteine startet von einem Promoter p40. Alternatives Spleißen führt zur Entstehung mehrerer mRNA-Varianten und so zur Translation der drei Kapsidproteine. Die ITRs bilden eine Schleife, welche die Synthese des komplementären DNA-Strangs ohne Primer ermöglicht (engl. *self-priming*). Bei Wildtyp-AAVs vermitteln die ITRs die Integration der Virus-DNA in das Wirtsgenom. Außerdem sind sie essentiell an der Verpackung und Virusassemblierung beteiligt (zusammenfassend dargestellt in (124,125)).

Über 100 verschiedene AAV-Serotypen wurden bislang aus Menschen oder Primaten isoliert. Abhängig vom Serotyp sind die viralen Rezeptoren und folglich der Zelltropismus. Zuerst wurden Heparansulfat als primärer Rezeptor und FGFR1 (engl.

fibroblast growth factor receptor 1) als sekundärer Rezeptor von AAV2 identifiziert (126). Weitere primäre Rezeptoren anderer Serotypen sind O- und N-verknüpfte Sialinsäure und N-verknüpfte Galaktose. HGFR (engl. *hepatocyte growth factor receptor*), PDGFR (engl. *beta-type platelet-derived growth factor receptor*), EGFR (engl. *epidermal growth factor receptor*), Integrine, CD9 und LamR (Laminin-Rezeptor) wurden zudem als sekundäre Rezeptoren verschiedener Isolate bestimmt (127). Nach Binden des Virus an die Zellmembran werden AAVs über Endozytose in die Zelle aufgenommen. Durch die geringfügig saure Umgebung im Endosom werden die Partikel frei und akkumulieren perinukleär, um schließlich durch die Kernpore in den Nukleus zu penetrieren (126).

Das Genom der Wildtypen kann extrachromosomal vorliegen oder in Chromosom 19 integrieren (128). Für die Replikation sind die Adenoviralen Proteine E1A, E2A, E4 und VA-RNA, Proteine der Helferviren Herpes-simplex-Virus 1 oder Humanes Cytomegalievirus notwendig. Ohne Helfervirus verbleibt das AAV Genom latent im Zellkern (zusammenfassend dargestellt in (129,130)).

1.4.2 ETABLIERUNG VON AAVS ALS VIRALE VEKTOREN IN DER GENTHERAPIE

Primärer Antrieb der Entwicklung gentherapeutischer Mittel ist die Behandlung monogener Erkrankungen durch Einfügen von Nukleinsäuren, was zur Synthese fehlender oder defekter Proteine führt. Im Jahr 1990 wurde erstmals Gentherapie an einem Menschen zur Behandlung eines schweren kombinierten Immundefekts (SCID) eingesetzt (131). Bis 2012 wurden seitdem über 1800 klinische Studien durchgeführt (132).

Zum Gentransfer werden unter anderem virale Vektoren eingesetzt, welche *in vivo* das Transgen in die Zielzellen einschleusen. Nachdem Adenovirale Vektoren in mehreren Studien an Patienten zu schweren, tödlich verlaufenden Komplikationen führten, welche jedoch laut Studienleitung auf die Erkrankung selbst zurückzuführen waren, wurde die Entwicklung wieder verstärkt auf sichere Alternativen zu Adenoviren gelenkt (zusammenfassend dargestellt in (133,134)). Onkolytische Adenoviren wurden als weltweit erstes Gentherapeutikum in China zur Behandlung von Plattenepithelkarzinomen zugelassen (rAd-p53, (135,136)).

Nachdem grundlegende Kenntnisse zu Genomstruktur und Replikationszyklus erlangt wurden, konnten in den frühen 1980er Jahren erstmals infektiöse Molekularklone des AAV Serotyp 2 generiert werden. Dies ermöglichte die Aufklärung der Gensequenzen und die Entwicklung von AAV-Vektoren mittels *in trans*-Systemen (137,138). Nach entscheidenden Verbesserungen der AAV2-basierten Vektoren, fand 1995 die erste Evaluation *in vivo* und die erste klinische Studie statt (139). In den folgenden zehn Jahren intensivierte sich das Interesse an AAV-basiertem Gentransfer. Entscheidender Vorteil ist, dass AAVs gegenüber anderer Systeme mit keiner Krankheit assoziiert sind, *in trans* produziert replikations-inkompetent sind und sie somit in der Anwendung im Menschen als sicher gelten (129).

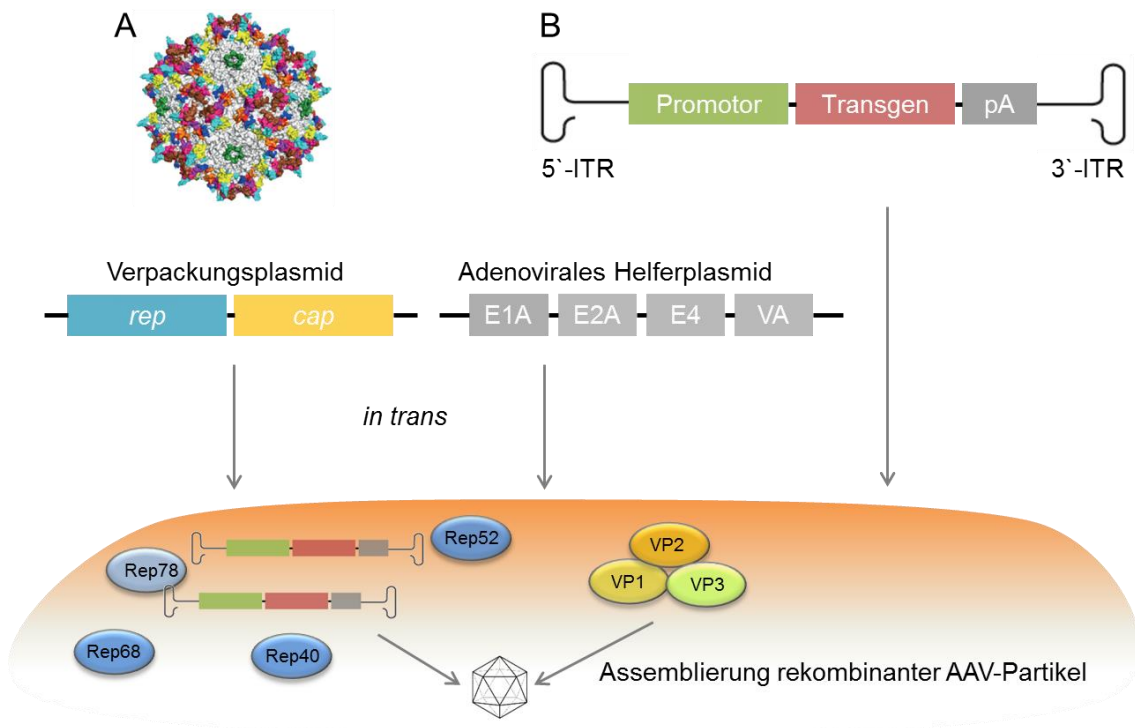


Abbildung 4: AAV-Struktur und Synthese rekombinanter Partikel

Kristall-Struktur eines AAV-Partikels mit farblich markierten hypervariablen Regionen des VP3 (A). Zur Generierung rekombinanter Partikel ersetzen Promotor, Transgen und pA die Elemente *rep* und *cap* zwischen den ITRs. Verpackungsproteine und Adenovirale Helferproteine werden auf gesonderten Plasmiden *in trans* hinzugefügt. In der Zelle dienen Rep78, Rep68, Rep54 und Rep40 dienen der Replikation und Verpackung des Genoms in das Kapsid, bestehend aus VP1, VP2 und VP3 (B). pA = Poly(A)-Schwanz. Modifiziert nach (134).

Zur Erzeugung AAV-basierter Vektoren ersetzt das Gen von Interesse (Transgen) die kodierenden Bereiche *rep* und *cap* des AAV-Genoms (140–142). Diese werden auf Verpackungsplasmiden kodiert. Die Adenoviralen Helferproteine E1, E2, E4 und VA-RNA werden ebenfalls auf Plasmid kodiert. Verpackungsproteine und Helferproteine werden zusammen mit dem AAV-Genom *in trans* in Zielzellen übertragen. Dies geschieht in der Regel durch Transfektion einer Zellkultur. In dieser Produktions-Zelllinie werden AAV-Partikel generiert, die jeweils einen Einzelstrang des Transgen-kodierenden Genoms enthalten. Die Partikel können Zellen transduzieren, sind jedoch Replikations-inkompetent, da weder Replikations-relevante Proteine noch Kapsid-Proteine im Genom kodiert sind. Nach Transduktion der Zielzelle exprimiert diese das Transgen. Die Dauer der Expression stellt einen großen Vorteil der AAVs gegenüber anderen Vektoren dar (130,143–145). Bereits 1996 konnte im Mausexperiment nachgewiesen werden, dass Transgene, welche von AAV2 in Zielzellen übertragen werden, auch noch 1,5 Jahre nach AAV-Applikation exprimiert werden (146).

AAVs wurden in klinischen Studien zur Behandlung von Hämophilie B (147–149), Parkinson (150,151), Lebersche kongenitale Amaurose (LCA, (152,153)) und Morbus Canavan (154) eingesetzt. Das erste und bis dato einzige AAV-basiertes Gentherapeutikum wurde 2012 in der Europäischen Union zugelassen. Es dient der Behandlung der seltenen Erkrankung der familiären Lipoproteinlipasedefizienz (LPLD) bei Erwachsenen (155–157).

Des Weiteren finden AAVs Beachtung im Bereich der Krebstherapie (158–161). Onkolytische Vektoren dienen dabei der Übertragung von toxischen Genen in Krebszellen, bei welchen nach Expression die Apoptose eintritt. Dazu muss sichergestellt werden, dass die Vektoren sehr spezifisch nur Krebszellen transduzieren. Dies kann einerseits mittels ihres Zelltropismus grob gesteuert, andererseits aber auch gezielt durch Veränderung der Kapsidregionen, die den Kontakt mit der Zielzelle vermitteln, beeinflusst werden. Synthetische, kleine Proteine (DARPs, engl. *Designed Ankyrin Repeat Proteins*) können aus einer Bibliothek für bestimmte Zielstrukturen selektiert werden. Sind sie kovalent an AAV-Kapsid gebunden, können sie wie Antikörper an die Zielstruktur spezifisch binden und so den Kontakt mit der Zielzelle

herstellen. So können Gene gezielt in Krebszellen, die bestimmte Proteine auf der Oberfläche exprimieren, übertragen werden. Beispielsweise ist bei 20 % aller Mammakarzinome Her2/neu (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*) stark überexprimiert. Patientinnen können zur unterstützenden Behandlung einen Her2/neu-spezifischen Antikörper verabreicht bekommen (Trastuzumab), der die Progression der Tumors verlangsamen kann (162). Her2/neu-spezifische DARPins, welche an das AAV-Kapsid gekoppelt sind, ermöglichen die spezifische Transduktion der Tumorzellen (163) zum Einbringen lytischer Gene und somit zur Zerstörung der Zellen. Außerdem wird die AAV-basierte Übertragung von Zytokinen, Tumorsuppressorgenen oder interferierender RNAs (RNAi) in Tumorzellen in zahlreichen Studien verfolgt (zusammenfassend dargestellt in (164)).

Zu beachten ist bei AAV-basierter Übertragung von Genen die Seroprävalenz. Da AAVs natürlich in der Bevölkerung auftreten, weisen viele Menschen AAV-spezifische Antikörper auf, die neutralisierend auf die Vektoren wirken, was die Übertragungseffizienz natürlicher Vektoren deutlich beeinträchtigt. Gegen AAV2 konnten in 72 % der Bevölkerung neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden, während nur 47 % AAV9- und nur 40% AAV5-spezifische Antikörper besitzen (165). Dies förderte die Entwicklung neuer chimärer AAV-Varianten wie AAVrh.8, die möglichst nicht kreuzreaktiv von Wildtyp-spezifischen Antikörpern neutralisiert werden (166,167). Auch die genaue Bestimmung bestehender neutralisierender Antikörper im Patienten vor einer AAV-basierten Therapie ist von Interesse (168).

1.4.3 AAV-BASIERTE INFLUENZA-IMPfstOFFE

Der entscheidende Vorteil AAV-basierter Systeme ist eine lang anhaltende Transgenexpression. AAV-vermittelte Antigene können so über einen langen Zeitraum im Impfling produziert und präsentiert werden (146,169–174). Schon 2001 wurde im Rahmen eines Projektes, welches die Entwicklung von HIV-Impfstoffen forcierte, gezeigt, dass der AAV-basierte Transfer von Genen des HI-Virus Antikörper und eine zelluläre Immunantwort induziert. Gleichzeitig wurde die Schutzwirkung eines AAV-HA- Vektors in Mäusen ermittelt. Intranasale Immunisierung mit dem AAV-HA schützte die Tiere zu 75 % gegen eine letale Dosis des homologen Influenza-Stammes. Wurde die Immunisierung zusätzlich mit dem Zytokin-kodierenden AAV-IL-2

durchgeführt, führte das zu einer Steigerung der Überlebensrate um 10 %, was auf eine erhöhte Induktion von CD4⁺ T-Helferzellen (Th1) zurückzuführen war (175).

Andere Gruppen verfolgen die AAV-basierte Expression breiten-neutralisierender HA-spezifischer Antikörper als präventive Therapie (176). Dabei wird nicht wie bei Impfstoffen das Immunsystem mittels Antigen zur Produktion von Antikörpern oder T-Zellen stimuliert, sondern direkt die Expression spezifischer Antikörper am Ort der natürlichen Infektionsroute der Pathogene gefördert (Immunoprophylaxe). Immunoprophylaxe kann insbesondere in Bevölkerungsgruppen mit geschwächtem Immunsystem (z.B. durch chronische Erkrankungen wie HIV oder durch die Einnahme von Immunsuppressiva wie bei Autoimmunerkrankungen) angewendet werden. Da ältere Menschen oftmals ebenfalls ein geschwächtes Immunsystem haben, reagieren sie auf konventionelle Impfstoffe mit einer schwachen Immunantwort. Besonders für diese Ansätze ist eine langanhaltende AAV-basierte Expression ein großer Vorteil. 2013 veröffentlichten zwei Gruppen unabhängig voneinander empirische Ergebnisse AAV-basierter Immunoprophylaxe gegen Influenza im Tiermodell. Balasz *et al.* generierten AAVs, die die variable Region der leichten und schweren Kette breiten-neutralisierender humaner Antikörper (F10 und CR6261) kodieren. Diese Antikörper binden spezifisch an die konservierte Stamm-Region des Hämagglutinins und können daher verschiedene Influenzaviren neutralisieren. Nach einmaliger Adjuvans-freier, intramuskulärer Injektion der AAV-Vektoren konnte die stabile Expression der Antikörper in den Seren der Tiere über einen Zeitraum von 64 Wochen nachgewiesen werden. Nach letaler Infektion mit verschiedenen H1N1 Influenza-Stämmen, überlebten die Tiere, wobei der Gewichtsverlust für CR6261 abhängig vom Serum-Titer war. Die Antikörper konnten alle getesteten Viren kreuzreaktiv neutralisieren (177). Eine zweite Gruppe testete intranasal applizierte, AAV-vermittelte, breiten-neutralisierende Antikörper gegen eine letale Infektion mit pandemischen Influenza-Stämmen positiv in Mäusen und Frettchen (178). Dies impliziert, dass die Art der Prophylaxe weiterführend im Menschen analysiert werden sollte. Mittels Vektor-basierter Immunoprophylaxe könnten immunsupprimierte Menschen über einen längeren Zeitraum gegen eine sich entwickelnde Pandemie oder starke Epidemie geschützt werden.

AAV-basierte Influenza-Vakzine wurden von Sipo *et al.* im Mausmodell hinsichtlich des protektiven Effekts gegenüber homologer sowie heterologer Belastung untersucht. Mittels intramuskulärer Immunisierung mit einem AAV9-HA (H1N1pdm09) oder AAV-NP (H1N1pdm09) konnten alle Tiere gegen eine Belastung mit dem homologen, humanen H1N1pdm09-Stamm geschützt werden. Das konservierte M1-Protein vermittelte keinen Schutz im homologen Modell. Während die Schutzwirkung bei AAV-vermittelter Immunisierung mit dem HA durch neutralisierende Antikörper hervorgerufen wurde, waren bei NP-Immunisierung reaktive T-Zellen verantwortlich. M1 konnte demnach keine protektive T-Zell-Antwort induzieren. Wurden alle drei Vektoren zu AAV-HA/AAV-NP/AAV-M1 als trivalentes Vakzin kombiniert, verringerte sich die Gewichtsreduktion nach homologer Infektion. Diese trivalente Immunisierung konnte außerdem vier von neun Tieren gegen eine heterologe Belastung mit dem Maus-adaptierten H1N1-Stamm A/Puerto Rico/8/1934 schützen. Die partielle Kreuzreaktivität wurde nachweislich nicht durch das HA ausgelöst, da die induzierten Antikörper gegen das heterologe Virus nicht neutralisierend wirken können. Da die T-Zell-Antwort gegen das M1 in den Testmäusen nur sporadisch nachweisbar war, wurde der protektive Effekt auf das NP zurückgeführt, gegen das eine starke T-Zell-Antwort induziert wurde. Die NP-spezifischen T-Zellen können gleichermaßen wie ADCC über NP-spezifische nicht-neutralisierende Antikörper den Schutz bewirkt haben (179).

Zusammengefasst besteht der Vorteil AAV-vermittelter Immunisierung gleichsam in der langanhaltenden Expression des übertragenen Transgens und der Sicherheit für den Menschen. Weiterhin lösen AAVs nur geringe Vektor-spezifische Immunantworten aus. Die Vektoren können zwar eine Wirkung haben, die der eines Adjuvants gleicht, sie wirken jedoch nicht toxisch auf den Impfling. AAVs können skalierbar in hohen Titern produziert werden. Außerdem erlauben verschiedene AAV-Serotypen die zielgerichtete Übertragung in verschiedene Zell- und Gewebetypen. Die ausgeprägte Charakterisierung der Viren ermöglicht durch molekulares Vektordesign die zielgerichtete Anpassung der Vektoren an den Nutzen der Anwendung. AAVs stellen demnach ein potentielles System für Vektor-basierte Immunisierungsstrategien gegen Influenza dar.

Bezüglich der saisonalen Influenza-Impfung kann die fehlerhafte Anpassung der Impfstämme an die zirkulierenden Viren als Hauptantrieb der Entwicklung neuer Impfstoffkandidaten gewertet werden. Die Gefahr einer Pandemie forciert die Erforschung neuer Impfsysteme hin zu breitenwirksamen Vakzinen zusätzlich. Weitere kritische Punkte sind zudem die abweichende Effektivität in verschiedenen Bevölkerungsgruppen, aufwändige Produktionsverfahren und Unverträglichkeiten gegenüber Impfstoffbestandteilen.

1.5 ZIEL DER ARBEIT

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel den potentiell breitenwirksamen, protektiven Effekt einer AAV-basierten Immunisierung gegen Influenza zu bewerten. Das anzuwendende System beruht dabei auf der Induktion einer kreuzreaktiven, zellulären Immunantwort gegen das hoch-konservierte Nukleoprotein.

Vor dem Hintergrund eine langanhaltende Immunität zu gewährleisten, soll zunächst die Stabilität und Dauer der Transgenexpression und der dadurch hervorgerufenen Immunantwort des innerhalb dieser Arbeit verwendeten AAV9-basierten Systems nach intramuskulärer und intranasaler Applikation im Mausmodell analysiert werden. Die longitudinale Expression *in vivo*, die humorale Immunantwort und auch die T-Zell-Antwort gegen ein AAV-vermitteltes Reportergen soll verfolgt werden. Im Hinblick auf die Optimierung von Lagerung, Transport und Verabreichung von AAV-basierten Impfstoffen in Pulverform soll überprüft werden, ob das hier verwendete Virus einer Lyophilisierung unterzogen werden kann.

Zur Untersuchung des breitenwirksamen Effekts soll der Nukleoprotein-kodierende AAV-Vektor im Mausmodell untersucht werden. Zunächst soll sichergestellt werden, dass das verwendete System im homologen Belastungsversuch einen Schutz gegen den sehr virulenten Influenza Subtyp PR8 aufbauen kann. Als Schutz-induzierender Parameter (COP) soll die T-Zell-Antwort gegen ein CD8⁺ T-Zell-Epitop determiniert werden. Hinsichtlich einer postulierten Kreuzreaktivität der T-Zellen soll das System dann im heterologen Belastungsmodell untersucht werden. Der Einfluss des immunodominanten H2-Db CD8⁺ T-Zell Epitops NP₃₆₆₋₃₇₄ soll dabei genauer definiert werden. Um die Idee einer Epitop-basierten Immunisierung gegen verschiedene Subtypen aufzugreifen, soll eine AAV-basierte Immunisierung mit einer Kette aller immunrelevanten Influenza CD8⁺ T-Zell-Epitope als Machbarkeitsstudie im murinen Modell auf die Schutzwirkung gegen PR8 hin durchgeführt werden. Die resultierenden Daten sollen der spezifischen Vorteil- und Nachteilsabwägung AAV-basierter Immunisierung mit dem Nukleoprotein dienen und etwaige Optimierungspotentiale eines entsprechenden, breitenwirksamen Impfstoffes offenlegen.

2 MATERIAL

2.1 SOFTWARE

Photoshop CS5 (Adobe)

Cell[^]F (Olympus Soft Imaging System)

Microsoft Office (Windows)

Zen2010 (Zeiss)

PrimerX (Web-basiert, <http://www.bioinformatics.org/primerx/>)

Odyssey v3.0 (LI-COR)

Living Image 4.0 (PerkinElmer)

MxPro Mx3005P v4.10 (Agilent)

Geneious 8.1.7

GraphPad Prism Version 5.04

FlowJo V 9.6 (Tree Star)

2.2 ENZYME

Restriktionsendonukleasen wurden von New England Biolabs bezogen. Weitere Enzyme sind in Tabelle 1 gelistet.

Tabelle 1: Enzyme

Enzym	Hersteller
Benzonase	Sigma-Aldrich
<i>PfuTurbo</i> DNA Polymerase	Agilent Technologies
<i>AmpliTaq Gold</i> DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific
T4 Ligase	New England Biolabs

2.3 KITS

Die verwendeten Kits sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Kits

Name	Hersteller
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Thermo Fisher Scientific
Bradford Assay	Bio-Rad
Effectene Transfection Reagent	QIAGEN
Luciferase Assay System	Promega
MAX Efficiency Stbl2 Competent Cells	Thermo Fisher Scientific
One Shot BL21(DE3) Chemically Competent <i>E. coli</i>	Invitrogen
One Shot TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i> (Invitrogen)	Invitrogen
Plasmid Mini, Maxi, Mega Kit	QIAGEN
Polyfect Transfection Reagent	QIAGEN
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies
RNase-Free DNase Set	QIAGEN
Super Signal West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Fisher Scientific
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega

2.4 OLIGONUKLEOTIDE

Primer für PCR, Mutagenese, sowie qPCR und Sequenzierung sind in Tabelle 3 aufgelistet. Alle Oligonukleotide wurden von Invitrogen bezogen.

Tabelle 3: Oligonukleotide

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz 5' → 3'
BGH rev	AAGGCACAGTCGAGG
CMV TaqMan 6-FAM-Sonde	6FAM-CCTGGCTGACCGCCCAACGAC-BHQ1 Q1
CMV TaqMan for	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG

MATERIAL

CMV TaqMan rev	CTATTGGCGTTACTATGGGAACATAC
coNP TaqMan 6-FAM-Sonde	6FAM-CCCATTGTGCCAGCTTCGA-BHQ1 Q1
coNP TaqMan for	GTGATTCGCATGATGGAGAG
coNP TaqMan rev	AGAAGTAGCTGCCCTCGTTG
coNP _{PR8} TaqMan 6-FAM-Sonde	GTGATTCGCATGATGGAGAG
coNP _{PR8} TaqMan for	AGAAGTAGCTGCCCTCGTTG
coNP _{PR8} TaqMan rev	CCCATTGTGCCAGCTTCGA
Mut_ NP _{pdm09} _G1111A for	CAGCAACGAGAACATGGAGACCATGGAC
Mut_ NP _{pdm09} _G1111A rev	GTCCATGGTCTCCATGTTCTCGTTGCTG
NP _{pdm09} _NdeI_for_2	GTACGTCATATGGCCAGCCAGGGCACCAA
NP _{pdm09} _XhoI_rev_3	GTA CTGAGTCAGTCCAATCCCAGC
NP _{PR8} _NdeI_for_2	GTACGTCATATGGCCTCACAGGGC
Seq_pAAV_KF_2	TAGAAGACACCGGGACCGAT
T7	TAATACGACTCACTATAGGG

2.5 PLASMIDE

Folgende Leervektoren und Konstrukte wurden in dieser Arbeit verwendet (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Plasmide

Vektor	Herkunft/Hersteller/Vertreiber
p5E18-VD2/9	Isaac Sipo (179)
pAAV-Epitopkette	Isaac Sipo (179)
pAAV-MCS (pAAV-leer)	Agilent Technologies
pAAV-NP _{pdm09}	Isaac Sipo (179)
pET16b	Novagen
pGL4.10- <i>luc2</i>	Promega
pHelper	Agilent Technologies
pUC57-coNP _{PR8}	GenScript

2.6 REKOMBINANTE PROTEINE UND PEPTIDE

Rekombinantes Protein diente als Antigen zum Nachweis spezifischer Antikörper mittels ELISA, während Peptide zur Stimulierung von Lymphozyten verwendet wurden. Aus Tabelle 5 ist die Peptidsequenz zu entnehmen, während die Aminosäuresequenzen der Proteine im Anhang aufgeführt sind.

Tabelle 5: Rekombinante Proteine und Peptide

Peptid	Sequenz	Hersteller/Vertreiber
Luciferase aus <i>Photinus pyralis</i> (Firefly)	siehe Anhang	Sigma-Aldrich
NP ₃₆₆₋₃₇₄ (pdm09)	ASNENVETM	peptides&elephants
NP ₃₆₆₋₃₇₄ (PR8)	ASNENMETM	peptides&elephants
NP _{pdm09}	siehe Anhang	rekombinant aus <i>E.coli</i>
NP _{PR8}	siehe Anhang	rekombinant aus <i>E.coli</i>

2.7 LABORGERÄTE

In Tabelle 6 sind die in dieser Arbeit verwendeten Geräte vermerkt.

Tabelle 6 Laborgeräte

Anwendung	Hersteller/Vertreiber	Modell
Blotting	Bio-Rad	TRANS-BLOT SD SEMI-DRY TRANSFER CELL
CO ₂ Inkubator	Labotect	C 200 for eucoryotic cells
Durchflusszytometer	BD Biosciences	FACS Calibur
ELISpot Lesegerät	AID	AID EliSpot Reader classic
Filmentwickler	Agfa – Gevaert	Curix 60
Geldokumentation	Biozym Scientific	Alphaimager 2200 Multimage Light Cabinet
In vivo Imager	PerkinElmer	IVIS Spectrum In Vivo Imaging System
<i>In Vivo</i> Imaging System	PerkinElmer	IVIS Spectrum
Laborwaage	Sartorius	CPA225D
MACS Dissociator	Milteny Biotec	gentleMACS Octo Dissociator

MATERIAL

Mikroplatten Washer	SKATRON Instruments	SkanWasher 300
Mikroskop Fluoreszenz	Zeiss	cLSM 780
Mikroskop Hellfeld	Nikon	LV150NL
Mikroskop Zellkultur	Zeiss	Axiovert 100M
Mikrotiterplatten- Photometer	Thermo Fisher Scientific	Multiskan GO
Narkosekammer	PerkinElmer	XGI-8
PCR Cyclers	Bio-Rad	MJ Mini Personal Thermal Cyclers
qPCR System	Agilent Genomics	Stratagene Mx3000P
Rotationsmikrotom	Leica	RM2245
SDS-PAGE	Bio-Rad	Mini-PROTEAN
Spektrophotometer	Eppendorf	BioPhotometer
Spektrophotometer	Nanodrop	NanoDrop ND-100
Sterilwerkbank	Thermo Fisher Scientific	HeraSafe
Thermoschüttler	HLC	HTM 130 R
Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter	Optima™ L-100k
Westernblot Imaging	LI-COR	Odyssey® Infrared Imaging System
Zellzähler	Beckmann Coulter	Coulter-Counter Z2
Zentrifuge	Eppendorf	Centrifuge 5415R
Zentrifuge	Sigma-Aldrich	4K15 Laboratory Centrifuge

2.8 CHEMIKALIEN

Als Bezeichnung für PBS ohne Ca⁺⁺ und ohne Mg⁺⁺ wird in dieser Arbeit vereinfacht PBS verwendet. Verwendetes PBS wurde in der hausinternen Medienküche hergestellt.

In Tabelle 7 sind in dieser Arbeit kommerziell erworbenen Stoffe, Reagenzien, Puffer und Lösungen erwähnt. Soweit nicht anders aufgeführt wurden die Chemikalien von Carl Roth bezogen.

MATERIAL

Tabelle 7 Erworbene Chemikalien

Chemikalie	Hersteller/Vertreiber
37 % Formaldehyd	Carl Roth
4x Laemmli Ladepuffer	Bio-Rad
ACK-Puffer	Thermo Fisher Scientific
Agarose	peQLab Biotechnology
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth
BSA (Bovines Serumalbumin), lyophilisiert	Sigma-Aldrich
Carbonate-Bicarbonate Puffer	Sigma-Aldrich
Cell Stimulation Cocktail	eBioscience
Coomassie R-250	Thermo Fisher Scientific
Cryo-SFM	PromoCell
D-Luciferin, Mononatriumsalz	Thermo Fisher Scientific
DNA Gel Loading Dye	Thermo Fisher Scientific
dNTP Mix (je 10 mM)	Thermo Fisher Scientific
Eosin G-Lösung 0,5 % wässrig	Carl Roth
Ethidiumbromid	Carl Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
FACS Puffer	Affimetrix
FKS (Fetal bovine serum (FBS) superior)	Biochrom
Generuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
Generuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
Hämalaunlösung	Carl Roth
HEPES	Sigma-Aldrich
Hoechst 33342, 20 mM	Thermo Fisher Scientific
Imidazol	Sigma-Aldrich
Iodixanol, 60% (OptiPrep)	Sigma-Aldrich
Isofluran	Sigma-Aldrich

MATERIAL

Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	AppliChem
Magermilchpulver	Carl Roth
Mowiol 4-88	Carl Roth
PEG-6000	Sigma-Aldrich
Phenylendiamine, 20 mg/Tablette (OPD)	Sigma-Aldrich
Phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF)	AppliChem
Phosphate-Citrate Puffer pH 5,0	Sigma-Aldrich
Polyethylenimin (linear, MW~25,000) (PEI)	Polyscience
Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics
Roticlear	Carl Roth
Roti-Mount	Carl Roth
Roti-Plast	Carl Roth
SDS Laufgel Puffer 1,5 M Tris-HCL, pH 8,8	Bio-Rad
SDS Laufpuffer 10x Tris/Glycine/SDS	Bio-Rad
SDS Rotiphorese® Gel 30 (37.5:1)	Carl Roth
SDS Sammelgel Puffer 0,5 M	Bio-Rad
Tris-HCL, pH 6,8	
SDS, 10 %	Bio-Rad
TEMED 89 %	Carl Roth
Transferpuffer 10x Tris/Glycine	Bio-Rad
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA 0.05 %/0.02 % (w/v) in PBS, w/o Ca ⁺⁺ , w/o Mg ⁺⁺	Biochrom
Tween-20	Sigma-Aldrich
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

2.9 PUFFER UND LÖSUNGEN

Alle im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 8 gelistet.

Tabelle 8: Hergestellte Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
10 % neutral gepuffertes Formalin	10 % Formaldehyd in PBS
2,5 M CaCl ₂	2,5 M CaCl ₂ in H ₂ O _{bid}
2,5 % Paraformaldehyd	2,5 % Formaldehyd, 37 % Stammlösung in PBS
Bakterien Lysis Puffer	250 mM HEPES pH 7 100 mM Na ₂ SO ₄ 400 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 200 mM NaCl 0,1 % Tween-20 2 mM β-Mercaptoethanol 2 mM PMSF (frisch) 1 / 50 ml Protease Inhibitor Tablette (frisch)
Coomassie Entfärbelösung	250 ml Isopropanol 650 ml H ₂ O _{bid} 100 ml 100 % Essigsäure
Coomassie Färbelösung	2 g Coomassie R-250 500 ml Methanol 400 ml H ₂ O _{bid} 100 ml 100 % Essigsäure durch Faltenfilter filtriert
HIER-Puffer	10 mM Natriumcitrat 0,05 % Tween-20 pH mit HCL auf 6,0 eingestellt in H ₂ O _{bid}

MATERIAL

IHC-Blocking-Puffer	5 % FKS 1 % BSA 0,05 % Tween-20 in PBS
IHC-Färbe-Puffer	1 % BSA in PBS
IHC-Waschpuffer	0,05 % Tween-20 in PBS
Lysis-Puffer	1 % Triton X-100 50 mM TRIS HCL pH 7,5 150 mM NaCl 5 mM EDTA 1 Stk./50 mL Protease Inhibitor Tablette (frisch) in H ₂ O _{bid}
MDCK Infektionsmedium	250mls DMEM 300µl FKS 2.5ml Penicillin/Streptomycin 250µl 2.5mg/ml Typsin TPCK (Frisch aufgetaut)
NaCl/HEPES	150 mM NaCl 50 mM Hepes 25 mM EDTA in H ₂ O _{bid}
Ni-NTA Agarose	QIAGEN
PBS 0,2 M	175 mM Na ₂ HPO ₄ 25 mM NaH ₂ PO ₄ 160 mM NaCl in H ₂ O _{bid}
PBS-MK	25 mM KCl 5 mM MgCl ₂ in PBS 0,2 M
PBST	0,05 % Tween-20 in PBS

MATERIAL

PEG/NaCl	2,5 mM NaCl 20 % PEG-6000 in H ₂ O _{bid}
PEI-Lösung	2,58 µg/µl Polyethylenimin in H ₂ O _{bid}
PM	2 % Magermilchpulver in PBS
PMT	2 % Magermilchpulver 0,05 % Tween-20 in PBS
TAE (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer-Puffer)	40 mM Tris (pH 7.6) 20 mM acetic acid 1 mM EDTA in H ₂ O _{bid}

2.10 PRO- UND EUKARYOTISCHE ZELLEN UND DEREN WACHSTUMSMEDIEN

Bakterien wurden in LB-Medium gehalten. Eukaryotische Zelllinien und deren Medien sind in Tabelle 9 aufgelistet. RPMI-1640 und DMEM wurden in der hausinternen Medienküche hergestellt.

Tabelle 9: Zelllinien mit entsprechendem Wachstumsmedium

Zellen	Medium
EL4	DMEM 2g/L D-Glukose mit 300 mg/l L-Glutamin, versetzt mit 100 Einheiten/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin sowie 10% FKS
HEK 293sf-3f6	RPMI-1640 2 g/l D-Glukose mit 300 mg/l L-Glutamin, versetzt mit 100 Einheiten/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin sowie 10% FKS
HEK 293T	RPMI-1640 2 g/l D-Glukose mit 300 mg/l L-Glutamin, versetzt mit 100 Einheiten/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin sowie 10% FKS

MATERIAL

MC57G	DMEM 2g/l D-Glukose mit 300 mg/l L-Glutamin, versetzt mit 100 Einheiten/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin sowie 10% fötalem Kälberserum
MDCK	DMEM 2g/L D-Glukose mit 300 mg/l L-Glutamin, versetzt mit 100 Einheiten/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin sowie 10% FKS

2.11 ANTIKÖRPER

In dieser Arbeit verwendete Antikörper sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Antikörper

Antikörper	Herkunft	Markierung	Hersteller/Bezugsquelle
Anti-AAV9 (intakte Partikel)	Maus IgA	-	PROGEN
Anti-Human IgG	Ziege IgG	HRP	Sigma-Aldrich
Anti-Influenza A (H1N1)	Ziege IgG	-	AbD Serotec
Anti-Influenza A NP	Maus	-	Thermo Fisher Scientific
Anti-Influenza Plasma, polyklonal NN 25-6-08	Human	-	zur Verfügung gestellt von Stephen Norley
Anti-Luciferase (Firefly)	Maus IgG	-	Thermo Fisher Scientific
Anti-Maus CD28	Hamster IgG	-	Affymetrix
Anti-Maus IgA	Ziege IgG	HRP	Santa Cruz Biotechnologie
Anti-Maus IgG (Fc)	Ziege IgG	HRP	Sigma-Aldrich
Anti-Maus IgG (H + L)	Ziege IgG	IRDye680RD	LI-COR
Anti-Maus IgG (H + L)	Ziege IgG	Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific
Anti-Maus Interferon- γ	Ratte IgG	-	MabTech

MATERIAL

mAB AN18			
Anti-Maus Interferon- γ	Ratte IgG	Biotin	MabTech
mAb R4-6A2			
Anti-Maus MHC Class I (H-2Db)		FITC	Affymetrix
Anti-Ratte IgG (H + L)	Ziege IgG	IRDye 680RD	LI-COR
Anti-V5	Maus IgG	-	AbD Serotec
Anti-Ziege IgG	Kaninchen IgG	AP	Sigma-Aldrich
Anti- β -Actin	Maus IgG	PO	Sigma-Aldrich
Maus IgG2b, κ	Maus IgG	FITC	Affymetrix
Isotypkontrolle			
Streptavidin	-	ALP	MabTech

2.12 ANTIBIOTIKA

Antibiotika für Zellkultur- und Bakterienkulturmedien wurden von Sigma-Aldrich bezogen und sind in Tabelle 11 gelistet.

Tabelle 11 Antibiotika für Zellkultur- und Bakterienkulturmedien

Antibiotikum	Stammkonzentration	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O _{bid}	100 μ g/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O _{bid}	50 μ g/ml
Penicillin/Streptomycin	10.000 U/ 10.000 μ g/ml	100 U/ 100 μ g/ml

3 METHODEN

3.1 ZELLKULTUR UND ZELL-BASIERTE METHODEN

Zelllinien wuchsen im entsprechenden Wachstumsmedium (Tabelle 9) in befeuchteter Luft bei 37 °C und 5 % CO₂. HEK 293T, MC57G, EL4 und MDCK Zellen wuchsen adhärent in Zellkulturschalen oder Zellkulturflaschen (TPP). HEK 293sf-3f6 Zellen wuchsen adhärent in Zellkulturschalen, Flaschen oder in Suspension in Spinnerflaschen (CELLSPIN, Integra). Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage gesplittet. Adhärent wachsende Zellen wurden dazu mit Trypsin/EDTA (trypsiniert) von der Zellkulturflasche oder Platte gelöst, in PBS gewaschen und anschließend in frischem Medium resuspendiert, um einen Teil (z.B. 1/10) weiter zu kultivieren.

3.1.1 TRANSFEKTION

Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion ausgesät. Zur Transfektion adhärent wachsender Zellen oder HEK 293sf-3f6 Zellen in Suspension wurde Polyfect oder Effectene nach Herstellerangaben oder PEI-Lösung verwendet.

PEI wurde im Verhältnis 1:8 mit DNA in serumfreiem Medium gemischt. Nach 10 Minuten Inkubation bei RT zur Komplexbildung wurde der Mischung serumhaltiges Medium beigefügt. Die Mischung wurde auf die Zellen gegeben, welche vorher einmalig mit PBS gewaschen wurden. Anschließend wurden die Zellen bei normalen Wachstumsbedingungen ruhen gelassen.

3.1.2 TRANSDUKTION

Bevor AAV-Präparationen im Tier für Immunisierungen verwendet wurden, wurden diese auf ihre Transduktionseffizienz *in vitro* getestet. Hierzu wurden die Viren in serumfreiem Medium verdünnt und auf Zellen gegeben, die einen Tag zuvor ausgesät wurden. Nach zwei Stunden Inkubation bei 37 °C wurde frisches serumhaltiges Medium hinzugegeben und die Zellen drei Tage im Brutschrank ruhen gelassen.

3.1.3 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Die Analyse von Zellen, dessen Oberflächenmoleküle nach Antikörper-vermittelter Antigen-spezifischer Färbung markiert wurden, erfolgte mit Hilfe des BD FACS

Calibur. Die Zellen wurden zuvor drei Mal in FACS Puffer gewaschen, um anschließend mit dem Fluorophor-gekoppelten Antikörper, in FACS Puffer verdünnten, für 45 Minuten bei 4 °C spezifisch gefärbt zu werden. Überschüssiger Antikörper wurde mittels dreimaligen Waschens mit FACS Puffer entfernt. Die Zentrifugation zwischen den Schritten erfolgte bei 300 rcf bei 4 °C für fünf Minuten. Das FACS Calibur wurde nach Herstellerangaben verwendet. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm FlowJo.

3.1.4 ZELLYSE

Zur Gewinnung von Zelllysate für Westernblot wurden Zellen einmalig mit PBS gewaschen und mit Lysis-Puffer 10 Minuten bei 4 °C lysiert. Das Lysat wurde bei 4 °C bei 7.500 rcf abzentrifugiert und sofort bei -20 °C gelagert.

3.1.5 IFN- γ ELISPOT

Die Produktion von Interferon- γ (IFN- γ) in Lymphozyten dient dem Nachweis einer Aktivierung und Proliferation der Zellen nach Kontakt mit dem spezifischen Antigen. Die Anzahl der IFN- γ -produzierender Zellen nach Stimulation mit dem Antigen wurde mittels ELISpot bestimmt. Dazu wurden zunächst Nitrocellulose-Membranen von MultiScreen HTS 96-Loch Platten (Merck Millipore) mittels 15 μ l/Well 70 % Ethanol für maximal zwei Minuten aktiviert. Das Ethanol wurde durch sechs-maliges Waschen mit PBS entfernt, bevor 250 ng des Adsorptionsantikörpers anti-Maus Interferon- γ mAB in 100 μ l zu jedem Well zugegeben wurden. Der Antikörper wurde bei 4 °C über Nacht auf den Platten inkubiert. Anschließend wurden die Platten sechs Mal mit 200 μ l PBS/Well gewaschen. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurde die Membran mit RPMI-1640-basiertem Zellkulturmedium (Tabelle 9) blockiert. Frisch isolierte Lymphozyten (siehe Abschnitt 3.4.5) wurden nach Isolierung zunächst eine Stunde bei normalen Kultivierungsbedingungen (siehe Abschnitt 3.1) ruhen gelassen. In Stickstoff gelagerte Lymphozyten wurden aufgetaut (siehe Abschnitt 3.4.5). Zu den ELISpot-Platten wurden 2×10^5 Zellen in 50 μ l RPMI-1640 Vollmedium zugegeben. Außerdem wurden 25 μ l RPMI-1640 Vollmedium, welches das stimulierende Antigen in einer finalen Konzentration von 5 μ g/ml enthielt, zugegeben. Als Positivkontrolle wurde Cell Stimulation Cocktail in einer Verdünnung von 1:500

eingesetzt. Des Weiteren wurden 25 µl RPMI-1640 Vollmedium, welches 1 µg des ko-stimulierenden anti-Maus CD28 Antikörpers enthält, zugegeben. Weitere 50 µl RPMI-1640 Vollmedium wurden addiert. Das Gesamtvolumen/Well war demnach 150 µl. Nach einer Inkubation von 20 Stunden im Inkubator bei 37 °C wurden die Zellen samt Medium von den Platten mittels Ausklopfen und sechs-maligem Waschen mit PBS entfernt. Die Platten wurden nach Zugabe von 100 µl pro Well des biotinyliertem anti-Maus Interferon- γ mAb (1µg/ml in PBS + 0,5 % FKS) für zwei Stunden bei RT inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen mit PBS wurden 100 µl pro Well Streptavidin-ALP (1 µg/ml verdünnt in PBS, 0,5% FKS) zugegeben und die Platten bei RT für eine Stunde inkubiert. Nach einem weiteren sechsmaligem Waschschrift mit PBS wurden pro Well 100 µl Färbelösung (AP Conjugate Substrate Kit: 100 µl NBT, 100 µl BCIP, 400 µl 25 x Puffer und 9,6 ml H₂O_{bid}) addiert. Der Farbumschlag erfolgte innerhalb von 30 Minuten bei RT. Die Färbung wurde durch Waschen mit Wasser gestoppt. Die Platten wurden bei RT getrocknet und mittels ELISpot Lesegerät eingelesen. Die Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel oder GraphPad Prism.

3.1.6 BESTIMMUNG DER INFLUENZA-VIRUSLAST IN LUNGEN

Zur Bestimmung der Viruslast replikationskompetenter Viren in Lungengewebe nach Infektion wurden die Lungen (gelagert bei -80 °C) zunächst homogenisiert. Der virushaltige Überstand wurde austitrierend zur Infektion von MDCK Zellen verwendet. Virus wurde mittels Influenza A-spezifischen ELISA detektiert.

Zunächst wurden die MDCK Zellen in DMEM-Medium kultiviert. Vor der Infektion wurden die Zellen durch Trypsinieren (siehe Abschnitt 3.1) suspendiert, in PBS gewaschen und nach Zählung auf 1×10^6 Zellen/ml in Infektionsmedium eingestellt. 20 µl der Zellsuspension wurde in jedes Well einer 384-Well Platte gegeben.

Zur Homogenisierung der Lungen wurden die Lungen in je 800 µl kaltem PBS aufgetaut. Jede Probe wurde in ein gentleMACS M Tube (Miltenyi Biotech) gegeben. Im gentleMACS Dissociator bei Programm RNA_02 wurden die Organe und Zellen homogenisiert. Das Homogenisat wurde bei 10.000 rcf für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in sterile Röhrchen überführt.

In einer 96-Well Platte war je Probe eine Spalte (A-H) für die Titration vorgesehen. Die virushaltigen Überstände wurden mit 150 µl Infektionsmedium 1:1 gemischt und in 11 Stufen je 1:3 runter titriert. Je Probe wurden acht Replikate der Verdünnungen zu je 10 µl in die 384-Well Platte überführt. Die Infektion der Zellen erfolgte in der Platte bei 37 °C für vier Tage im Inkubator.

Zu jedem Well wurden anschließend 20 µl einer 8 %igen Formaldehydlösung in PBS gegeben. Nach 30 minütiger Inkubation wurden die Platten ausgeklopft und zwei Mal mit je 75 µl PBS gewaschen. Nach erneutem Ausklopfen wurden je Well 20 µl Methanol zugegeben. Dies wurde für 10 Minuten inkubiert und erneut ausgeklopft und einmalig mit 75 µl PBS gewaschen. Anschließend wurde das PBS entfernt und 75 µl/Well PM zugegeben. Eine Inkubation bei RT für 30 Minuten folgte, um unspezifische Bindungen abzublocken. Nach einmaligem Waschen mit 75 µl PBS wurden je Well 20 µl des humanen, polyklonalen anti-Influenza Plasmas (NN 25-6-08) (1:200 in PMT) für 45 Minuten bei 37 °C auf den Proben inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch Waschen mit 75 µl PBS entfernt. 20 µl/Well des sekundären anti-Human IgG-HRP (1:1.000 in PMT) wurde für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Es folgen zwei Waschschritte mit je 75 µl PBS, bevor 20 µl Phenylendiamine (OPD) in Phosphate-Citrate Puffer mit 0,1 % H₂O₂ zur Detektion des sekundären Antikörpers hinzu pipettiert wurden. Die Reaktion wurde nach 10 – 30 Minuten mit 20 µl einer 5 %igen H₂SO₄-Lösung gestoppt. Das Signal wurde mit dem Mikrotiterplatten-Photometer bei 492/620 nm ausgelesen.

3.2 DNA-BASIERTE METHODEN

3.2.1 TRANSFORMATION

Plasmide wurde in *Escherichia coli* (*E. coli*) vermehrt. Transformation der Bakterien wurde nach Angaben der Hersteller (Thermo Fisher Scientific) der Kits One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli*, One Shot BL21(DE3) Chemically Competent *E. coli* oder MAX Efficiency Stbl2 Competent Cells durchgeführt.

3.2.2 DNA-PRÄPARATION

Isolierung von Plasmid DNA wurde mittels QIAGEN Plasmid Mini, Maxi oder Mega Kits nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

3.2.3 RESTRIKTIONSVERDAU

Restriktionsendonukleasen stammten von New England Biolabs (Tabelle 1) und wurden nach Herstellerangabe eingesetzt.

3.2.4 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Agarose-Gelelektrophorese diente der Auftrennung von DNA nach Größe und Ladung. Agarose wurde dazu in 1 x TAE-Puffer zu einem Anteil von 1 % (w/v) gelöst. Mittels Mikrowellenstrahlung wurde die Mischung erhitzt, wodurch sich die Agarose löste. Wurde nach Zugabe von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid die Lösung in Gelkammern gegossen, polymerisierte die Agarose unter Bildung des Gels aus. Die zu analysierenden Proben wurden mit 6 x Ladepuffer (DNA Gel Loading Dye) versetzt und in TAE-Puffer bei einer Spannung von 50 – 120 V getrennt. Als Größenstandard wurde Generuler 1 kb DNA Ladder oder Generuler 100 bp Ladder mitgeführt.

3.2.5 MUTAGENESE

Zum Einfügen einzelner Punktmutationen in Plasmid DNA wurde das QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit von Agilent nach Herstellerprotokoll eingesetzt. Primer wurden mittels PrimerX (<http://www.bioinformatics.org/primerx/>) und Geneious konzipiert. Das DNA-Produkt der Mutagenese-Reaktion wurde in *E. coli* transformiert (siehe Absatz 3.1.1), um amplifizierte Plasmid DNA mittels Plasmid Mini Prep zu isolieren. Restriktionsverdau (siehe Absatz 3.2.3) und Sequenzierung (siehe Absatz 3.2.7) dienen der Überprüfung des Erfolgs der Mutagenese.

3.2.6 KLONIERUNG

Für Klonierungen wurden die entsprechenden Genregionen mittels spezifischer Primer mit einer *Pfu* Polymerase amplifiziert. Die benötigten Schnittstellen an 5'- und 3'- Ende wurden durch Einfügen der Sequenzen in die Primer angefügt. Pipettierschema und Thermocycler-Programm der PCR mittels *Pfu* Polymerase sind in Tabelle 12 und Tabelle 13 dargestellt.

METHODEN

Tabelle 12: *Pfu*-PCR Reaktionsansatz

Komponente	Volumen [μ l]
10 x <i>Pfu</i> Puffer	1
dNTPs (2,5 mM)	4 μ l
Plasmid DNA Template	100 pg - 300 ng
Primer for und rev (10 μ M)	je 1,5 μ l
<i>Pfu</i> Turbo Polymerase (2,5 U/ μ l)e	1 μ l
H ₂ O _{bid}	auf 50 μ l

Tabelle 13: *Pfu*-PCR Thermocycler Programm

Schritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95	2 min
2. Denaturierung	95	30 s
3. Primerhybridisierung (Annealing)	52-60	30 s
4. Elongation	72	1 min/kb
Wiederholung der Schritte 2-4 30 x		
5. Terminale Elongation	72	10
Kühlen	4	∞

5 μ l des PCR-Produkts mit 1 μ l 6 x Ladepuffer (DNA Gel Loading Dye) wurden mittels Gelelektrophorese in einem einprozentigen Agarose-Gel auf die korrekte Größe des Fragments (siehe Absatz 3.2.4) überprüft. Zur Freilegung der Schnittstellen wurde das Produkt mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten (siehe Absatz 3.2.3). Zur Trennung des gewünschten Fragments von den Resten des Restriktionsverdau wurde das Produkt über Gelextraktion gereinigt. Dazu wurde das geschnittene PCR-Produkt mittels Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System aus dem Gel extrahiert.

Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde mit seinen freiliegenden Enden in den ebenfalls mittels Restriktionsverdau geschnitten Plasmid legiert. Eine Ligase verknüpft dabei unter ATP-Verbrauch die freien zueinander gehörenden Restriktionsschnittstellen von DNA-Fragment (engl. *Insert*) und Plasmid (Vektor). Der Ligationsansatz ist in Tabelle 14 erfasst. Der Ansatz wurde 60 Minuten bei RT inkubiert und anschließend in

kompetente *E. coli* Zellen transformiert (siehe Absatz 3.2.1). Gewachsene Einzelkolonien wurden zur Animpfung einer 5 ml-Kultur gepickt, woraus mittels Plasmid Mini Prep die Plasmid-DNA isoliert und anhand eines Restriktionsverdaus (siehe Absatz 3.2.3) oder einer Sequenzierung (siehe Absatz 3.2.7) überprüft wurde.

Tabelle 14: Ligation Pipettierschema

Komponente	Volumen [μ l]
10 x T4 Ligase Puffer	2
Vektor	50 ng
Insert	50 ng / 150 ng / 250 ng (Insert:Vektor = 1:1 / 1:3 / 1:5)
T4 Ligase	1
H ₂ O _{bid} (Nuklease-frei)	auf 20 μ l

3.2.7 SEQUENZIERUNG

Sanger-Sequenzierung wurde mittels BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit durchgeführt. Das Protokoll kann Tabelle 15 und Tabelle 16 entnommen werden. Das Auslesen der Sequenzen erfolge durch die hausinterne Sequenzierabteilung. Die Auswertung wurde mit Hilfe von Geneious durchgeführt.

Tabelle 15: Sequenzierreaktion: Pipettierschema

Komponente	Volumen [μ l]
5 x Puffer	1,0
Plasmid DNA Template	1,0-4,0 (150 - 300 ng)
Primer (100 ng/ μ l)	0,5
BigDye	2,0
H ₂ O _{bid}	auf 10,0 μ l

METHODEN

Tabelle 16: Sequenzierreaktion: Thermocycler Programm

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer
6. Initiale Denaturierung	95	2 min
7. Denaturierung	95	10 s
8. Primerhybridisierung (Annealing)	52	10 s
9. Elongation	60	4 min
Wiederholung der Schritte 2-4 25 x		
Kühlen	4	∞

3.2.8 QUANTITATIVE REAL-TIME PCR

Die quantitative Real-Time PCR (qPCR) diente der Erfassung der Anzahl der DNase-resistenten AAV-Partikel in einer Präparation (siehe Absatz 3.3.6). Die zuvor freigesetzten Virusgenome werden dabei anhand einer Standardreihe quantifiziert. Zur Quantifizierung von AAV9-luc, AAV-leer und AAV-Epitopkette wurden CMV TaqMan Primer und Sonde eingesetzt. Zur Detektion von AAV9-NP_{pdm09} und NP_{V371M} wurden coNP TagMan Primer und Sonde verwendet. AAV-NP_{PR8} wurde mittels coNP_{PR8} Primer und Sonde amplifiziert (siehe Tabelle 3).

Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: TaqMan qPCR Pipettierschema für 25 µl-Ansatz

Komponente	Volumen [µl]
H ₂ O _{bid}	19,375
10 x <i>AmpliTaq Gold</i> Puffer (mit MgCl ₂)	2,5
10 mM dNTPs	0,5
10 µM Primer TaqMan for	0,5
10 µM Primer TaqMan for	0,5
800 nM 6-FAM Sonde	0,5
10 x <i>AmpliTaq Gold</i>	0,125
AAV Probe / Standard (Matritze)	1,0

Für die Amplifikation wurde der Stratagene Mx3000P qPCR Thermocycler verwendet. Tabelle 18 ist das Programm der Reaktion zu entnehmen. Die Auswertung erfolgte mittels der Software MxPro.

Tabelle 18: TaqMan qPCR Thermocycler Programm

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95	10 min
2. Denaturierung	95	30 s
3. Primerhybridisierung (Annealing)	60	30 s
4. Elongation	72	30 s
Wiederholung der Schritte 2-4 40 x		
Kühlen	4	∞

3.3 PROTEIN-BASIERTE METHODEN

3.3.1 HERSTELLUNG REKOMBINANTER PROTEINE

NP_{pdm09} und NP_{PR8} wurden rekombinant in *E. coli* BL21[DE3] produziert. Dazu wurde die jeweilige Gensequenz über *NdeI* und *XhoI* in den pET16b Plasmid-Vektor kloniert. Diese Expressionsvektoren wurden in die Bakterien transformiert (siehe 3.2.1) So wurde dem Protein N-terminal ein 6 x His Tag angefügt, wodurch es über Ni-NTA Agarose isoliert werden konnte. Die Proteinsynthese in 250 ml Bakterienkultur wurde mit 1 mM IPTG induziert. Die Proteinaufreinigung erfolge entsprechend des Herstellerprotokolls der Ni-NTA-Säule. Die Elution wurde drei Mal in je 3 ml Puffer mit 1 M Imidazol durchgeführt. Die Konzentration der Proteine wurde mittels Bradford Assay bestimmt.

3.3.2 ELISA

Zur Detektion AAV-spezifischer und NP-spezifischer Antikörper im Serum immunisierter Mäuse wurden die Seren im ELISA getestet. Hierzu wurden das Antigen (AAV-leer Partikel, rekombinantes NP aus *E. coli* (siehe 3.3.1), oder rekombinante Luciferase) in Carbonate-Bicarbonat Puffer an Nunc MaxiSorp 384-Well (Sigma-Aldrich) Platten über Nacht bei 4 °C absorbiert. Die Platten wurden einmalig

mit 75 µl PBST gewaschen, bevor sie mit 75 µl PM für 45 Minuten bei 37 °C blockiert wurden. Anschließend wurde das Serum in einer Anfangsverdünnung von 1:200 in PMT hinzugegeben und seriell 1:3 verdünnt, sodass das Volumen im Well 20 µl betrug. Das Serum wurde so 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch einmaliges Waschen mit PBST entfernt. 20 µl sekundärer HRP-gekoppelter anti-Maus IgG Antikörper wurde auf den Platten 45 Minuten bei 37 °C gebunden. Nach zweimaligem Waschen mit PBST wurden 20 µl Phenylendiamine (OPD) in Phosphate-Citrate Puffer mit 0,1 % H₂O₂ zugegeben. Nach 10 – 20-minütiger Farbentwicklung wurde die Reaktion mit 20 µl 5 % H₂SO₄ gestoppt. Das Signal wurde mit dem Mikrotiterplatten-Photometer bei 492/620 nm ausgelesen.

3.3.3 SDS-PAGE

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe wurde Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. 1,5 mm Gele mit 15 % Acrylamid wurden mit Hilfe des Bio-Rad Systems wie in Tabelle 19 gezeigt hergestellt. Zellysate wurden mit 4 x Laemmli Ladepuffer versetzt und 10 Minuten bei 95 °C erhitzt, sodass die Proteine linearisieren. Gele liefen bei 100 V für 10 Minuten und anschließend bei bis zu 160 V.

Gele wurden in Coomassie gefärbt und in Entfärbelösung über Nacht geschüttelt oder für Westernblot in Transferpuffer überführt.

Tabelle 19: Pipettierschema für vier 1,5 mm Gele

Komponente	Laufgel	Trenngel
H ₂ O _{bid} [ml]	9,6	11,4
0,5 M Tris-HCL Puffer, pH 6,8 [ml]	10	
1,5 M Tris-HCL pH 8,8 [ml]		5
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1) [ml]	20	3,4
10 % SDS [µl]	400	200
TEMED [µl]	20	20
APS [µl]	200	100

3.3.4 WESTERNBLOT

Zum Transfer elektrophoretisch getrennter Proteine aus dem Gel (siehe Absatz 3.3.3) auf eine Nitrocellulose-Membran (Bio-Rad) wurde das Gel kurz in Transferpuffer equilibriert, bevor die Proteine im Semi-Dry Blot (Bio-Rad) bei 20 V für 40 Minuten auf die Membran übertragen wurden. Die Membran wurde zum Vermeiden unspezifischer Bindungen der Antikörper in 4 % Magermilchpulver in PBST für eine Stunde bei RT geblockt. Der primäre Antigen-spezifische Antikörper wurde in 4 % Magermilchpulver in PBST verdünnt und eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4 °C auf der Membran inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde drei Mal mit PBST von der Membran gewaschen. Der sekundäre IRDye- oder HRP-markierte Antikörper wurde in 4 % Magermilchpulver in PBST verdünnt und eine Stunde bei RT gebunden. Die Membran wurde drei Mal in PBST gewaschen. Die Detektion des Signals im Falle von IRDye-markierter sekundärer Antikörper erfolgte am Odyssey. HRP-markierte Detektionsantikörper wurden nach Zugabe des HRP-Substrats Super Signal West Dura Extended Duration Substrate auf einem medizinischen Röntgenfilm (Kodak) detektiert.

3.3.5 IMMUNFLUORESZENZ

In 6-Well Platten wurden 10^5 Zellen/Well auf sterile Glasplättchen ausgesät. Einen Tag später wurden die Zellen transfiziert (siehe 3.1.1) oder transduziert (siehe 3.1.2). Die Zellen ruhten ein bis drei Tage unter normalen Wachstumsbedingungen (siehe Absatz 3.1). Die Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen und mit 2,5 % Paraformaldehyd für 30 Minuten bei 37 °C fixiert. Paraformaldehyd wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Wurde intrazelluläres Antigen detektiert, wurden die Zellen in 0,5 % Triton-X 100 in PBS für 15 Minuten bei RT permeabilisiert. Blockieren der Proben in 1 % Magermilchpulver in PBS verhinderte unspezifisches Binden der Antikörper. Der primäre Antigen-spezifische Antikörper wurde in entsprechender Verdünnung in 1 % Magermilchpulver in PBS für eine Stunde bei RT inkubiert. Nachdem die Zellen drei Mal in PBS gewaschen wurden, wurde der sekundäre Fluorophor-markierte Antikörper in entsprechender Verdünnung in 1 % Magermilchpulver in PBS hinzugegeben. Nach einstündiger Inkubation im Dunkeln bei RT wurden die Proben drei Mal in PBS gewaschen. Zur Zellkernfärbung wurden die Zellen optional für 10 Minuten abgedunkelt bei RT mit Hoechst 33342

(1:10.000 in PBS) inkubiert. Hoechst wurde durch erneutes Waschen in PBS entfernt, bevor die Zellen mit Mowiol 4-88 auf einem Objektträger eingedeckt wurden. Die Proben wurden bei 4 °C im Dunkeln gelagert, bis sie mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop cLSM 780 betrachtet wurden.

3.3.6 HERSTELLUNG REKOMBINANTER AAV PRÄPARATIONEN

AAV-Partikel wurden in HEK 293sf-3f6 produziert. Ein Liter Suspensionszellkultur in einer Spinner Flasche wurde mit den Transgen-kodierenden pAAV-Plasmid, dem Plasmid p5E18-VD2/9, der für die Verpackungsgene *rep* und *cap* kodiert, sowie dem Plasmid pHelper, welcher die adenoviralen Helfergene E2A, E4 und VA enthält, mittels Polyethylenimin (PEI) transfiziert (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: PEI-Transfektionsansatz für 1 l Suspensionszellkultur in Spinnerflasche

Komponente	Menge	Schritt
pAAV-Plasmid	264 µg	
p5E18-VD2/9	264 µg	
pHelper	462 µg	in 90 ml serumfreien RPMI-1640 mischen
PEI (2,58 µg/µl)	7.920 µg (3.168 µl)	zu Plasmid-Mischung geben, mischen
Plasmid-PEI Mix		10 min bei RT inkubieren
		zu 1 l Suspensionszellkultur geben

Die transfizierten Zellen wurden 72 Stunden zur Partikel-Produktion unter normalen Wachstumsbedingungen kultiviert.

Da sich die AAV Partikel sowohl in der Zelle befinden, als auch ins Kulturmedium abgegeben werden, mussten Zellen lysiert und Partikel im Medium gefällt werden. Die Zellen wurden bei 4 °C für 5 Minuten bei 300 rcf abzentrifugiert und zwei Mal in kaltem PBS gewaschen. Das Medium und der Überstand der Waschschrte wurde zusammen in sterilen Glasflaschen gesammelt. Die Zellen wurden in 20 ml kaltem PBS resuspendiert und mittels vier Frier/Tau-Zyklen in flüssigem Stickstoff bzw. 37 °C-warmem Wasserbad lysiert. Das Lysat wurde durch Zentrifugation bei 4 °C bei 15.000 rcf für 15 Minuten von den Zelltrümmern getrennt und anschließend sofort bei -80 °C gelagert. Im Zellkulturmedium wurden zunächst mit 20 ml 2,5 M CaCl₂ pro Liter Medium bei 4 °C für eine Stunde störende Salze gefällt. Der Überstand wurde bei 4.000

METHODEN

rcf bei 4 °C von dem Präzipitat getrennt. Durch Zugabe von 325 ml PEG/NaCl pro Liter Überstand wurden AAV-Partikel über 24-72 Stunden bei 4 °C präzipitiert. Das Präzipitat wurde nach Zentrifugation bei 3.000 rcf bei 4 °C für 30 Minuten in 20 ml NaCl/HEPES resuspendiert. Die Suspension konnte wie das Lysat bei -80 °C gelagert werden.

Um freigewordene Nukleinsäuren und Plasmid-DNA aus dem Transfektionsansatz zu entfernen, wurden Lysat und AAV-Suspension aus dem Überstand mit 125 U/ml Benzonase behandelt. Während der einstündigen Inkubation bei 37 °C wurden die Suspensionen alle 15 Minuten vorsichtig geschwenkt. Um letzte grobe Verunreinigungen zu entfernen, wurden beide Suspensionen vereint und bei 15.000 rcf bei 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Die Suspensionen wurden mit PBS-MK auf 56 ml (4 x 14 ml) aufgefüllt. Entsprechend (Tabelle 21) wurde der Stufengradient aus Iodixanol hergestellt. In vier Beckman Coulter Quick Seal Tubes (39,0 ml; für Rotor 70 Ti) wurden jeweils 14 ml der AAV-Suspension mit Hilfe einer bodentiefen Kanüle gegeben. Die 15-, 25-, 40- und 54-prozentigen Iodixanol-Lösungen wurden anschließend durch Unterschichten der AAV-Suspension überführt. Die Ultrazentrifugationsröhrchen wurden auf 10 mg genau austariert und schließlich durch Verschmelzen der Öffnung luftdicht verschlossen.

Tabelle 21: Zusammensetzung des Iodixanal-Gradienten und Volumina einzelner Lösungen in einem Ultrazentrifugations (UZ)-Röhrchen

	15 %	25 %	40 %	54 %
	Iodixanol	Iodixanol	Iodixanol	Iodixanol
PBS-MK [ml]	37,5 ml	28 ml	16,5 ml	5 ml
60 % Iodixanol	12,5 ml	20 ml	33 ml	45 ml
Phenolrot	-	100 µl	-	80 µl
Vol/UZ- Röhrchen	9 ml	6 ml	5 ml	5 ml

Zur Aufkonzentrierung von AAV-Partikeln wurden die Röhrchen bei 18 °C bei 300.000 rcf (54.000 rpm) im Rotor 70 Ti mit geringer Beschleunigung und geringer Bremse zentrifugiert. Aufgrund ihrer Dichte reichern sich AAV-Partikel in der 40-prozentigen Iodixanol Schicht an, welche nach Anstechen der oberen Luftkammer mittels einer 18

G-Kanüle abgenommen (etwa 3 ml) und weiter verarbeitet wurde. Die 40 %-Fraktion wurde mit PBS-MK auf das zehnfache Volumen verdünnt und in Ultrafiltrationsröhrchen (Amicon Ultra-15 MWCO 100.000; Merck Millipore) überführt. Durch Zentrifugation bei 2.000 bis 4.000 rcf wurden die AAV-Partikel durch die Membran zurückgehalten, so aufkonzentriert und vom Iodixanol gereinigt. Die Zentrifugation wurde so lange durchgeführt, bis das Volumen der gesamten AAV-Suspension etwa 500 µl betraf. Die AAV-Präparation wurde bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zur Quantifizierung der rekombinanten AAV-Partikel wurden 20 µl der AAV-Suspension zur Entfernung restlicher DNA in der Präparation mit DNase aus dem RNase-Free DNase Set behandelt. Dazu wurde der in Tabelle 22 dargestellte DNase-Verdau angesetzt.

Tabelle 22: 50 µl-Reaktionsansatz für DNase-Verdau

Komponente	Volumen [µl]
AAV-Suspension	20
Puffer RDD	5
DNase I	1,25 (12,5 Units)
H ₂ O _{bid}	23,75

Der Ansatz wurde bei 25 °C für eine Stunde inkubiert. Rekombinante AAV-Partikel wurden mittels 50 µl einer 1 M NaOH-Lösung schüttelnd bei 65 °C für 45 Minuten aufgebrochen. Virus-Genom wurde so frei. Nachdem der Ansatz auf RT abkühlte, wurden zur Neutralisierung 50 µl einer 1 M HCl-Lösung zugegeben. Die Probe wurde in H₂O_{bid} dekadisch bis 1:10.000 verdünnt. Die Anzahl der Virusgenome in den Verdünnungen wurde mittels qPCR (siehe Absatz 3.2.8) bestimmt. Als Standard diente eine Expressionskassette mit CMV-Promotor, Intron und Transgen des entsprechenden pAAV-Vektors. Dazu wurde das Plasmid mittels *Sma*I verdaut. Nach Auftrennung des Fragments durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe Absatz 3.2.4) und Extraktion der Bande mittels Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System wurde die Konzentration im Nanodrop bestimmt und schließlich auf 1 ng/µl eingestellt. Es wurden wie auch von den Proben selbst dekadische Verdünnungen bis 1:10.000 hergestellt. Die Kopienzahl

der Stammlösung wurde mittels des Molekulargewichts der Expressionskassette (MW) und der Avogadro-Konstante N_A anhand der Formel

$$Kopienzahl = N_A \times \frac{1 \times 10^{-9}}{MW}$$

berechnet. Der hintere Bruchteil entspricht dabei der Molzahl (M) in mol. N_A beträgt $6,022140 \times 10^{23} mol^{-1}$.

3.4 ARBEITEN MIT TIEREN

In dieser Arbeit wurden Mäuse der Inzuchtlinien C57BL/6NCrI (Bl/6 Maus) und B6N-Tyrc-Brd/BrdCrCrI (Bl/6 Albino Maus) von Charles River bezogen. Die Bl/6 Albino Mäuse enthalten eine Mutation im Gen der Tyrosinase, welche an der Synthese von Melanin beteiligt ist. Sind die Tiere für diese Mutation homozygot, sind diese Tiere weiß (albino) anstatt Schwarz.

Zur Generierung von AAV9-spezifischem polyklonalem Antikörper wurden weibliche Wistar-Ratten verwendet. Auch diese Tiere wurden von Charles River bezogen.

3.4.1 HALTUNGSBEDINGUNGEN

Die Tiere wurden nach Lieferung mindestens eine Woche akklimatisiert. Die Haltung in den Tierräumen des Robert Koch-Instituts erfolgte in Käfigen des Typs III. Es wurden maximal fünf Mäuse oder zwei Ratten pro Käfig gehalten. Die Tiere wurden im 12 Stunden hell/12 Stunden dunkel-Rhythmus bei einer Temperatur von 22 °C gehalten. 10-12 Mal pro Stunde fand ein Luftwechsel statt. Sie bekamen Maus-Ratte Haltungsfutter. Eine Hygieneschleuse befand sich in den Vorräumen. Die Überwachung der Hygiene erfolgte nach FELASA-Richtlinien.

Alle Behandlungen wurden nach den Richtlinien der GV-SOLAS (Gesellschaft für Versuchstierkunde, Society for Animal Science) durchgeführt (180).

3.4.2 IMMUNISIERUNGEN

Immunisierung mit AAV-Vektoren erfolgte beidseitig intramuskulär in die hinteren Flanken oder intranasal mittels einer Pipette. Für beide Applikationsrouten wurden 50 µl der AAV-Suspension zweimal im Abstand von zwei Wochen angewendet

(Prime/Boost). Darin waren maximal 5×10^{10} DRP/Maus enthalten. Bei der intramuskulären Injektion wurden 25 µl je Seite mittels einer 27 G-Kanüle verabreicht. Für die intranasale Applikation wurden die Tiere einer Inhalationsnarkose mit Isofluran unterzogen.

Ratten wurden zur Generierung von polyklonalem Serum dreimal im Abstand von jeweils zwei Wochen subkutan mit einer 25 G-Kanüle immunisiert. Es wurden dabei maximal jeweils 1×10^{12} DRP AAV-leer in 700 µl PBS pro Ratte injiziert.

3.4.3 BLUTENTNAHME UND GEWINNUNG VON SERUM

Blutentnahmen erfolgten durch Punktion des retrobulbären Venenplexus nach Inhalationsnarkose mit Isofluran. Das Blut wurde etwa 30 Minuten bei 4 °C zur Hämostase ruhen gelassen, bevor es bei 1.500 rcf für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert wurde. Das Serum wurde abgenommen und bei -20 °C gelagert.

3.4.4 INFEKTION MIT INFLUENZA (BELASTUNG)

Vor einer Infektion wurden die Tiere gewogen. Die Infektion mit Influenza wurde nach Inhalationsnarkose intranasal mit einer Pipette durchgeführt. Die Tiere wurden entweder mit 3,5 MLD₅₀ des Influenza-Stammes A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) (PR8, zur Verfügung gestellt von Dr. Stephen Norley) oder mit 800 TCID₅₀ des Stammes A/California/7/2009 (H1N1) (H1N1pdm09, zur Verfügung gestellt von NIBSC) infiziert. Über eine 14-tägige Beobachtungsphase hinweg wurden die Tiere täglich zum Zeitpunkt der Infektion gewogen. Bei schneller Gewichtsabnahme erfolgte eine zweite Messung des Gewichts am selben Tag. Bei einem Gewichtsverlust ab 20 % wurden die Tiere euthanasiert.

3.4.5 EINZELZELLPRÄPARATION DER LYMPHOZYTEN DER MAUS

Zur Bestimmung einer Impfstoff-induzierten T-Zell-Antwort wurden die Milzen der Mäuse entnommen. Dazu wurden die Tiere zuvor mittels Inhalationsnarkose und zervikaler Dislokation getötet. Die Milzen wurden unmittelbar auf Eis gekühlt. Zur Isolierung der Lymphozyten wurden die Organe mit 3 ml RPMI-1640 in gentleMACS C Tubes (Miltenyi Biotech) überführt und mit Hilfe des MACS Dissociators zunächst aufgetrennt (Programm m_spleen_01). Die Zellen wurden durch Filtration durch

Präseparationsfilter (70 µm, Miltenyi Biotech) von extrazellulärer Matrix getrennt. Es wurde mit 5 ml RPMI-1640 nachgespült. Die Einzelzellsuspension wurde bei 300 rcf für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml ACK-Puffer zur Lyse der Erythrozyten resuspendiert und maximal drei Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden 45 ml kaltes PBS zugegeben und eine Zentrifugation bei 4 °C bei 300 rcf für fünf Minuten durchgeführt. Die Zellen wurden in 10 ml kaltem PBS resuspendiert. Die Zellzahl wurde bestimmt. Nach erneuter Zentrifugation bei 4 °C bei 300 rcf für fünf Minuten wurde die Zellzahl mit PBS oder RPMI-1640 entsprechend eingestellt. Zur Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff, wurden die Zellen anstelle von PBS oder Medium unmittelbar in Cryo-SFM resuspendiert und anschließend zunächst bei -80 °C in einem Mr. Frosty Freezing Container (Thermo Fisher Scientific) zur Gewährleistung einer Temperaturreduktion von -1 °C/Minuten eingefroren. Einen Tag später wurden die Zellen in den Stickstoff überführt. Zum Auftauen der Zellen wurden die Zellen aus dem Stickstoff in ein 37 °C-warmes Wasserbad überführt. Sobald sich nur noch ein kleiner gefrorener Kern im Röhrchen befand, wurden die Zellen unmittelbar in 12 ml warmes RPMI-1640 Komplettmedium (Tabelle 9) überführt. Nach Zentrifugation bei 300 rcf für 10 Minuten bei RT wurden die Zellen in frischem RPMI-1640 Komplettmedium resuspendiert und mindestens eine Stunde oder über Nacht im Inkubator bei 37 °C ruhen gelassen.

3.4.6 INJEKTION VON ZELLEN

Zur Untersuchung funktioneller T-Zellen im lebenden Tier, wurden Luciferase-exprimierende EL4 Zellen intravenös injiziert. EL4 Zellen entstammen einem Lymphom einer Bl/6 Maus. Die Zellen exprimieren daher den Mauslinien-typischen MHC-Klasse-I Haplotyp H2-Db und können so die Epitope präsentieren, gegen die immunisierte Tiere eine Immunantwort aufbauen sollten. Die Zellen wurden vor der Injektion mittels Effektene mit dem Luciferase-kodierendem Vektor pAAV-Luci (Tabelle 4) transfiziert. Mit einer 28 G-Kanüle wurden 1×10^6 Zellen in maximal 100 µl PBS pro Tier (maximal 5 ml/kg Körpergewicht) in die Schwanzvene, die zuvor mittels Infrarotstrahlung zur Hyperämisierung gewärmt wurde, appliziert. Die Lokalisierung und der Abbau der Zellen wurde mittels IVIS *in vivo* Imaging verfolgt.

3.4.7 *IN VIVO* IMAGING

Wurde den Mäusen der Luciferase-kodierende AAV-Vektor oder Luciferase-exprimierende EL4 Zellen injiziert, wurde die Luciferase-Aktivität im IVIS mittels *in vivo* Imaging determiniert. Da Luciferase bei Umsetzung des Substrats Luciferin Licht abgibt, wurde den Bl/6 Albino Mäusen zunächst D-Luciferin (30 mg/ml) appliziert. Die Tiere wurden gewogen, um 150 mg/kg (5 µl/g) Körpergewicht des Substrats intraperitoneal mit einer 27 G-Kanüle zu injizieren. Zur Resorption und Distribution im Körper wurden die Tiere für zwei Minuten im Käfig gelassen, bevor sie in die Narkosekammer überführt wurden. Die Tiere wurden mit 2,5 % Isofluran-Luft-Gemisch anästhesiert. Sie wurden in den IVIS Spectrum *in vivo* Imager überführt, wo sie weiterhin mit dem 2,5 % Isofluran-Luft-Gemisch in Narkose gehalten wurden. Mittels dem Programm Living Image wurde die Luciferase-Aktivität im *in vivo* Imager detektiert. Die Auswertung erfolgte ebenfalls mit Hilfe von Living Image. 3D-Aufnahmen wurden unter Verwendung des DLIT-Tools vorgenommen.

3.4.8 LUNGENENTNAHME

Zur Bestimmung der Viruslast replikationskompetenter Influenza-Viren wurden die Lungen drei Tage nach der Infektion nach schmerzfreier Tötung mittels Isofluran und zervikaler Dislokation entnommen und unmittelbar bei -80 °C eingefroren.

Zur histologischen Untersuchung des Lungengewebes nach Infektion wurden die Tiere mittels einer Überdosis Isofluran getötet. Nach Öffnen des Thorax wurde zunächst eine Schlinge um die Trachea gelegt. Unterhalb der Schlinge wurde die Trachea angeschnitten, sodass eine Pipettenspitze (100 µl) hineinpasste. Durch die Spritze wurde mittels einer Spritze 10 % neutral gepuffertes Formalin injiziert, sodass die Lunge vollständig gefüllt war. Die Lunge wurde anhand der Schlinge fixiert, während Bindegewebe und angrenzende Gefäße entfernt wurden. Das Organ wurde in 50 ml 10 % neutral gepuffertes Formalin überführt und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

3.4.9 HISTOLOGIE

Einbetten in Wachs

Die Lungen wurden in Plastikkäfige überführt und in Leitungswasser zwei Stunden gespült. Anschließend wurden die Organe einer Alkoholreihe unterzogen (Tabelle 23).

Tabelle 23: Alkoholreihe zur Dehydrierung und Einbettung der Lungen

Reagenz	Dauer [min]
70 % Ethanol	60
85 % Ethanol	60
95 % Ethanol	60
100 % Ethanol	60
100 % Ethanol	60
100 % Ethanol	60
Roticlear	60
Roticlear	über Nacht
RotiPlast Paraffin (>58 °C)	90
RotiPlast Paraffin (>58 °C)	90

Die Lungen wurden in flüssigem Paraffin in Metallförmchen (Carl Roth) eingebettet und nach Erstarren bei -20 °C gelagert.

Herstellung von Ultradünnschnitten

Die eisgekühlten Paraffinblöcke wurden mit einem Rotationsmikrotom in 10 µm dicke Sektionen geschnitten. Die Schnitte wurden auf einem 39 °C warmen Wasserbad geglättet und auf Adhäsionsobjektträger (Histobond, Carl Roth) aufgetragen. Nachdem die Objektträger auf einer warmen Platte getrocknet wurden, fixierten die Schnitte über Nacht in einer 37 – 35 °C warmen Kammer. Die Schnitte konnten bei -20 °C gelagert werden.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für die histopathologische Untersuchung wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung) durchgeführt. Die dafür notwendigen Schritte sind in Tabelle 24 beschrieben.

METHODEN

Tabelle 24: Reagenzienreihe zur Rehydrierung und Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Schnitte. Anschließende Dehydrierung mittels Ethanolreihe, gefolgt von Intermedium zum Eindecken

Reagenz	Dauer [min]
Roticlear	3
Roticlear	3
Roticlear:Ethanol 1:1	3
100 % Ethanol	10
96 % Ethanol	10
70 % Ethanol	3
Leitungswasser	1
H ₂ O _{bid}	bis zur Färbung
Hämalaunlösung nach Meyer	8
H ₂ O _{bid}	kurz
fließendes Leitungswasser	15
H ₂ O _{bid}	2
Eosin G-Lösung + 1Tropfen Eisessig pro 100 ml Lösung	2
H ₂ O _{bid}	kurz
70 % Ethanol	10
96 % Ethanol	10
100 % Ethanol	10
Roticlear	10

Die Schnitte wurden mit Roti-Mount frei von Luftbläschen eingedeckt. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht oder zum Zwecke der Lagerung bei 4 °C kühl gehalten. Hellfeld-Aufnahmen der gefärbten Schnitte wurden mit Hilfe des Nikon Mikroskops durchgeführt.

Immunohistochemie

Zur Detektion von Influenzavirus in Lungenschnitten wurde eine Influenza A-spezifische Färbung durchgeführt. Die Schnitte wurden dazu wie in Tabelle 25 aufgelistet zunächst einem wässrigen Milieu angeglichen.

METHODEN

Tabelle 25: Reagenzienreihe zur Rehydrierung der Schnitte vor Immunohistochemie

Reagenz	Dauer [min]
Roticlear	3
Roticlear	3
Roticlear:Ethanol 1:1	3
100 % Ethanol	10
96 % Ethanol	10
70 % Ethanol	3
Leitungswasser	1
H ₂ O _{bid}	bis zur Färbung

Da durch die Fixierung in Formaldehyd Proteine verlinkt werden können, sind manche Epitope den Antikörpern nicht zugänglich, was in reduzierter Färbung resultiert. Zur Vermeidung wurden die Schritte einer Hitze-induzierten Wiederherstellung der Epitope (HIER, engl. *heat induced epitope retrieval*) in Natriumcitrat unterzogen. Die Objektträger wurden in HIER-Puffer mittels Mikrowellenstrahlung 15 Minuten bis zu einem leichten Kochen erhitzt (180 W) und anschließend auf RT abgekühlt. Anschließend wurden die Schnitte kurz in Leitungswasser gefolgt von H₂O_{bid} gespült. Nach 10-minütigem Halten in PBS wurden unspezifische Bindungen durch zweistündiges Inkubieren bei RT in IHC-Blocking-Puffer in einer feuchten Kammer reduziert. Als primärer Antikörper wurde anti-Influenza A (H1N1) 1:200 verdünnt in IHC-Färbe-Puffer in einer feuchten Kammer gebunden. Der Antikörper wurde bei RT für zwei Stunden auf den Schnitten belassen. Nach einmaligem Waschen in IHC-Waschpuffer (10 Minuten) wurde der sekundäre anti-Ziege IgG-AP Antikörper 1:200 verdünnt in IHC-Färbe-Puffer auf die Schnitte gegeben (feuchte Kammer). Dieser wurde bei RT für zwei Stunden inkubiert und anschließend durch zweimaliges Waschen in IHC-Waschpuffer (je 10 Minuten) entfernt. Auf jeden Schnitt wurden 100 µl NTB/BCIP-Färbelösung gegeben und bei RT 5-10 Minuten inkubiert. Überschüssiges Substrat wurde durch Waschen in Leitungswasser entfernt (fünf Minuten). Nach kurzem Inkubieren in PBS wurden die Zellkerne mit Hoechst 33342 (1:10.000 in PBS) für 10 Minuten bei RT gefärbt. Die Proben wurden erneut 2-mal in PBS gewaschen, bevor sie mit Mowiol eingedeckt

wurden. Nach Härtung über Nacht bei 4 °C wurden die Proben mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop (cLSM780) betrachtet oder bei -20 °C gelagert.

4 ERGEBNISSE

Im Rahmen dieser Arbeit sollten AAV9-vermittelte Vektoren, welche das hoch-konservierte Influenza Nukleoprotein kodieren, als potentielle Influenza-Impfstoffe im Mausmodell getestet werden.

Das Produktionsformat der viralen Vektoren wurde innerhalb des Labors optimiert. Die Transgenexpression nach AAV9-vermittelter Immunisierung wurde mittels *in vivo* Imaging analysiert und der humoralen und zellulären Immunantwort gegenübergestellt. Die Nukleoproteine der Subtypen H1N1pdm09 und PR8 wurden hinsichtlich ihrer homologen Schutzwirkung, aber auch bezüglich der Kreuzreaktivität zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen untersucht. Zusätzlich wurde das Nukleoprotein des Subtyps H1N1pdm09 im heterologen Belastungsmodell getestet. Eine Variante des Nukleoproteins mit einer Aminosäuresubstitution sollte den Einfluss des immunodominanten CD8⁺ T-Zell Epitops auf die Schutzwirkung klären. Als weiteres Antigen wurde eine AAV-vermitteltes CD8⁺ T-Zell Epitopkette auf Immunogenität und protektiven Effekt hin getestet.

4.1 PRODUKTION UND KONTROLLE VON AAV-PRÄPARATIONEN

Rekombinante AAVs wurden durch Transfektion von Zellen mit drei Plasmiden hergestellt: Ein Verpackungsplasmid, welches für die Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 des AAV9 Serotyps kodiert (p5E18-VD2/9), dem AAV2-Genom enthaltenden Plasmid (pAAV-MCS), sowie einem Helferplasmid (pHelper) (siehe Tabelle 4).

4.1.1 OPTIMIERUNG DES PRODUKTIONSFORMATS IN SPINNER FLASCHEN UND QUANTIFIZIERUNG HERGESTELLTER AAV PRÄPARATIONEN

Das gängige Format zur Produktion ist die Kultivierung adhärent wachsender HEK 293T Zellen, entweder in 150 mm Zellkulturschalen oder in Rollflaschen. Zur Produktion hoher Virustiter zur Testung *in vitro* und *in vivo* werden üblicherweise 50 Zellkulturschalen oder 10 Rollflaschen benötigt, was in beiden Fällen sowohl mit einem hohen Aufwand an Material und Zellkulturmedium verbunden, als auch schwer hantierbar ist. Zur Generierung von Viruspräparationen während dieser Arbeit wurde daher ein Format etabliert, welches 1) höhere Virustiter generieren kann, dabei

2) einfacher zu handhaben ist und 3) einen geringeren Materialaufwand verlangt. Als Zelllinie wurden HEK 293sf-3f6 Zellen verwendet, da sie adhären und in Suspension wachsen können. Zur Kultivierung wurden Spinner Flaschen ausgewählt, die ein Liter Zellkultur fassen. Entsprechend der Kultivierungsbedingungen ergeben sich aus einem Liter Suspensionszellen in Spinner Flaschen sehr viel höhere Zellzahlen verglichen mit der benötigten Anzahl Zellkulturschalen oder Rollflaschen, wodurch folglich auch mehr Viruspartikel generiert werden (siehe Tabelle 26). Ein großer Nachteil der Produktion in Rollflaschen ist die eher geringe Transfektionseffizienz von 20 - 30 %. In Spinner Flaschen wurden während dieser Arbeit 80-90 % der Zellen positiv auf das Transgen getestet (nicht dargestellt).

Wie im Abschnitt (siehe Abschnitt 3.3.6) beschrieben, wurden die Zellen zur Freisetzung von AAVs lysiert und die Viren aus dem Zellkulturüberstand mittels PEG gefällt. Nach dem Verdau zellulärer DNA und RNA sowie Plasmid-DNA mittels Benzonase diente Ultrazentrifugation im Dichtegradienten der Trennung der Viruspartikel von weiteren Verunreinigungen durch Nukleinsäuren und Zellproteinen. Mittels Ultrafiltration wurden die Viruspartikel in Puffer aufkonzentriert. Zum Verdau möglicher Reste von Plasmid-DNA wurden die Präparationen vor der Quantifizierung einem DNase-Verdau ausgesetzt. Nach Zerstörung der DNase-resistenten Viruspartikel wurden freigesetzte Virusgenome mittels qPCR gegen eine Standardreihe quantifiziert (DNase-resistente Partikel/ μ l; DRP/ μ l). Für die Amplifizierung wurden NP-spezifische Primer und FAM-Sonden eingesetzt. Bei den Konstrukten AAV-Epitopkette, AAV-Luci sowie AAV-leer wurden CMV-spezifische Primer und FAM-Sonden eingesetzt.

Durch ubiquitären Einsatz von Plasmiden mit CMV-Promotor-getriebenen Transgenen in den Laborräumen, war die CMV-spezifische qPCR deutlich anfälliger für Kontaminationen, wodurch oft Negativkontrollen einer Messung falsch positiv getestet wurden. NP-spezifische Amplifikation war in der Regel ohne falsch positive Messergebnisse. Auffällig war, dass AAVs mit kurzem Genom (AAV-leer) höhere Titer erzielten als AAVs mit längerem Genom (wie AAV-NP oder AAV-Luci). Dies deckte sich mit den Erfahrungen anderer Wissenschaftler/innen, welche mit AAV-Vektoren arbeiteten (persönliche Kommunikation). Je länger die Zellen kultiviert wurden, desto

geringere AAV-Titer konnten erzielt werden. Hohe Ausbeuten verlangten geringe Passagierzahlen der Produktionszelllinie. Bei der Kultivierung der HEK 293sf-3f6 Zellen als Suspensionskultur in Spinner Flaschen war darauf zu achten, die Bildung von Zellaggregaten zu kontrollieren. Da die Zellen auch in Suspension den Zellverband benötigen, neigen sie zum Verklumpen. Obwohl die Transfektion und Kultivierung kleinerer Aggregate problemlos ist, sollten die Zellen beim Mediumwechsel oder Split mittels Trypsin/EDTA gelegentlich getrennt werden, bevor die Aggregate sehr groß werden und schwerer in Suspension verbleiben. In einem Liter Zellkultur in einer Spinner Flasche konnten Virustiter von 1×10^9 bis 1×10^{10} DRP/ μ l in einem Gesamtvolumen von 500 μ l bis 1000 μ l Virussuspension erzeugt werden. Dies stellt verglichen zu Erfahrungswerten (persönliche Kommunikation) gegenüber den üblichen Formaten etwa eine Steigerung der Ausbeute um den Faktor 10^3 dar.

Tabelle 26: Vergleich innerhalb dieser Arbeit untersuchter, gängiger adhärenter Kultivierungsformate zur AAV Produktion mit Spinner Flaschen

	<i>Suspension</i>	<i>Adhärenz</i>	
	1 l Spinner Flasche	10 \times Roll- flaschen 850 cm ²	50 \times Zellkultur- schalen 150 mm
Medium (Volumen)	1 l	2 l	1,5 l
Zellen/ml	2×10^6		
Zellen/Flasche bzw. Schale		8×10^7	$1,5 \times 10^7$
Zellen/Präparation	2×10^9	8×10^8	$7,5 \times 10^8$
Transfektionseffizienz	80-90 %	20-30 %	80-90 %

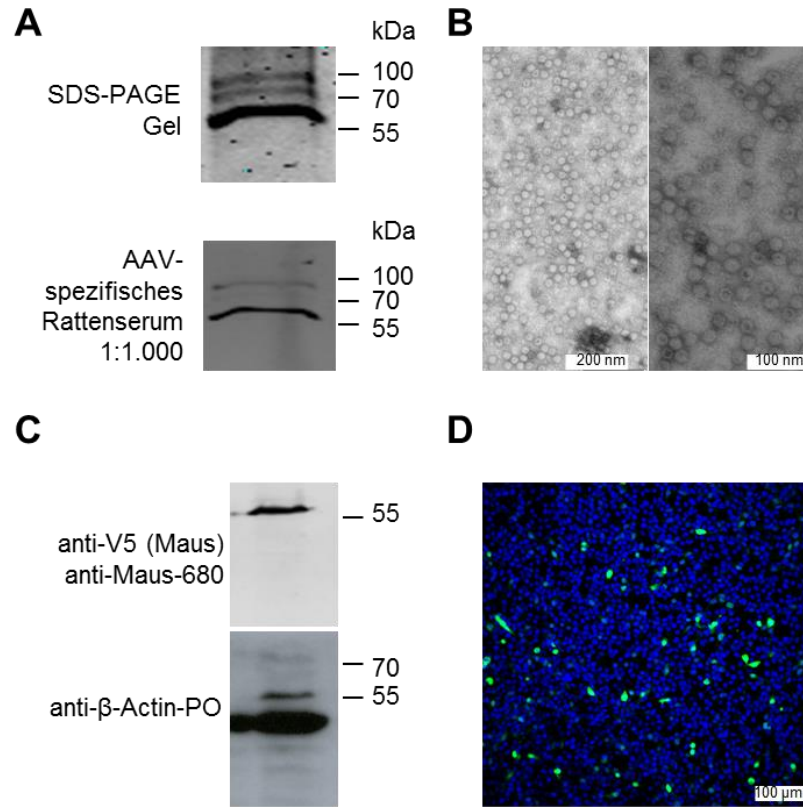
4.1.2 ÜBERPRÜFUNG DER REINHEIT, TRANSFEKTIONSEFFIZIENZ *IN VITRO* UND STABILITÄT GEGENÜBER GEFRIERTROCKNUNG DER AAVs

Generierte AAV-Suspensionen wurden zunächst mittels SDS-PAGE und Westernblot auf die Existenz der drei strukturellen Kapsid-Proteine VP1 (87 kDa), VP2 (72 kDa) und VP3 (62 kDa) hin untersucht. Das Verhältnis exprimierter und im Partikel assemblierter Kapsid-Proteine VP1:VP2:VP3 beträgt 1:1:10. Dies lässt sich auf die Genomstruktur und bevorzugte Spleißvarianten zurückführen (125). Im Proteingel

(Abbildung 5, A) sind die drei Proteine bei ihrer entsprechenden Masse deutlich erkennbar. Nach Aufreinigung und Aufkonzentrierung sind nur geringfügig Proteinreste der Zellkultur nachweisbar. Das lässt auf eine relativ hohe Reinheit der Präparationen schließen, obwohl keine Affinitätsaufreinigung stattgefunden hat. Da kommerziell ausschließlich AAV-spezifische Antikörper erhältlich waren, die sich gegen Konformationsepitope naiver Partikel richten, wurde zur Detektion der AAV Kapsid-Proteine im Westernblot nach denaturierender SDS-PAGE zunächst ein polyklonales AAV-spezifisches Serum in Ratten produziert. Fünf bis sechs Wochen alte weibliche Wistar-Ratten wurden dazu dreimal im Abstand von zwei Wochen mit jeweils 1×10^{12} DRP AAV9-leer subkutan immunisiert. Zur Verstärkung der Immunantwort wurde inkomplettes Freund-Adjuvans mit jeder Injektion eingesetzt. Vier Wochen nach der dritten Immunisierung wurde den Ratten Blut entnommen. Mit Hilfe des gewonnenen Serums (1:1.000) und sekundärem anti-Ratte IRDye 680 Antikörper (1:5.000) konnten die drei Kapsid-Proteine im Westernblot spezifisch detektiert werden (Abbildung 5, A).

Abbildung 5 B zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen der AAV-Präparationen. Neben einer hohen Dichte der Viruspartikel und geringfügig vorhandener Proteinaggregate konnten keine weiteren Kontaminationen festgestellt werden. Nach Auszählung der Partikel ergab sich eine Konzentration von 1×10^{13} Partikel/ml, was mit der Quantifizierung mittels qPCR übereinstimmte.

Die Transduktionseffizienz der viralen Vektoren wurde *in vitro* in HEK 293T Zellen bestimmt. Transgenexpression wurde im Westernblot mit anti-V5 Antikörper aus der Maus und sekundärem anti-Maus-IRDye 680 Antikörper (Abbildung 5, C), oder mittels Mikroskopie nachgewiesen, wobei für die Immunfluoreszenz sekundär ein anti-Maus-488 Antikörper verwendet wurde (Abbildung 5, D). Wie aus der Literatur bekannt (181), konnte auch hier eine hohe Transgenexpression nach Transduktion mit 100.000 DRP/Zelle nachgewiesen werden.



Transduktion mit 100 K Partikel/Zelle AAV-NP-V5

Abbildung 5: Kontrolle der AAV Partikel und deren Transduktionseffizienz *in vitro*

AAV Kapsid-Protein wurde im Proteingel und im Westernblot mittels AAV-spezifischen polyklonalem Rattenserum nachgewiesen (A). Elektronenmikroskopische Aufnahmen (B) bestätigen eine hohe Partikeldichte und einen Titer von etwa 10^{10} Partikel/ μ l. Nachweis der Expression des V5-gekoppelten Transgens *in vitro* nach Transduktion von HEK 293T Zellen mit 100.000 DRP/Zelle mittels V5-spezifischen Westernblot (C) und Immunfluoreszenz (D).

4.1.3 UNTERSUCHUNG DER STABILITÄT VON AAV9-VEKTOREN GEGENÜBER LYOPHILISIEREN

Ein Teilaspekt der Arbeit des UNISEC-Konsortiums besteht in der Evaluation der Formulierung und Verabreichung eines potentiellen breitenwirksamen Influenza-Impfstoffes. Für Vakzine, welche auf Protein- oder Peptidbasis beruhen, wie beispielsweise „subunit“-Vakzine (subunit: *engl.* Untereinheit), geht eine Darreichungsform als wässrige Lösung mit geringer Stabilität bei 4 °C oder Proteindegradation durch Einfrieren einher. Die Überlegung ist daher für einen potenziellen Impfstoff lyophilisierte Produkte zu entwickeln. Lyophilisierung (Gefriertrocknung) wird vor allem bei thermisch sensiblen Komponenten angewandt.

Das Erzeugnis ist frei von Wasser und daher auch bei Raumtemperatur lagerfähig. Ein solches Vakzin könnte problemlos auch in Regionen versandt werden, in denen die Einhaltung einer Kühlkette nicht gewährleistet werden kann. Als zusätzlichen Vorteil kann die Verabreichung eines trockenen Pulvers nadelfrei mittels Inhalator erfolgen (182,183). So könnte der Impfstoff direkt im Bereich der Mukosa appliziert werden, was eine Immunantwort im respiratorischen Trakt auslösen könnte. Die Immunität in respiratorischem Gewebe kann vor allem bei Influenza entscheidende Vorteile gegenüber einer alleinigen systemischen Immunreaktion haben.

Da AAVs nicht-umhüllte sehr kleine Viren sind, ist eine hohe Stabilität in Suspension nachgewiesen (184). Dennoch kann bei Lagerung und Transport bei unbekanntem Temperaturverhältnissen die Qualität der Vektoren in Suspension nicht gewährleistet werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob Lyophilisierung einen Einfluss auf die Transduktionseffizienz der hier verwendeten Vektoren hat.

Zunächst wurde der Reportervektor AAV9-Luci generiert. Dazu wurde *luciferase* aus pGL4.10-*luc2* hinter CMV-Promoter und CMV-Introns des Leervektors pAAV-MCS kloniert (siehe Abschnitt 3.2.6). Das Gen *luciferase* wurde dabei mittels *Hind*III und *Bam*H1 aus pGL4.10-*luc2* geschnitten und direkt in den ebenfalls mit *Hind*III und *Bam*H1 verdauten pAAV-MCS legiert. Der dabei entstandene pAAV-Luci wurde nach *Hind*III/*Bam*H1 Restriktionsverdau in der Agarosegelelektrophorese überprüft. Die ITR-Integrität wurde anhand eines *Sma*I-Verdaus überprüft. Außerdem wurde die Nukleotidsequenz des Transgens mit den Oligonukleotiden Seq_pAAV_KF_2 und BGH rev mittels Sequenzierung bestätigt. Nach Abschnitt 3.3.6 hergestellte AAV9-Luci Partikel führten nach Transduktion von Zellen zur Expression von Luciferase, was mittels Luciferase-Assay detektiert werden konnte (nicht dargestellt).

Die Gefriertrocknung von AAV9-Luci, umgepuffert von PBS-MK in 5 mM HEPES + 150 mM NaCl (pH 7.4), wurde von Phillip Born an der Universität Groningen durchgeführt. Die Proben wurden auf Trockeneis versandt. Drei verschiedene Formulierungen, die stabile Pufferbedingungen und den Schutz der Viruspartikel während der Prozedur sicherstellen sollen, wurden untersucht: Trehalose, Inulin und Trehalose/Dextran. Außerdem wurde für alle Formulierungen ein schnelles und ein langsames Temperaturprofil getestet. Darüber hinaus wurden Negativ- oder

Hintergrundproben in Form von AAV-freien Formulierungen mitgeführt. Die lyophilisierten Proben wurden mit H_2O_{bid} rekonstituiert. Als Versandkontrolle dienten nicht-lyophilisierte AAV-Luci Partikel in Suspension. HEK 293T Zellen wurden mit den Proben transduziert. Die Luciferase-Aktivität nach Transduktion zeigt die Effizienz der Vektoren. Es konnte keine signifikante Differenz in der Luciferase-Aktivität zwischen lyophilisierten AAV-Proben und der Versandkontrolle festgestellt werden (Abbildung 6). Auch nicht-versendete Proben, welche permanent bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden, lieferten vergleichbare Messergebnisse (nicht dargestellt). Dies zeigt, dass Gefriertrocknen der in dieser Arbeit produzierten AAV9 Partikel in den getesteten Formulierungen keinen negativen Effekt auf die Stabilität der Vektoren oder *in vitro*-Infektiosität hat.

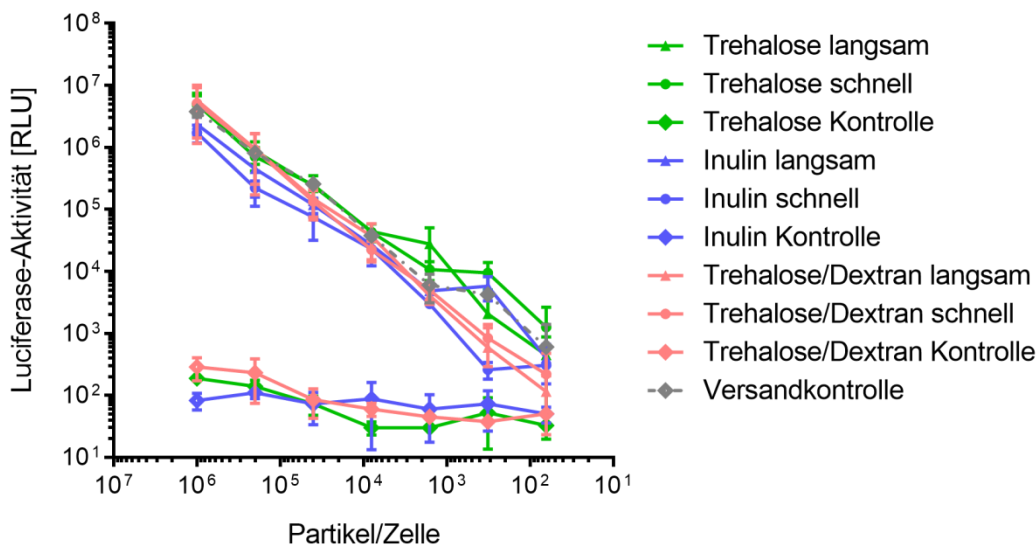


Abbildung 6: Luciferase-Aktivität nach Transduktion von HEK 293T Zellen mit rekonstituierten lyophilisierten AAV-Luci Partikeln.

AAV-Luci Suspension wurde in den Formulierungen Trehalose, Inulin oder Trehalose/Dextran mit langsamem oder schnellem Temperaturprofil lyophilisiert. Die Partikel wurden mit H_2O_{bid} rekonstituiert um Zellen in serieller Verdünnungsstufe zu transduzieren. Anhand der Messung der Luciferase-Aktivität in Zelllysaten wurde keine Differenz bezüglich der Transduktionseffizienz der rekonstituierten Proben vergleichen zur Versandkontrolle festgestellt. Hintergrundsignal wurde mittels AAV-freien Proben der Formulierungen determiniert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von jeweils Triplikaten dreier unabhängiger Experimente.

4.2 ÜBERPRÜFUNG DER AAV-VERMITTELTEN TRANSGENEXPRESSION UND IMMUNANTWORT *IN VIVO*

Eine hohe und stabile Transgenexpression ist ausschlaggebend für eine erfolgreiche Immunisierung. Neben dem Transgen als Faktor, ist die Expression bei AAV-vermittelter Immunisierung auch maßgeblich von der Wahl des AAV-Serotyps, als auch von der Applikationsroute, abhängig (siehe Abschnitt 1.4.3, Seite 33). AAV9 transduziert Muskelzellen besonders effektiv und wird daher als oft intramuskulär (i.m.) appliziert. Da Influenza als respiratorisches Virus über die Mukosa in den Wirt eindringt, kann es von Vorteil sein, eine Immunantwort im respiratorischen Trakt zu induzieren. In dieser Arbeit sollten die Stärke und Dauer der Transgenexpression und der Immunantwort nach intramuskulärer und intranasaler Applikation von AAV9 im Mausmodell verglichen werden.

Dazu wurde AAV9-Luci zweimal im Abstand von zwei Wochen intramuskulär oder intranasal in Bl/6 Albino-Mäuse appliziert (siehe 3.4.2). Über den Zeitraum von 12 Monaten wurden die Tiere hinsichtlich Luciferase-Aktivität im IVIS *in vivo* Imager untersucht. Parallel erfolgen Blutentnahmen, die der Überprüfung der Stärke der AAV9-spezifischen und Luciferase-spezifischen Antikörperantwort dienen. Am Ende des Versuchs wurde den Tieren die Milz entnommen. Die Milzzellen wurden isoliert und zur Detektion Luciferase-spezifischer Immunzellen verwendet.

In Abbildung 7 ist zu erkennen, dass intramuskuläre Applikation des AAV9-Luci Vektors zur lokalen Expression von Luciferase in den hinteren Oberschenkelmuskeln führt. Wurde der Vektor intranasal verabreicht, kann Luciferase-Aktivität in der Nasenhöhle und der Lunge, jedoch nicht in der Trachea festgestellt werden. Die Transgenexpression ist bei beiden Arten bereits nach einmaliger Applikation maximal. Die Boost-Immunisierung trägt nicht zur Steigerung der Expression bei. Nach intramuskulärer Injektion ist die Expression sehr viel stärker als nach intranasaler Verabreichung. Beide Applikationsformen führen zu einer stabilen Transgenexpression, die auch ein Jahr nach der Gabe nicht an Intensität verloren hat.

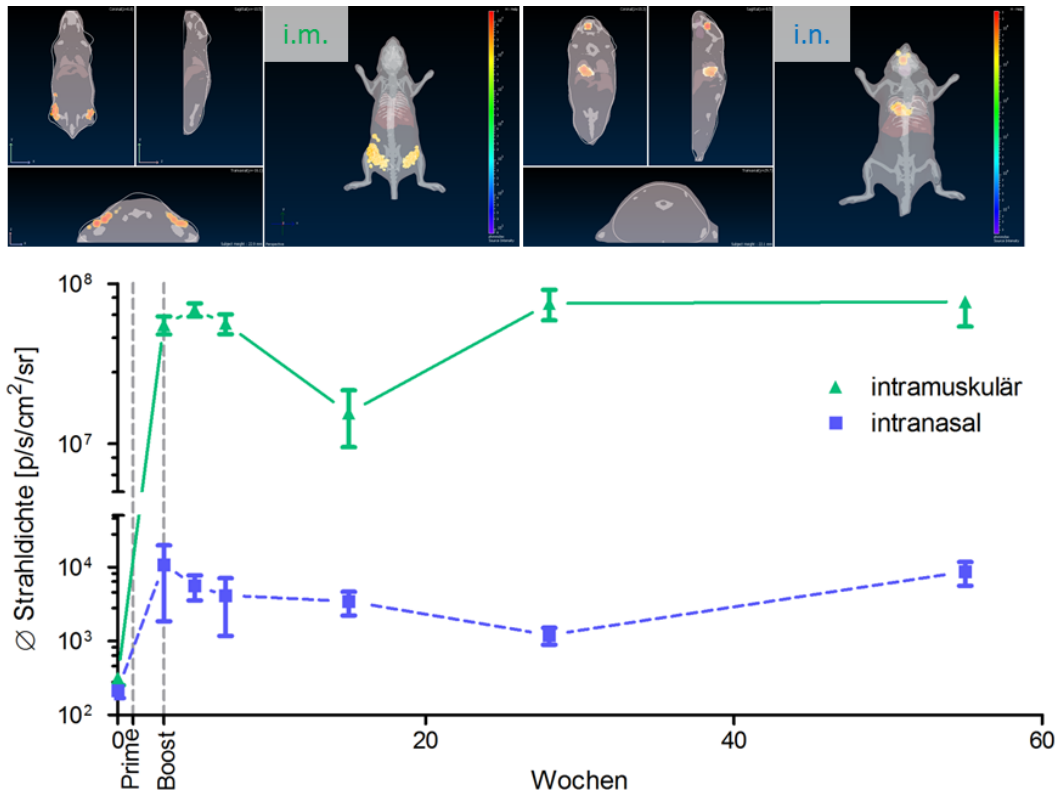


Abbildung 7: Transgenexpression nach intramuskulärer (i.m.) und intranasaler (i.n.) Applikation von AAV9-Luci in Bl/6 Albino-Mäusen.

Tiere wurden zwei Mal (Prime/Boost) mit 5×10^{10} DRP AAV9-Luci immunisiert. Die Transgenexpression wurde als Luciferase-Aktivität ermittelt und mittels DLIT als Voxel dargestellt (links) oder als durchschnittliche Strahlendichte im zweidimensionalen ROI auf dem gesamten Tier berechnet (rechts). Bereits nach der Prime-Immunsierung ist eine starke Expression in der hinteren Oberschenkelmuskulatur nach intramuskulärer und im oberen respiratorischen Trakt und der Lunge nach intranasaler Applikation erkennbar. Beide Applikationswege führen zu stabiler Expression über einen Zeitraum von 12 Monaten. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von jeweils 5 Tieren.

Der Nachweis AAV9-spezifischer Antikörper erforderte die Etablierung eines AAV9-ELISAs im 384-Well Format (siehe Abschnitt 3.3.2). Rekombinante AAV9-leer Partikel wurden wie für die Immunisierung produziert (siehe Abschnitt 3.3.6) und auf die Platten absorbiert. Die optimale Menge an AAV9-leer wurde in einer Titrationsreihe gegen den primären anti-AAV9 (Maus IgA) Antikörper mit fester Konzentration des anti-Maus IgA Antikörpers (1:1.000) ermittelt. Es wurde eine Anzahl von 10^7 DRP pro Well als Absorptionsantigen determiniert. Als Positivkontrolle für die Testung der Seren wurde der anti-AAV9 Antikörper in einer Verdünnung von 1:250 eingesetzt.

Im Serum beider Testgruppen konnten bereits zwei Wochen nach der Prime-Immunsierung anti-AAV9 Antikörper mittels AAV9-ELISA (siehe Abschnitt

3.3.2) nachgewiesen werden. Für die intramuskuläre Applikation steigt der Titer AAV9-spezifischer Antikörper bis einen Monat nach Immunisierung an. Nach intranasaler Applikation wurde der höchste Titer erst drei Monate nach Verabreichung gemessen, wobei sich beide Titer nicht signifikant unterscheiden. Bis 12 Monate nach AAV9-Behandlung sind beide Titer sehr stark bis an die Nachweisgrenze zurückgegangen (Abbildung 8 A). Wurden die Seren beider Gruppen gepoolt und in Transduktionsversuchen auf ihre Neutralisationseigenschaften gegenüber AAV9-Luci getestet, konnte gezeigt werden, dass der neutralisierende Titer bei intramuskulärer Injektion etwa das Fünffache verglichen zu intranasaler Applikation (Tabelle 27) betrug. Dabei ist anzumerken, dass der Serum-Titer an Gesamt AAV9-spezifischen Antikörpern nach intramuskulärer Injektion tendenziell höher ist, wenn auch, wie oben beschrieben, nicht signifikant.

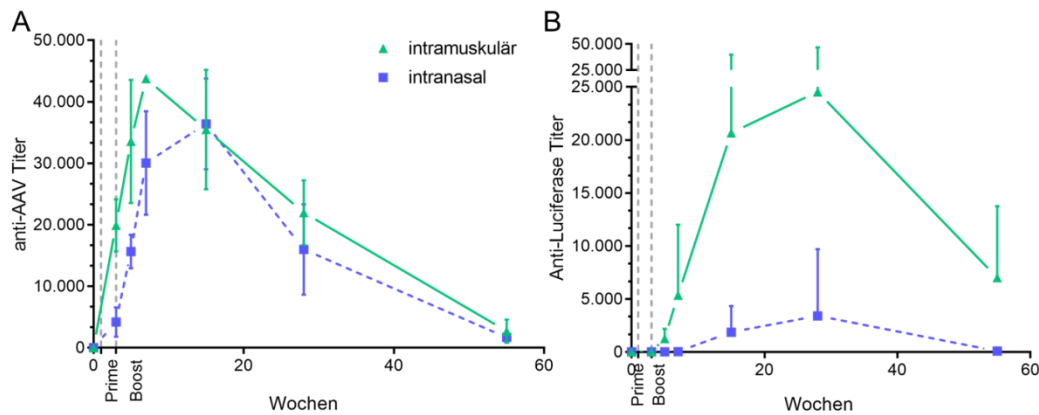


Abbildung 8: AAV- und Luciferase-spezifische humorale Immunantwort im Serum nach intramuskulärer und intranasaler Applikation von AAV9-Luci in Bl/6 Albino-Mäusen.

Tiere wurden wie in Abbildung 7 beschrieben immunisiert. Serumproben wurden zu indizierten Zeitpunkten auf AAV9-spezifische (A) und Luciferase-spezifische (B) Antikörper getestet. Beide Applikationswege induzieren starke Vektor-spezifische Antworten. Nach intramuskulärer Injektion sind im Serum mehr Antikörper gegen Luciferase detektierbar als nach intranasaler Applikation. Beide Routen führen zu Transgen-spezifischen Antikörperantworten, die sechs Monate nach Verabreichung maximal waren und anschließend abnahmen.

Die Detektion Transgen-, also Luciferase-spezifischer Antikörper erfolgte mittels Luciferase-ELISA (siehe Abschnitt 3.3.2). Hierzu wurde kommerziell erhältliche rekombinante Luciferase an ELISA-Platten gebunden. Anstelle des im Labor etablierten 96-Well Platten-Format wurde ein 384-Well Platten-Format verwendet, um eine höhere Anzahl

an Proben mit geringerer Menge an rekombinantem Protein testen zu können. Die benötigte Verdünnung der Luciferase wurde zuvor in einer Verdünnungsreihe gegen einen primären Luciferase-Antikörper (anti-Luciferase (Maus IgG)) mit fester Konzentration des sekundären Antikörpers (anti-Maus IgG PO 1:1,000) austitriert und auf 1:2,000 festgelegt. Dies entspricht einer Menge von 10 ng Antigen pro well einer 384-Well Platte.

Ein deutlicher Unterschied ist bei der Induktion Luciferase-spezifischer Antikörper zu sehen. Während intranasal immunisierte Mäuse nur einen moderaten Serum-IgG Titer aufweisen, konnte für intramuskulär immunisierte Tiere ein sehr hoher Gehalt an Luciferase-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Am höchsten waren die Titer sechs Monate nach Immunisierung, wonach sie wieder abnahmen. Ein Jahr nach dem Boost konnten für die intranasale Applikation keine Antikörper mehr nachgewiesen werden, während für intramuskuläre Injektion noch ein hoher Titer messbar war (Abbildung 8 B).

Tabelle 27: Luciferase-spezifischer Antikörper und Luciferase-neutralisierende Antikörper nach Immunisierung mit AAV9-Luci.

Serum	Gesamt-IgG ¹⁾	Neutral. AK ²⁾
I.n. Prä	n.n.	n.n.
I.n. Prime	4.183	25
I.n. Boost	15.653	25
I.n. 1 MPI	30.061	125
I.m. Prä	n.n.	n.n.
I.m. Prime	19.908	125
I.m. Boost	33.547	625
I.m. 1 MPI	43.780	625

¹⁾ Gesamt-IgG, Mittelwert, N = 5

²⁾ Neutral. AK, Serumpool aus N = 5, Mittelwert technischer Dublikate

I.n. = intranasal; I.m. = intramuskulär; Prä = Präimmunserum.
 Prime = 2 Wochen nach erster Immunisierung. Boost = 2 Wochen nach zweiter Immunisierung. MPI = Monate post Boost-Immunisierung.

Zur Untersuchung einer zellulären Immunantwort gegen Luciferase, sollten Luciferase-präsentierende Bl/6-abgeleitete EL4 Zellen zur Stimulation isolierter

Lymphozyten der immunisierten Tiere genutzt werden. Diese sollte nach Inkubation im ELISpot auf IFN- γ Sekretion hin getestet werden. Es konnte zunächst gezeigt werden, dass die Zelllinie die notwendigen MHC-Klasse-I-Moleküle (Typ H2-Db), welche Antigen-Epitope an CD8⁺ T-Zellen präsentieren, auf der Oberfläche exprimiert. Dazu wurden die EL4 Zellen parallel zu unmittelbar aus einer Bl/6 Maus isolierten Lymphozyten als Positivkontrolle und HEK 293T Zellen als Negativkontrolle mittels FITC-markiertem anti-MHC-Klasse-I H2-Db Antikörper (1:200 in FACS Puffer) gefärbt und mit Hilfe des Durchflusszytometers gezählt. Wie in Abbildung 9 zu erkennen, exprimieren 99 % aller EL4 Zellen den H2-Db-Rezeptor auf der Oberfläche. Ebenso sind nahezu alle isolierten Lymphozyten aus der Maus positiv gefärbt (blaue Linie), was die Funktionalität des Antikörpers bestätigt. HEK 293T Zellen exprimieren einen anderen MHC-Klasse-I-Typ und konnten so auch nicht gefärbt werden. Um unspezifische Bindungen des Antikörper Isotyps IgG2b, κ (1:200 in FACS Puffer) ausschließen zu können, wurden alle drei Zelllinien auch mit einer FITC-markierten Isotypkontrolle, die nicht spezifisch an den Rezeptor bindet, inkubiert. Diese Färbung zeigte keine positiven Ereignisse (rote Linie). Auch native, also ungefärbte Zellen (grüne Linie) wurden als negativ detektiert. Nach Transfektion mit pAAV-Luci exprimierten die EL4 Zellen Luciferase (nicht dargestellt).

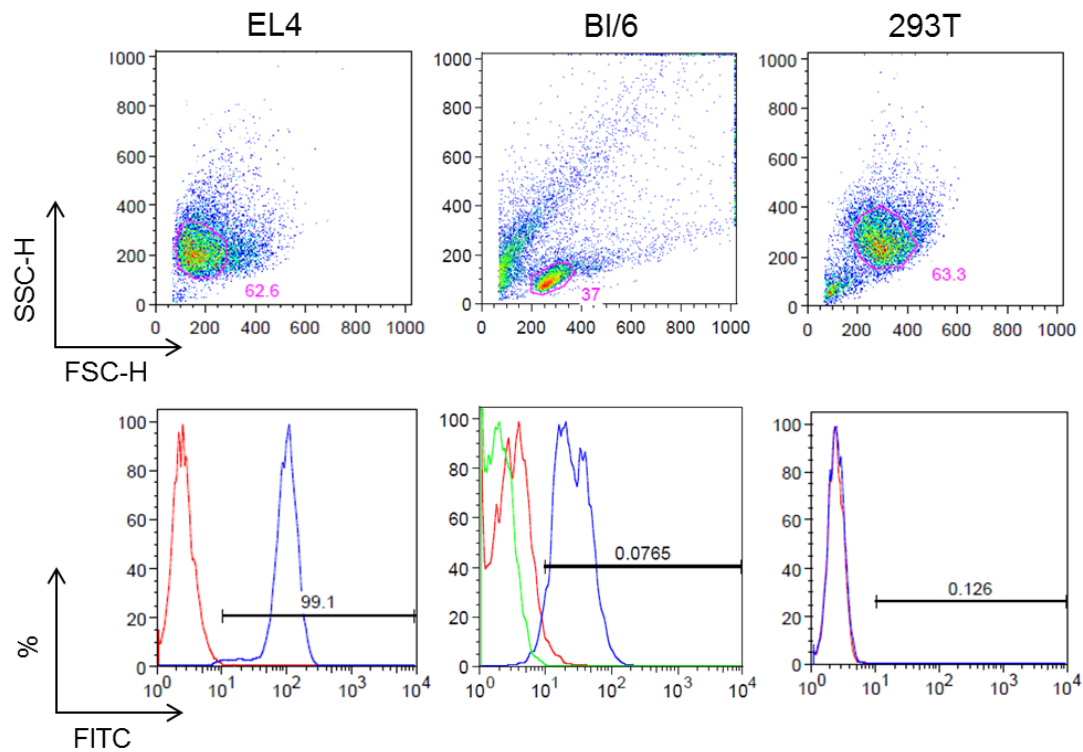


Abbildung 9: MHC-Klasse-I-spezifische extrazelluläre Färbung mittels FITC-markiertem anti-H2-Db Antikörper in der Durchflusszytometrie.

Zellpopulationen wurden im Lebendgate (oben) ausgewählt und auf FITC-Signal untersucht (unten). 99 % aller EL4 Zellen konnten mittels MHC-Klasse-I H2-Db Antikörper markiert werden. Isolierte Lymphozyten aus einer BI/6 Maus dienten als Positivkontrolle. HEK 293T Zellen fungierten als Negativkontrolle. Blau = Färbung mit MHC-Klasse-I H2-Db AK, rot = Färbung mit Isotyp-Kontrolle (unspezifisch), grün = ungefärbt.

Die Milzen der intramuskulär oder intranasal immunisierten Tiere wurden 12 Monate nach Applikation entnommen. Isolierte Lymphozyten (intramuskulär N = 3, intranasal N = 5) wurden mit den Luciferase-exprimierenden EL4 Zellen im Verhältnis 1:1 über Nacht stimuliert. Anschließend wurde die Produktion von IFN- γ mittels ELISpot bestimmt. Wie in Abbildung 10 illustriert, weisen beide Versuchsgruppen eine IFN- γ Antwort auf, was darauf hindeutet, dass diese T-Zellen nach intramuskulärer als auch intranasaler Immunisierung mit AAV9-Luci spezifisch auf das Transgen reagieren.

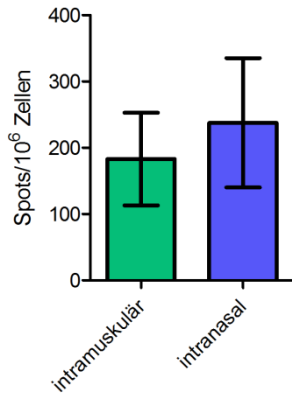


Abbildung 10: Zelluläre Luciferase-spezifische Immunantwort.

Immunisierung wie in Abbildung 7 beschrieben. Lymphozyten (intramuskulär N = 3, intranasal N = 5) wurden 12 Monate nach Immunisierung entnommen und mit Luciferase-transfizierten EL4 Zellen stimuliert.

Die Ergebnisse belegen, dass AAV9 als Transgen-übertragender Vektor zu einer lang anhaltenden Transgenexpression führt und eine humorale und zelluläre Immunantwort auslöst. Transgen-spezifische Antikörpertiter sinken zwischen sechs und 12 Monaten wieder. Transgen-spezifische T-Zell-Antworten konnten ein Jahr nach Immunisierung nachgewiesen werden.

4.3 HOMOLOGE SCHUTZWIRKUNG DER AAV-VERMITTELTEN NUKLEOPROTEINE VON INFLUENZA H1N1pdm09 UND PR8

Zur Produktion von AAV9-NP_{PR8} Vektoren wurde das Plasmid pAAV-NP_{PR8} generiert. Die für das Mausmodell Codon-optimierte Nukleotidsequenz des NP_{PR8}-Gens (coNP_{PR8}) wurde bei GenScript im Vektor pUC57 bestellt. Das NP_{PR8}-Gen wurde mit *HindIII/BamHI* aus dem pUC57 geschnitten und direkt in den ebenfalls *HindIII/BamHI*-verdauten pAAV-MCS ligiert. Ein Verdau zur Kontrolle des Gens im Vektor erfolgte mit *HindIII/BamHI*. Eine Kontrolle der ITR-Integrität des pAAV-Vektors wurde mit einem *SmaI*-Verdau durchgeführt. Die Nukleotidsequenz wurde außerdem mit den Oligonukleotiden Seq_pAAV_KF_2 und BGH rev in einer Sequenzierung überprüft.

Bevor das AAV9-vermittelte NP-basierte Vakzin im Mausmodell gegen einen heterologen Subtyp getestet werden sollte, wurde zunächst sichergestellt, dass die Vektoren gegen eine Infektion mit dem homologen Influenza Subtyp eine protektive Wirkung haben. Bl/6 Mäuse wurden dazu zweimal im Abstand von zwei Wochen (Prime/Boost) mit AAV9-NP_{pdm09}, AAV9-NP_{PR8} oder als Negativkontrolle mit AAV9-leer geimpft. Vor Immunisierung, zwei Wochen nach der ersten und zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung wurden Blutproben zur Bestimmung AAV9-spezifischer und NP-spezifischer Antikörpertiter im Serum genommen.

AAV9-spezifische Antikörper wurden mittels AAV9-ELISA nachgewiesen (wie beschrieben in Abschnitt 4.2). Für die Expression der rekombinanten Absorptionsproteine NP_{pdm09} und NP_{PR8} wurden die Transgene zunächst in den pET16b-Vektor kloniert. Das Gen NP_{pdm09} aus pAAV-NP_{pdm09} wurde mit NP_{pdm09}_NdeI_for_2 und NP_{pdm09}_XhoI_rev_3 amplifiziert, wobei am 5'-Ende eine NdeI- und am 3'-Ende des Produkt eine XhoI-Schnittstelle angefügt wurden. Das Gen NP_{PR8} aus pAAV-NP_{PR8} wurde ebenfalls unter Anfügen der beiden Schnittstellen NdeI und XhoI mit NP_{PR8}_NdeI_for_2 und NP_{pdm09}_XhoI_rev_3 amplifiziert. Die Produkte wurden über NdeI und XhoI in den pET16b-Vektor legiert.

Zur Detektion NP-spezifischer Antikörper wurde rekombinantes 6x-His-gekoppeltes (N-terminal), V5-markiertes (C-terminal) Nukleoprotein in *E. coli* hergestellt (siehe 3.3.2) und im 384-Well formatierten ELISA getestet. Auch hier wurde die Menge an rekombinantem Protein für jede Charge synthetisierten Proteins gegen einen kommerziellen primären Antikörper (anti-V5 IgG (Maus)) mit festgesetzter Konzentration des sekundären Antikörpers (anti-Maus IgG PO, 1:1,000) titriert.

Alle drei Versuchsgruppen wiesen sehr hohe AAV9-Titer und hohe NP-spezifische Titer auf (Abbildung 11).

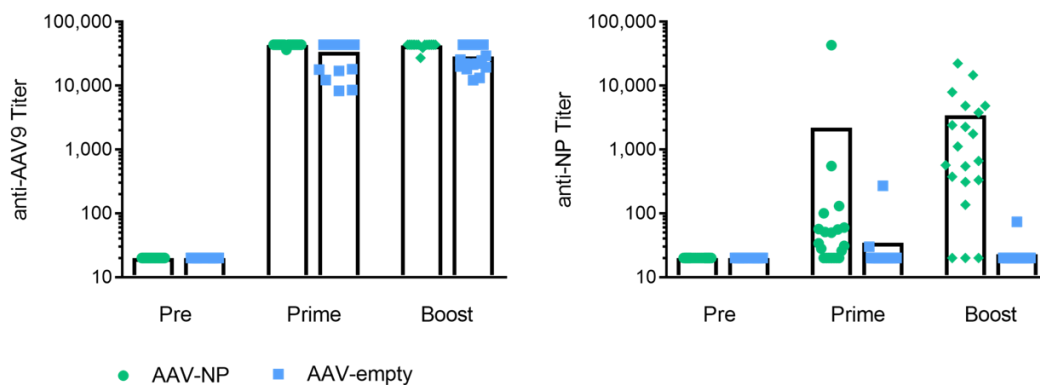


Abbildung 11: AAV- und NP-spezifische Antikörper-Antworten in Mäusen, immunisiert mit AAV-NP oder AAV-leer.

Tiere wurden zweimal (Prime/Boost) mit den Vektoren i.m. immunisiert. Titer wurden mittels AAV9- oder NP-ELISA ermittelt. Anti-AAV Antikörper wurden bereits nach der Prime-Immunsierung bei der Endpunktverdünnung detektiert. NP-spezifische Antworten entwickelten sich nach Prime-Immunsierung und steigerten sich nach dem Boost.

Drei Wochen nach Immunisierung konnten für NP-immunisierte Mäuse im ELISpot nach Stimulation mit dem immunodominanten CD8⁺ T-Zell Epitop NP₃₆₆₋₃₇₄ des jeweiligen Transgens reaktive IFN- γ -produzierende T-Zellen detektiert werden (Abbildung 12 oben). Die isolierten Lymphozyten zeigten eine geringe Kreuzreaktivität zu dem immunodominanten Epitop des heterologen H1N1-Stammes (jeweils pdm09 oder PR8) auf. Mit dem Leervektor immunisierte Tiere wiesen keine reaktiven T-Zellen auf (nicht dargestellt).

Eine durch Sipo *et al.* (179) nachgewiesene Schutzwirkung des Nukleoproteins des pandemischen Subtyps (pdm09) nach subletaler Infektion mit dem homologen H1N1pdm09 Virus konnte in dieser Arbeit reproduziert werden (Abbildung 12 links, grün). Da dieses humanpathogene Influenzavirus nur wenige Male durch Mäuse passagiert wurde, ist es nur geringfügig an das murine Modell adaptiert und daher auch in hoher Dosierung nur subletal. Aus diesem Grund überlebten 40 % der Kontrolltiere (AAV9-leer) die Infektion, wobei ein signifikanter Unterschied zur Versuchsgruppe bestand ($p = 0,0074$). Es war von Interesse sicherzustellen, dass das AAV-basierte System im homologen Modell gegen das Maus-adaptierte, sehr stark replizierende Virus PR8 auch eine protektive Wirkung aufbauen kann. Wie in Abbildung 12 (rechts, blau) zu erkennen, wurde eine CD8⁺ T-Zell-Antwort nach Stimulation mit NP₃₆₆₋₃₇₄ mittels ELISpot nachgewiesen. Nach Belastung mit einer letalen Dosis PR8 (3,5 MLD₅₀) überlebten alle Tiere die Infektion. Obwohl sie zunächst wie auch bei der Infektion mit H1N1pdm09 deutliche Symptome zeigten, konnten alle Mäuse das Virus aus dem Körper eliminieren. 100 % der Kontrolltiere mussten wie erwartet aufgrund von rapidem Gewichtsverlust bis zu 20 % des Originalgewichts euthanasiert werden.

Dies zeigt, dass die NP-basierte Immunisierung über den viralen Vektor AAV9 zu einer starken humoralen und zellulären Immunantwort führt. Die T-Zell-Antwort hat sowohl gegen das weniger adaptierte pandemische Influenzavirus (wie in Sipo *et al.*, 2011), als auch gegen das sehr stark pathogene Virus PR8, eine Schutzwirkung. Die NP-spezifischen Antikörper dienten in den Versuchen zum Nachweis einer erfolgreichen Immunisierung. Sie tragen zum protektiven Effekt durch das NP jedoch nicht bei, da sie keinen neutralisierenden Effekt haben.

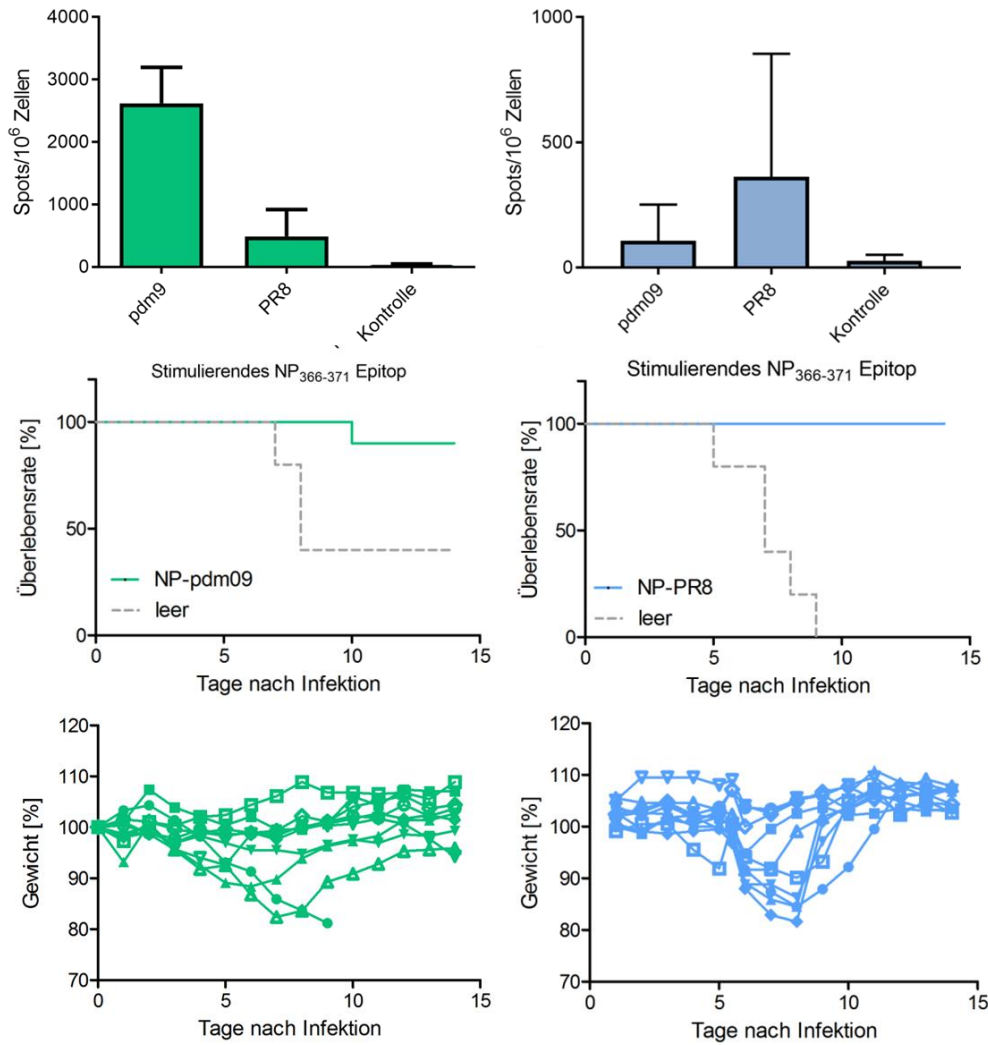


Abbildung 12: Immunisierung mit NP_{pdm09} (grün) oder NP_{PR8} (blau): CD8⁺ T-Zell Antworten (oben), Überlebensrate (mitte) und Gewichte (unten) im homologen Belastungsmodell.

Bl/6 Mäuse wurden mit AAV9-NP_{pdm09} (links, grün) oder -NP_{PR8} (rechts, blau) immunisiert. 3 Wochen nach Vektor Applikation bestehen starke CD8⁺ T-Zell Antworten gegen das immunodominante CD8⁺ T-Zell Epitop des Transgens mit geringer Kreuzreaktivität gegen das Epitop des heterologen Subtyps (NP_{pdm09}: N = 5; NP_{PR8}: N = 2). 90 % (NP_{pdm09}) bzw. 100 % (NP_{PR8}) der Tiere (N = 10) überlebten eine subletale (pdm09) bzw. letale (PR8) Infektion.

4.4 HETEROLOGE SCHUTZWIRKUNG DES AAV-VERMITTELTES INFLUENZA H1N1PDM09 NUKLEOPROTEINS

Sipo *et al.* determinierten 2011 die Immunantwort und die Schutzwirkung eines trivalenten AAV9-basierten Impfstoffes, welcher die Transgene HA, M1 und NP des pandemischen H1N1 überträgt. Immunisierung resultierte in der Produktion neutralisierender Antikörper gegen H1N1pdm09, welche jedoch nicht PR8

neutralisieren konnten. Außerdem wurde eine zelluläre Immunantwort gegen CD8⁺ T-Zell Epitope des NP_{pdm09} induziert. Eine Kreuzreaktivität gegen PR8 wurde nicht untersucht. Gegen das M1-Protein konnte keine funktionelle zelluläre Immunantwort detektiert werden. Wurden die immunisierten Tiere mit einer letalen Dosis PR8 belastet, waren 40 % der Tiere vor einem tödlichen Verlauf der Infektion geschützt. Da die Antikörper gegenüber PR8 nicht neutralisierend waren, und eine zelluläre Immunantwort nur gegen das NP gerichtet war, wurde geschlossen, dass ein protektiver Effekt der Dreifach-Vakzine auf der NP-spezifischen CD8⁺ Antwort beruhte. Daraufhin wurde angenommen, dass eine alleinige AAV-basierte Impfung mit dem NP_{pdm09} auch gegen eine Belastung mit PR8 schützen kann.

Wurden die Tiere mit AAV9-NP_{pdm09} (wie oben beschrieben) immunisiert und drei Wochen nach Immunisierung mit einer letalen Dosis (3,5 MLD₅₀) des heterologen PR8 belastet, erlitten alle Tiere starke Influenza-spezifische Symptome. Innerhalb von acht Tagen nach der Infektion mussten sowohl alle Mäuse der Testgruppe als auch die Tiere der Kontrollgruppe nach 20 % Gewichtsverlust euthanasiert werden, obwohl, wie in Abbildung 12 (oben links, grün) dargestellt, eine geringe Reaktivität gegenüber dem immunodominanten CD8⁺ T-Zell Epitop des Nukleoproteins des PR8-Subtyps bestand.

Das Ergebnis deutet darauf hin, dass, entgegen der Annahme, bei denen von Sipo und Kollegen (2011) durchgeführten Belastung nach Immunisierung mit dem trivalenten AAV-Vakzin, der partielle heterologe Schutz eben nicht nur durch eine NP-spezifische T-Zell-Antwort induziert wurde. Der Versuch mit dem monovalenten AAV-NP zeigt, dass doch andere Komponenten eine Rolle gespielt haben müssen. Genauer soll dazu in der Diskussion eingegangen werden.

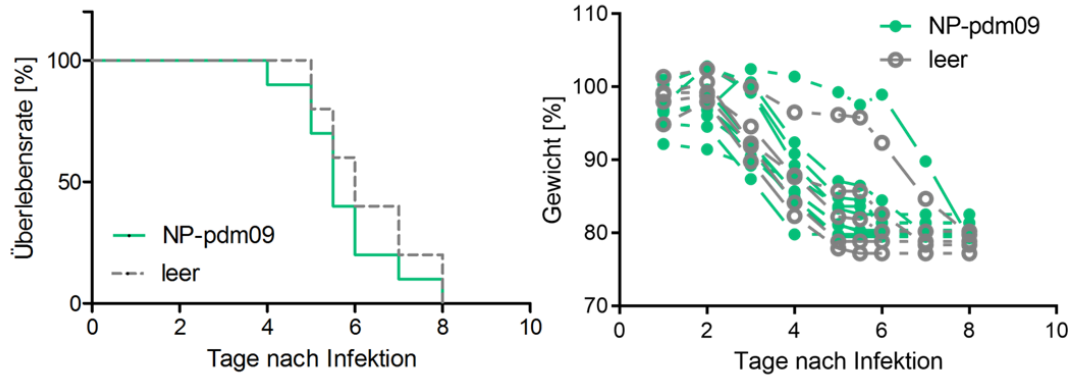


Abbildung 13: Immunisierung mit AAV9-NPpdm09: Überlebensrate (links) und Gewichte (rechts) nach heterologer Infektion mit Influenza H1N1 PR8.

Bl/6 Mäuse wurden mit AAV9-NP_{pdm09} immunisiert. Drei Wochen nach Immunisierung erhielten sie eine letale Dosis PR8. Sowohl Kontroll- als auch immunisierte Mäuse erreichten innerhalb von acht Tagen den humanen Endpunkt von 20 % Gewichtsverlust.

4.5 EINFLUSS DES IMMUNODOMINANTEN CD8⁺ T-ZELL EPITOPS NP₃₆₆₋₃₇₄ AUF HETEROLOGEN SCHUTZ

Nach Alignierung der Aminosäuresequenzen der Nukleoproteine von H1N1pdm09 und PR8, konnte eine starke Identität von 91,4 % festgestellt werden (455/498, EMBOSS Needle Alignment, nicht dargestellt). Bei derart hoher Sequenzgleichheit kann angenommen werden, dass durch Immunisierung aktivierte T-Zellen kreuzreaktiv gegen das heterologe NP sind. Wie in Abschnitt 4.3 beschrieben besteht eine geringe Reaktivität gegen heterologe Nukleoproteine, die jedoch nicht protektiv ist (Abschnitt 4.4). Da eine Immunisierung mit dem Nukleoprotein im homologen Modell jedoch 100 % der Tiere schützt und im heterologen Modell 0 %, stellte sich die Frage, auf welche Sequenzdivergenzen diese starke Differenz zurückzuführen ist. Es konnte im Versuch mit Bl/6 Mäusen gezeigt werden, dass die CD8⁺ T-Zellen hauptsächlich gegen das Epitop NP₃₆₆₋₃₇₄ (immunodominant) reagieren, während andere Epitope nur einen sehr geringen oder vernachlässigbaren Anteil der Antwort ausmachen (179). Dass Veränderungen der Aminosäurereste, welche für die Bindung an das MHC-Klasse-I-Molekül oder T-Zell Rezeptor (TCR) verantwortlich sind, die Reaktivität der T-Zelle gegenüber dem Nukleoprotein stark beeinflusst, wurde ebenfalls bereits *in vitro* (185) und im Mausmodell (186) nachgewiesen. Natürlich auftretende Mutationen

in CTL-Epitopen ermöglichen es dem Influenzavirus nachweislich einer Immunantwort in der menschlichen Bevölkerung zu umgehen (187,188).

Die Bedeutung dieses NP₃₆₆₋₃₇₄ Epitops bei der Schutzwirkung im H2-Db Modell wurde qualitativ untersucht, jedoch noch nicht quantifiziert. Hierzu wurde in dieser Arbeit eine Mutante des Nukleoproteins von A/Mexico/4603/2009 generiert, bei der die Aminosäure 371 Valin gegen Methionin (V371M) durch eine Punktmutation in der Gensequenz an Position 1.111 (G1.111A) ausgetauscht wurde. Als Matrize für die Mutagenese-PCR mit den Oligonukleotiden Mut_NP_{pdm09}_G1111A for und Mut_NP_{pdm09}_G1111A rev diente das Plasmid pAAV-NP_{pdm09}. Das PCR-Produkt mit der Aminosäuresubstitution wurde folglich pAAV-NP_{V371M} bezeichnet. Das Produkt wurde durch einen Restriktionsverdau mit *HinIII/BamHI* und mit *SmaI* kontrolliert. Eine Sequenzierung mit Seq_pAAV_KF_2 und BGH rev diente der Bestätigung der Nukleotidsequenz des Transgens. Für den Nachweis von NP_{V371M}-spezifischen Antikörpern mittel ELISA (Verweis MM) wurde rekombinantes NP_{V371M} wie für NP_{pdm09} und NP_{PR8} beschrieben in *E. coli* synthetisiert. Das dafür erforderliche Plasmid pET16b-NP_{V371M} wurde nach Amplifikation des Gens *NP_{V371M}* aus pAAV-NP_{V371M} durch Klonierung über *NdeI/XhoI* erzeugt. Die optimale Konzentration des rekombinanten Proteins wurde für jede Charge gegen den primären Antikörper (anti-V5 IgG (Maus)) mit festgesetzter Konzentration des sekundären Antikörpers (anti-Maus IgG PO, 1:1,000) durch Titration ermittelt.

Bl/6 Mäuse wurden mit AAV9-NP_{V371M} (wie bereits in Abschnitt 4.3 oder 4.4 beschrieben) immunisiert. Drei Wochen nach Immunisierung wurden wie zuvor Milzen zur Bestimmung der CD8⁺ T-Zell Antwort entnommen. Gegen das eingefügte Epitop NP₃₆₆₋₃₇₄ von PR8 wurde eine sehr starke T-Zell-Antwort gemessen. Nach Stimulation mit dem Epitop des pandemischen Subtyps pdm09 wurde eine deutlich geringere IFN- γ Produktion detektiert, obwohl dennoch eine starke Kreuzreaktivität konstatiert werden kann (Abbildung 14 oben). Nach einer Infektion mit einer letalen Dosis PR8, zeigten 50 % der Tiere nur einen moderaten Gewichtsverlust von unter 10 %. Fünf von den zehn infizierten Tieren verloren sehr schnell bis zu 20 % Gewicht. Davon erholte sich jedoch ein Tier wieder und überlebte die Belastung. Insgesamt überlebten 60 % der Mäuse die Infektion. Wurden die Tiere aufgrund eines zu starken

ERGEBNISSE

Gewichtsverlusts oder nach überstandener Belastung am Ende der 14-tägigen Beobachtungsphase euthanasiert, wurden die Lungen entnommen und histopathologisch untersucht. Die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin lässt bei Tieren, welche den humanen Endpunkt erreichten, deutliche Infiltration von Immunzellen erkennen. Außerdem konnte Influenzavirus im Lungengewebe mittels Immunohistochemie spezifisch nachgewiesen werden (Abbildung 14, unten rechts).

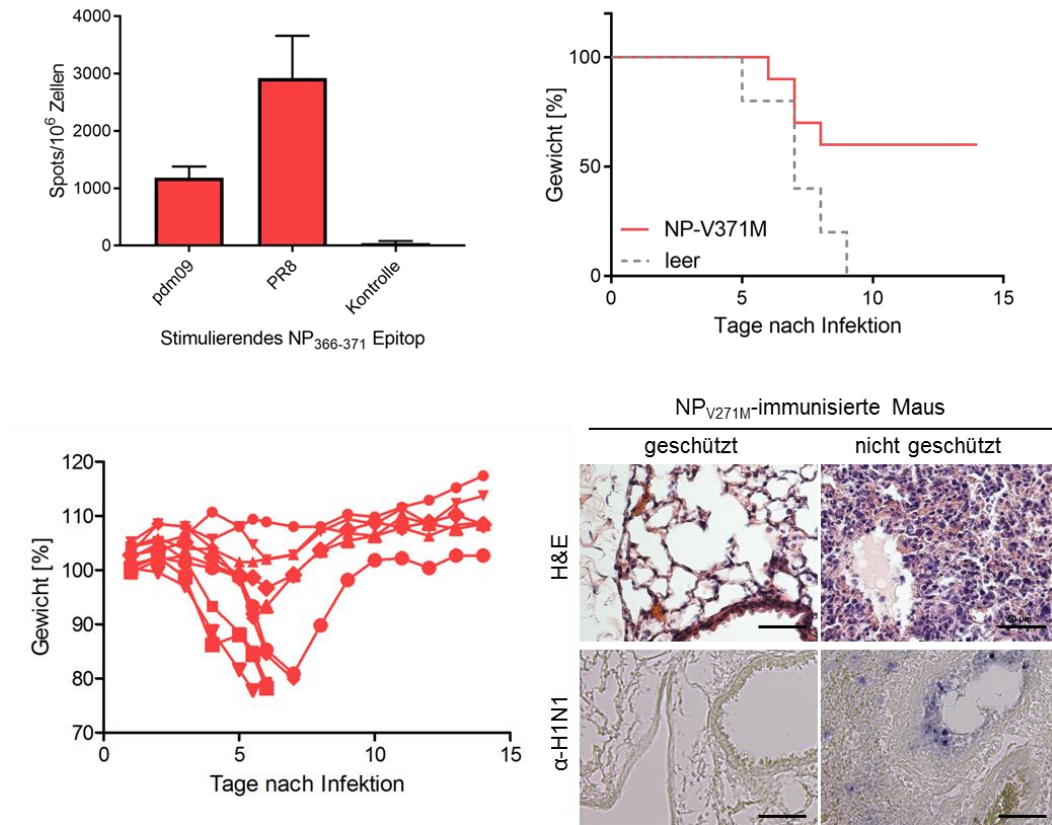


Abbildung 14: Immunisierung mit NP_{V371M}: CD8⁺ T-Zell Antworten (oben links), Überlebensrate (oben rechts) und Gewichte (unten links) nach letaler Belastung mit PR8. Unten links: Histopathologie von Schnitten der Lunge belasteter Tiere.

Bl/6 Mäuse wurden mit AAV9-NP_{V371M} oder AAV-leer (Kontrollgruppe) immunisiert. Drei Wochen nach Vektor-Applikation wurden starke T-Zell-Antworten gegen das immunodominante CD8⁺ T-Zell Epitop des PR8-Subtyps und kreuzreaktive schwächere Antworten gegen das Epitop des pdm09-Subtyps ermittelt (N = 5). 60 % der Tiere (N = 10) überlebten eine letale Infektion mit PR8. Zur histopathologischen Untersuchung nach Infektion wurden den Tieren bei Erreichen des humanen Endpunktes oder nach 14-tägiger Beobachtungsphase die Lunge entnommen: H&E = Hämatoxylin und Eosin-Färbung, anti-H1N1 = Färbung mit Influenza A H1N1-spezifischem Antikörper. Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen von drei Lungen einer Gruppe. Maßstab ist 50 µm.

4.6 UNTERSUCHUNG EINER CD8⁺ T-ZELL EPITOPKETTE RELEVANTER INFLUENZA-SUBTYPEN BEZÜGLICH IMMUNOGENITÄT UND SCHUTZWIRKUNG

Nachdem der starke Einfluss des einzelnen Epitops verdeutlicht wurde, war der Ansatz eine Peptidkette zu testen. Diese enthält alle möglichen relevanten CD8⁺T-Zell Epitope des NPs, um so eine möglichst Subtyp-übergreifende, breite zelluläre Antwort zu generieren. Es wurden rekombinante AAVs hergestellt, die eine Kette der NP-Epitope (Nonamere) aller bekannter Influenza-Subtypen, die mit dem MHC-Klasse-I-Typ H2-Db legieren, kodieren. Das pAAV-Plasmid zur Synthese der Viruspartikel (AAV-Epitopkette) wurde von Isaac Sipo zur Verfügung gestellt. Die Expression des aus 63 Nonameren bestehenden Transgens wurde zunächst *in vitro* nachgewiesen. Wie die obigen Mausexperimente wurden auch im vorliegenden Versuch Bl/6-Mäuse mit den AAVs, welche die Epitopkette kodieren, oder dem Kontrollvektor AAV-leer immunisiert. Drei Wochen nach Verabreichung des Vektors wurde eine Gruppe zur Isolierung der Milzzellen euthanasiert. Weitere Tiere wurden mit einer letalen Dosis PR8 infiziert und zwei Wochen auf Gewichtsreduktion und weitere Symptome hin überwacht. Abbildung 15 stellt dar, dass die Epitopkette starke CTL-Antworten gegen das immunodominante Epitop NP₃₆₆₋₃₇₄ der Subtypen PR8 und pdm09 induziert (oben links). Nach letaler Belastung mit PR8 erreichten alle Tiere der Kontrollgruppe (leer) als auch der Versuchsgruppe (Epitopkette) den humanen Endpunkt von 20 % Gewichtsverlust und wurden schmerzfrei getötet (oben rechts, unten links). Den Tieren wurden die Lungen zur histopathologischen Bewertung entnommen (unten rechts). Die Lungen der Kontrollgruppe zeigten deutliche Symptome einer Influenza-bedingten Pneumonie mit massiver Infiltration von Immunzellen und Gewebebeschädigungen. Tiere der Versuchsgruppe zeigten weniger stark ausgeprägte Symptome. Es waren deutlich die Alveolen erkennbar, was auf eine geringere Infiltration und Zerstörung der Lungenstruktur hinweist. Influenza A (H1N1)-spezifische Antikörper färbten dagegen die Lungenschnitte der Versuchsgruppe sehr stark an, wobei die Färbung weniger intensiv bei Proben der Kontrollgruppe wirkte. Dies deutet auf eine massive Replikation des Virus hin, was mit dem rapiden Gewichtsverlust korrelierte.

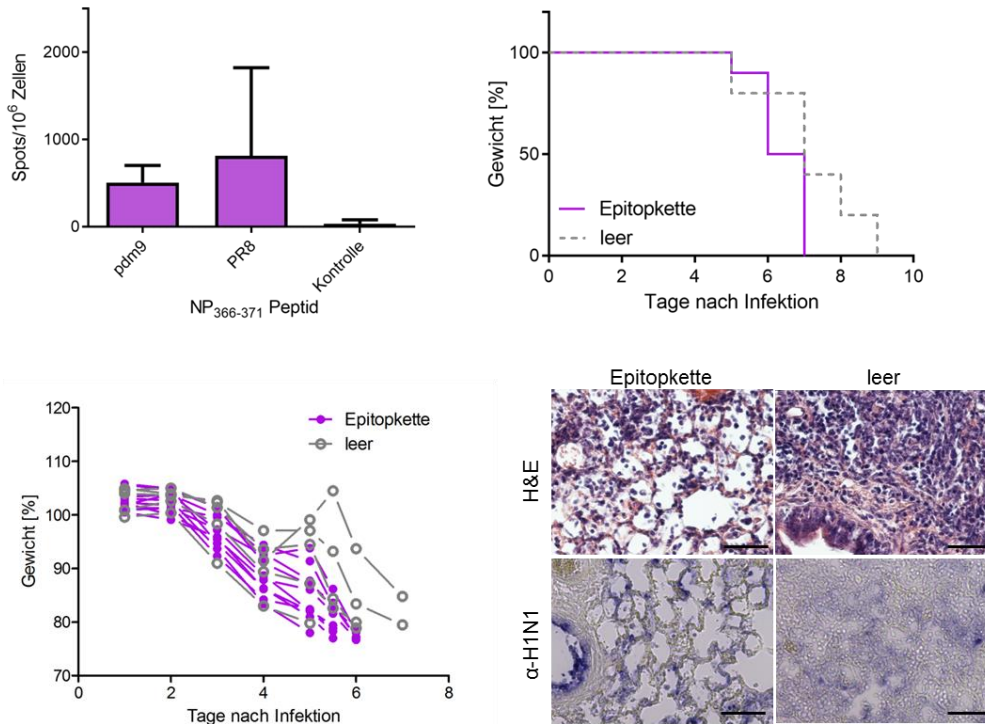


Abbildung 15: Immunisierung mit der Epitopkette: T-Zell-Antworten (oben links), Überlebensrate (oben rechts) und Gewichte (unten links) nach letaler Belastung mit PR8. Unten links: Histopathologie von Schnitten der Lunge belasteter Tiere.

Bl/6 Mäuse wurden mit AAV9-Epitopkette oder AAV-leer (Kontrollgruppe) immunisiert. Drei Wochen nach Vektor-Applikation wurden starke CD8⁺ T-Zell Antworten gegen das immunodominante CD8⁺ T-Zell Epitop der Subtypen PR8 und pdm09 ermittelt (N = 5). Alle Tiere (N = 10) wurden aufgrund starken Gewichtsverlusts eingeschläfert. Zur histopathologischen Untersuchung nach Infektion wurde den Tieren bei Erreichen des humanen Endpunktes die Lunge entnommen: H&E = Hämatoxilin und Eosin-Färbung, anti-H1N1 = Färbung mit Influenza A H1N1-spezifischem Antikörper. Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen von drei Lungen einer Gruppe. Maßstab ist 50 µm.

4.7 UNTERSUCHUNG DER FUNKTIONALITÄT ZYTOTOXISCHER T-ZELLEN

IN VIVO

Obwohl isolierte Lymphozyten im *in vitro* Assay (ELISpot) nach Stimulation mit den CD8⁺ T-Zell Epitopen IFN-γ produzieren, scheinen sie das Virus nicht aus dem infizierten Tier eliminieren zu können. Zur Untersuchung der Effizienz der CTLs *in vivo* wurde ein Assay entwickelt, bei dem der Abbau Epitop-präsentierender Zellen über die Zeit verfolgt werden kann.

Standardmäßig wird die CTL Effizienz *in vivo* getestet, indem aus naiven Mäusen Lymphozyten isoliert werden (Donorzellen). Ein Teil der Zellen wird mit dem Epitop

inkubiert, welches an die MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Oberfläche bindet und zusätzlich mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE markiert. Ein zweiter Teil der Zellen bleibt naiv (ohne Epitop) und wird mit einer anderen Konzentration CFSE markiert. Beide Zellpopulationen werden in immunisierte Tiere intravenös injiziert. Besteht eine funktionelle CTL-Antwort, werden die Epitop-markierten Zellen abgebaut, wobei die naiven nicht lysiert werden. Nach Inkubation im Tier werden die Milzzellen entnommen und mittels Durchflusszytometrie werden die beiden CFSE-Populationen quantifiziert. Dies dient dem Nachweis des Abbaus der Epitop-präsentierende Zellen.

Der Vorteil des in dieser Arbeit zu entwickelten Assays ist, dass die Tiere nicht getötet werden müssen, um das Signal des Markers zu ermitteln. In diesem neuen Assay können die Zellen anstelle mit CFSE in einem Durchflusszytometer anhand von Biolumineszenz durch *in vivo* Imaging im lebenden Tier gemessen werden. So kann zu mehreren Zeitpunkten die CTL-vermittelte Lyse Epitop-markierter Zellen ermittelt werden.

4.7.1 ETABLIERUNG DES TESTS ZUR UNTERSUCHUNG DER CTL-EFFIZIENZ IM LEBENDEN TIER

Als Donorzellen dienten MC57G Zellen. Diese Zelllinie entstammt einem Fibrosarkom einer C57Bl/6 Maus und exprimiert daher den entsprechenden MHC-Klasse-I-Haplotyp H2-Db. Obwohl die Zellen einem Tumor entstammen, führen sie nicht zur Entstehung von Tumoren, da sie vom Immunsystem abgestoßen werden (189,190). Die Tumor-spezifische Reaktion mit einhergehender Reduktion der Luciferase-Aktivität musste als Hintergrundeffekt entsprechend berücksichtigt werden. Verschiedene Methoden zum Einbringen des *luciferase* kodierenden pAAV-Luci Plasmids wurden getestet, wonach eine Transfektion mit Effektene die besten Expressionraten von bis zu 50 % hervorbrachte (nicht dargestellt). Transfizierte Zellen sollten mit dem entsprechenden Epitop beladen und in immunisierte Tiere injiziert werden. Zirkulieren funktionelle CTLs im Tier, werden die Luciferase-exprimierenden Zellen abgebaut, was mit einer Reduktion der Luciferase-Aktivität einhergeht (Abbildung 16).

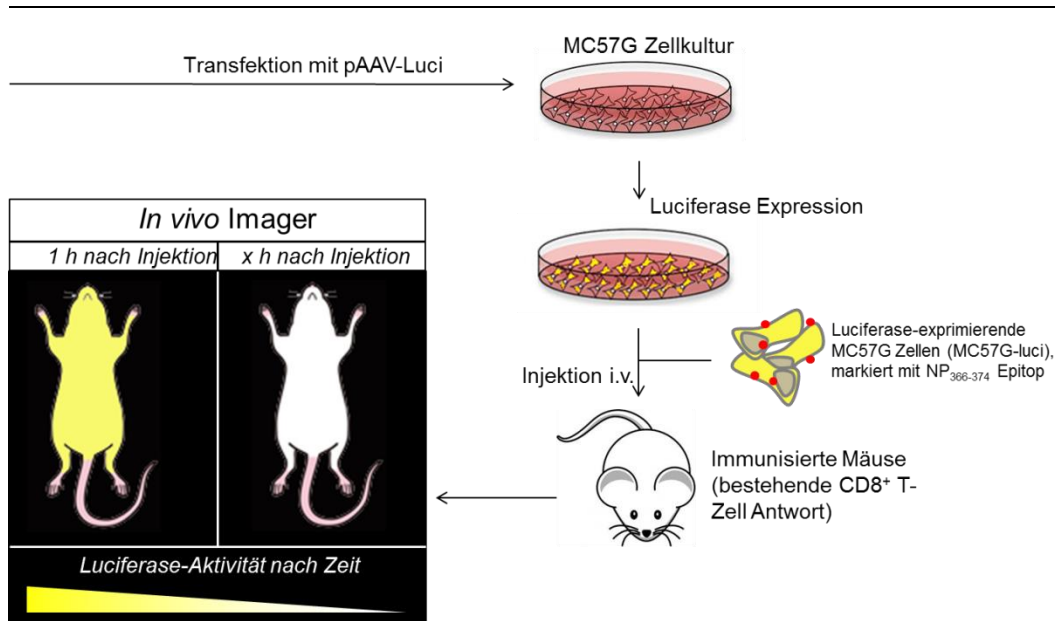


Abbildung 16: Schema des Assays zur Ermittlung der Effizienz der CTLs mittels *in vivo* Imaging.

MC57G Zellen werden mit pAAV-Luci transfiziert. Luciferase-exprimierende Zellen werden mit dem immunodominanten Epitop NP₃₆₆₋₃₇₄ markiert und in immunisierte C57Bl/6-Albino-Mäuse intravenös injiziert. Mittels *in vivo* Imaging werden die Zellen anhand ihrer Luciferase-Expression im Tier nachgewiesen. Das Signal wird über einen entsprechenden Zeitraum verfolgt. Bei bestehender CTL-Antwort werden die Epitop-präsentierenden Zellen abgebaut, wobei eine Gruppe nicht-immunisierte Mäuse als Kontrolle zur Bestimmung des Hintergrundeffekts dient.

Transfizierte Zellen wurden zunächst *in vitro* getestet. Sie wurden mit dem Epitop NP₃₆₆₋₃₇₄ markiert und im ELISpot Assay als Präsentierzellen zur Stimulation isolierter Lymphozyten zuvor immunisierter Mäuse eingesetzt. Die verwendeten Lymphozyten wurden bereits positiv auf eine funktionelle CD8⁺ T-Zell Antwort getestet. Eine starke IFN- γ Produktion der Zellen im ELISpot wies die Bindung des Epitops an die Luciferase-exprimierenden Zellen *in vitro* nach (nicht dargestellt). In einem weiteren Vorversuch wurden die transfizierten Zellen naiven Mäusen in die Schwanzvene injiziert. Innerhalb von 12 Stunden wurden sechs Luciferase Messungen mittels *in vivo* Imaging durchgeführt (Abbildung 17). Die Luciferase-Aktivität ist lokal im Brustbereich detektierbar, was auf eine Akkumulation der Zellen im Gefäßsystem der Lunge hindeutet. Innerhalb von 12 Stunden nach Injektion nimmt die Aktivität stark ab. 24 Stunden nach Injektion ist kein Luciferase-Signal mehr detektierbar. Dies zeigt, dass durch Tumor-spezifische Abwehr die MC57G Zellen innerhalb von 12 Stunden nahezu vollständig abgebaut werden. Für den Versuch wurde daher im Weiteren ein Beobachtungsfenster von 12 Stunden nach Injektion gewählt.

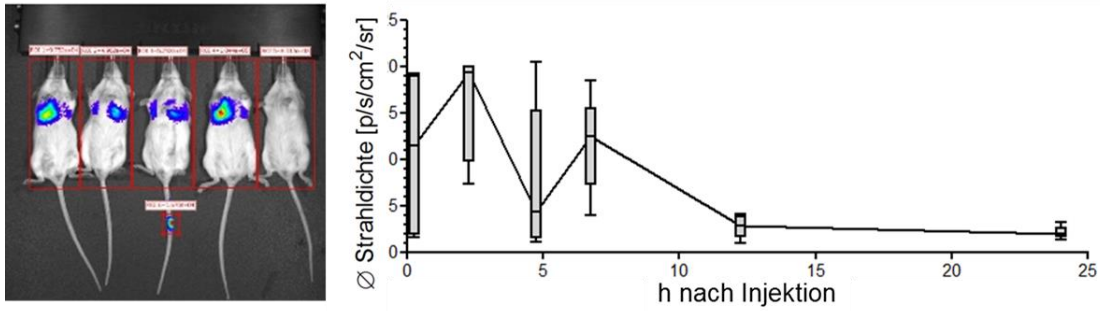


Abbildung 17: Vorversuch des *in vivo* CTL-Assays. Detektion Luciferase-exprimierender MC57G Zellen *in vivo*.

MC57G Zellen wurden mit pAAV-Luci transfiziert. Die Zellen wurden in die Schwanzvene naiver Bl/6 Albino-Mäuse injiziert. Bis 12 h nach i.v. Injektion wurde die Luciferase-Aktivität zu sechs Zeitpunkten mittels *in vivo* Imaging bestimmt. Die Zellen akkumulieren im Bereich der Lunge und werden innerhalb von 12 h nahezu komplett abgebaut.

Zunächst sollten unter diesen Versuchsbedingungen zwei Gruppen miteinander verglichen werden: eine Versuchsgruppe mit bekannter funktioneller T-Zell-Antwort (positiv) und eine Gruppe ohne nachweisbare Antwort (negativ). Eine Gruppe Mäuse wurde mit AAV-NP_{PR8} immunisiert (positiv). Einer zweiten Kontrollgruppe wurde AAV-leer verabreicht (negativ). Die MC57G Zellen wurden mit dem Epitop NP₃₆₆₋₃₇₄ des Subtyps PR8 beladen und in Tiere beider Gruppen simultan i.v. injiziert. Abbildung 18 zeigt bei den Tieren der Kontrollgruppe (leer) eine langsame Reduktion der Luciferase-Aktivität innerhalb von 12 Stunden nach Injektion. Verglichen dazu war der Rückgang der Luciferase-Aktivität in der Versuchsgruppe (NP_{PR8}) signifikant stärker ($p < 0,05$). Während sechs Stunden nach Injektion der Zellen bei der Kontrollgruppe noch deutlich Luciferase-Aktivität detektierbar war, konnte bei der Versuchsgruppe ein starker Rückgang gemessen werden. 12 Stunden nach Injektion konnte unter den gewählten Einstellungen in der Versuchsgruppe kein Signal mehr ermittelt werden, während in der Kontrollgruppe alle Tiere noch ein Signal im Bereich der Lunge aufwiesen. Während der Rückgang des Signals in der Kontrollgruppe auf die Abstoßung der Tumorzellen zurückzuführen ist, kann die Signalreduktion bei der Versuchsgruppe auf eine CTL-basierte Lyse der Epitop-präsentierenden Zellen geschlossen werden. Die Ermittlung einer funktionellen CTL Antwort im lebenden Tier mittels *in vivo* Imaging konnte anhand dieses Versuchs etabliert werden.

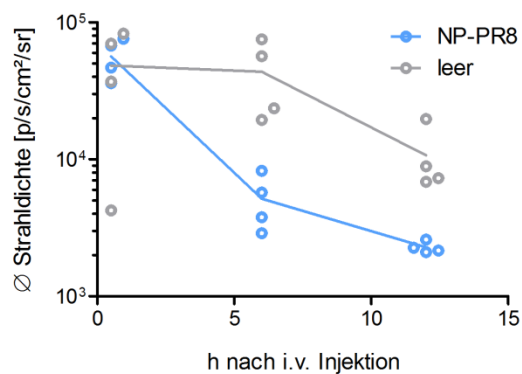


Abbildung 18: Vergleich der Funktionalität zytotoxischer T-Zellen, induziert von AAV-NP_{PR8}-immunisierten Mäusen oder AAV-leer-immunisierten Mäusen, anhand des *in vivo* CTL Assays.

Den Tieren beider Gruppen wurden simultan Luciferase-exprimierende MC57G Zellen, beladen mit dem Epitop NP₃₆₆₋₃₇₄ des Subtyps PR8, in die Schwanzvene injiziert. Die Luciferase-Aktivität

wurde direkt danach, sowie sechs und 12 h nach Injektion mittels *in vivo* Imaging ermittelt. Ein Tumorspezifischer Rückgang konnte für die Kontrollgruppe (leer) detektiert werden, während die CTL-vermittelte Lyse der Zellen in immunisierten Tieren zu einem signifikant stärkerem Rückgang führte (N = 4, $p < 0,5$).

4.7.2 MITTELS EPITOPKETTE INDUZIERTE ZYTOTOXISCHE T-ZELLEN SIND *IN VIVO* NICHT FUNKTIONELL

Nachdem der Test zur Untersuchung der Funktionalität der CTLs mittels *in vivo* Imaging mit einer positiv reagierenden Gruppe und einer Kontrollgruppe erfolgreich entwickelt wurde, sollten Tiere, welche mit der Epitopkette immunisiert wurden (siehe Abschnitt 4.6), ebenfalls vergleichend zu einer Kontrollgruppe getestet werden. Es wurde wie zuvor verfahren: Luciferase-exprimierende Zellen wurden mit dem Epitop NP₃₆₆₋₃₇₄ beladen und i.v. in Tiere beider Versuchsgruppen simultan injiziert.

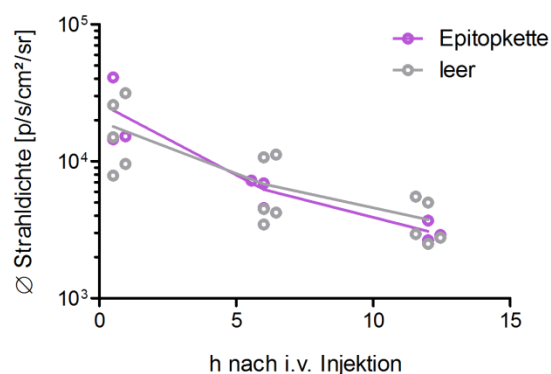


Abbildung 19: Nutzung des *in vivo* CTL Assays zum Vergleich der Funktionalität zytotoxischer T-Zellen, induziert von Mäusen, immunisiert mit AAV-vermittelter Epitopkette oder AAV-leer.

Den Tieren beider Gruppen wurden simultan Luciferase-exprimierende MC57G Zellen, beladen mit dem Epitop NP₃₆₆₋₃₇₄ des Subtyps PR8, in die Schwanzvene injiziert. Die Luciferase-Aktivität

wurde direkt danach, sowie sechs und 12 h nach Injektion mittels *in vivo* Imaging ermittelt. Ein Tumorspezifischer Rückgang konnte bei allen Tieren detektiert werden. Zwischen Versuchsgruppe (Epitopkette) und Kontrollgruppe konnte kein Unterschied festgestellt werden (N = 4, $p > 0,5$).

Wie in Abbildung 19 dargestellt wiesen beide Versuchsgruppen unmittelbar nach Injektion der Zellen vergleichbare Signale auf. Sechs Stunden nach Applikation der

Zellen wurde bei allen Tieren der beiden Gruppen ein Rückgang ermittelt, welcher sich nicht unterschied. Weitere sechs Stunden später wurden wieder vergleichbare Luciferase-Aktivitäten gemessen, was darauf hindeutet, dass hier keine CTL-basierte Lyse der injizierten Zellen stattgefunden hat. Somit ist der Befund nicht-funktioneller zytotoxischer T-Zellen nach Immunisierung mit der Epitopkette unterstützt. Obwohl die Zellen *in vitro* nach Stimulation mit dem Epitop NP₃₆₆₋₃₇₄ IFN- γ produzieren, reagieren sie *in vivo* nicht zytotoxisch.

4.8 REDUKTION DER VIRUSLAST NACH INFEKTION MIT PR8

In einem gesonderten Mausexperiment sollte ergänzend zu den oben beschriebenen Parametern (T-Zell-Antwort und Überlebensrate bzw. Gewichtsreduktion) für alle AAV-vermittelten Impfvektoren (NP_{PR8}, NP_{pdm09}, NP_{V371M} sowie die Epitopkette) gezeigt werden, dass ein protektiver Effekt durch die Reduktion von replikationskompetentem Belastungsvirus PR8 im Lungengewebe einhergeht. Zum direkten Vergleich wurden dazu alle Vektoren parallel in einem Versuch getestet. Mäuse wurden wie beschrieben (siehe Abschnitt 3.4.2) mit den AAV-Vektoren intramuskulär immunisiert und drei Wochen nach Immunisierung mit 3,5 MLD₅₀PR8 belastet. Zur Bestimmung der Viruslast wurden die Lungen nach der Belastung entnommen. Die Entnahme sollte zum Zeitpunkt der maximalen Replikation des Virus in den Alveolen vor einer möglichen Eradikation durch aktivierte zytotoxische T-Zellen oder dem Tod des Tieres stattfinden. Nach Brandes und Kollegen ist der optimale Zeitpunkt für diesen schnell replizierenden Subtyp 72 Stunden nach Infektion (191), weshalb die Lungenentnahme drei Tage nach Belastung vorgenommen wurde. Die Viruslast wurde nach Infektion von MDCK Zellen mit dem Lungenhomogenisat mittels Influenza A (H1N1)-spezifischen ELISA detektiert. Wie in Abbildung 20 (A) dargestellt, konnte die Viruslast nach Immunisierung mit AAV-NP_{PR8} (N = 5) verglichen zur Kontrollimmunisierung mit AAV-leer (N = 4) signifikant ($p = 0,0067$) reduziert werden. Auch Immunisierung mit dem Vektor AAV-NP_{V371M} (N = 5), welcher 60 % der Tiere vor der letalen Belastung schützte zeigte eine signifikante ($p = 0,0160$) Reduktion der Viruslast, was die protektive Wirkung des Epitops NP_{V371M} unterstreicht. Weniger stark ausgeprägt aber dennoch signifikant war der Effekt des AAV-NP_{pdm09}-Vektors (N = 5) auf die Viruslast. Obwohl alle immunisierten Tiere infolge der starken Belastung

euthanasiert werden mussten, konnte im Vergleich zu den Kontrolltieren eine geringere Viruslast ($p = 0,0242$) an Tag drei nach Infektion festgestellt werden. Kein Unterschied wurde zwischen den Tieren, welche mit der Epitopkette immunisiert wurden ($N = 5$) und den Kontrolltieren detektiert ($p = 0,1094$).

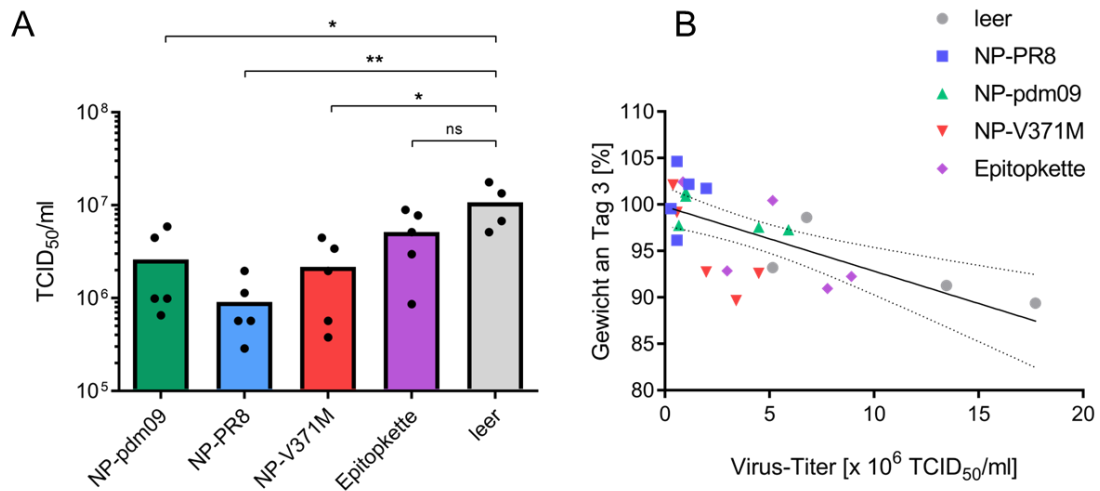


Abbildung 20: Viruslast (A) und Korrelation mit Gewicht (B) drei Tage nach Infektion mit PR8 in Lungen immunisierter Mäuse.

Mäuse wurden mit AAV-Vektoren wie in der Abbildung indiziert immunisiert. Drei Tage nach Injektion wurden die Tiere mit 3,5 MLD₅₀ des Influenzavirus PR8 infiziert. Replikationskompetentes Virus wurde ermittelt (A) und gegen Kontrolltiere (AAV-leer) ausgewertet. Signifikante Reduktion der Viruslast wurde bei der Gruppe NP_{PR8} ($p = 0,0067$) ermittelt. Signifikante Reduktion fand bei NP_{V371M}-immunisierten Tieren ($p = 0,0160$), aber auch NP_{pdm09}-immunisierten Tieren ($p = 0,0242$) statt. Keine Reduktion wurde festgestellt bei Tieren, welche mit der Epitopkette immunisiert wurden ($p = 0,1094$). Viruslast korreliert signifikant ($p = 0,0004$, lineare Regression $R^2 = 0,4356$) mit dem Gewichtsverlust der Tiere an Tag drei nach Belastung ($p = 0,0067$). p -Werte wurden mittels ungepaartem, zweiseitigem t -Test kalkuliert.

In Abschnitt 4.4 wurde festgestellt, dass NP_{pdm09} nach Infektion mit PR8 keinen positiven Effekt auf die Gewichte oder die Überlebensrate hatte. Dennoch konnten reduzierte Viruslast in den Lungen determiniert werden. Dies führte zu der Überlegung, inwiefern Viruslast mit Gewichtsverlust an Tag drei nach Infektion korreliert. Trotz moderatem ermittelten Korrelationskoeffizient R^2 von 0,4356 konnte mittels t -Test ein signifikanter linearer Zusammenhang zwischen den Variablen belegt werden (siehe Abbildung 20 B).

5 DISKUSSION

Seit nunmehr 30 Jahren werden gentherapeutische Ansätze verfolgt. Da die als moderne Behandlungsmöglichkeiten angesehenen Therapeutika während erster klinischer Versuche diverse Rückschläge erfuhren, wurde die Entwicklung sicherer Vektoren zum Gentransfer intensiviert. AAVs stellen als nicht-pathogene Viren attraktive Kandidaten für diesen Zweck dar. Da replikationsunfähige Viren generiert werden können, deren Genom mit nur sehr geringer Wahrscheinlichkeit in chromosomale Bereiche der Wirtszellen integrieren (128), sind AAVs als wirkungsvolle Vektoren für den exogenen Transfer genetischen Materials etabliert. Derzeit werden diverse Ansätze, deren Basis AAV-basierter Gentransfer ist, in klinischen Studien getestet. Als erstes gentherapeutisches Medikament wurde Glybera, ein AAV2-basiertes Produkt zur Behandlung von familiärer Lipoproteinlipasedefizienz (LPLD), in der Europäischen Union zugelassen (155–157). Dies stellte einen bedeutenden Schritt in der Entwicklung innovativer Behandlungsmethoden dar (zusammenfassend dargestellt in (133,134)). In diesem Sinne sind AAVs auch als Genvehikel für die Induktion von Transgen-spezifischen Immunantworten attraktiv. Insbesondere in der Entwicklung breitenwirksamer Influenza-Impfstoffe werden AAVs als potenzielle Vektoren untersucht.

Im Zuge dieser Arbeit wurden rekombinante AAV2.9 als präventives Vektor-basiertes Vakzin gegen Influenza getestet. Die Arbeit beinhaltete Verbesserungen der Produktionstechnik rekombinanter Partikel im Labormaßstab, die Untersuchung der Stabilität nach Gefriertrocknung sowie der Dauer der Expression des Transgens *in vivo*. Als Hauptaspekt der Arbeit wurde die Immunogenität und der protektive Effekt eines AAV-vermittelten hoch-konservierten Antigens, das Influenza Nukleoprotein, determiniert. Im Zuge der Experimente wurde ein Test zur Analyse der zytotoxischen Immunantwort im lebenden Tier etabliert.

5.1 VON DER PRODUKTION ZUR LAGERUNG REKOMBINANTER AAV9-VEKTOREN

Die Produktion von AAVs im Labormaßstab beruhte bislang auf adhärent kultivierten HEK 293T Zellen. Gängig und weit verbreitet ist die Kultivierung der Zellen in 150 mm Zellkulturschalen (zusammenfassend dargestellt in (192,193)). Auch die Synthese in Rollflaschen wurde beschrieben (194). Im Zuge dieser Arbeit wurden beide Formate getestet. Die standardmäßig angewandte Produktion in 150 mm Zellkulturschalen erwies sich jedoch schnell als aufwendig und ertragsschwach. Kultivierung adhärenter HEK 293T Zellen in Rollflaschen war problematisch, da sich oft Zellen vom Rand lösten oder Luftblasen das Ablösen der Zellen von der Oberfläche bewirkten. Die Transfektionseffizienz sowie Zell- und Virusausbeuten waren gering, was möglicherweise auf die unterbrochene Versorgung der Zellen mit Medium und permanente mechanische Belastung durch die Bewegung der Flaschen zurückzuführen war. Eine Alternative bestand in der Kultivierung in Spinner Flaschen. Beispielsweise wurden Stammzellen als Suspensionskultur erfolgreich in Spinner Flaschen kultiviert (195). Die Produktion von Viren in Spinner Flaschen wurde beispielsweise von Kati u. a. (2015) anhand des humanen Herpesvirus 8 in der B-Zell-abgeleiteten Zelllinie BrK.219 etabliert. Ehrke-Schulz u. a. (2016) konnten kürzlich zeigen, dass Adenovirus 5 in Spinner Flaschen skalierbar produziert werden kann. Außerdem wurden rekombinante AAVs erfolgreich in Spinner Flaschen nach Transduktion von sBHK Zellen mit humanem Herpes Simplex Virus synthetisiert (198). Die Herstellung von AAVs mittels HEK 293sf-3f6 Zellen in Spinner Flaschen, welche an das Wachstum in Suspension adaptiert sind, wurde bislang nicht beschrieben.

Im Zuge dieser Arbeit konnte die Kultivierung von HEK 293sf-3f Zellen in einen Liter fassenden Spinner Flaschen erfolgreich zur Produktion hoher AAV9-Titer etabliert werden. Eine Steigerung der Ausbeute um bis zu Faktor 10^3 stellt eine bedeutende Reduzierung des Aufwands zur Herstellung der hohen Mengen an Vektor für *in vitro*-Versuche und Tierexperimente dar. Neben der reinen Verringerung der Zeit und des Materials im Labor konnte eine Vektorpräparation für eine Vielzahl an Tieren verwendet werden. Dadurch konnten versuchsübergreifend gleiche Vektorqualitäten

eingesetzt werden, was eine versuchsübergreifende Vergleichbarkeit der Immunantworten ermöglichte.

Bis dato ist die Ansicht verbreitet, dass sich AAVs nur schwer in hohen Titern produzieren ließen (81). Diese Arbeit zeigt jedoch, dass die Kultivierung Suspensions-adaptierter HEK 293 Zellen in Spinner Flaschen eine skalierbare Methode zur Herstellung rekombinanter AAVs darstellt, womit ein oftmals angeführter Nachteil dieser Vektoren überwunden werden konnte.

Als nicht-umhüllte Viren mit geringer Masse sind AAVs sehr stabil gegenüber Temperaturen oberhalb von 4 °C. Obwohl die Lagerung bei -80 °C von Herstellern empfohlen wird, ist eine kurzzeitige Aufbewahrung bei 4 °C nicht mit einem Verlust der Infektivität verbunden (184). Die Stabilität gegenüber großen Temperaturschwankungen ist jedoch abhängig vom Serotyp, was auf variable Regionen in den Kapsid-Proteinen zurückzuführen ist (199). Lagerung und Transport von AAV-Suspensionen sollten daher dennoch unter ständiger Kühlung erfolgen. Bezüglich Schwankungen des pH-Werts ist bekannt, dass pH-induzierte Prozesse die Faltung des N-Terminus' des VP1-Kapsid-Proteins reversibel beeinflussen, wodurch eine alpha-helikale Struktur verloren geht oder wieder zurückgebildet wird. Dies geht jedoch nicht mit einem Verlust der Kapsid-Integrität einher (200). Während in weiten Bereichen zwischen pH 2,5 bis 5 und 6 bis 8,0 nur eine marginale Reduktion der Infektiosität von AAV9-Partikeln festgestellt werden konnte, fand hauptsächlich zwischen pH 5 und 6 eine geringfügige Beeinträchtigung der Transduktionseffizienz statt (201). Trotz hoher Stabilität gegenüber Temperatur- und pH-Wert-Schwankungen als auch chemischem und mechanischem Stress, ist es für Lagerung und Transport der Vektoren notwendig, diese mit einer entsprechenden Formulierung zu schützen. Kommerziell erhältliche Vektorpräparationen werden in der Regel auf Trockeneis versandt (Vector BioLabs, UNC Vector Core, Cell Biolabs). Beim Versand lyophilisierter Vektoren könnte auf Trockeneis verzichtet werden. Die im Zuge dieser Arbeit verwendeten Vektoren sollten daher auf ihre Stabilität nach Lyophilisierung untersucht werden. Lyophilisierung in den drei getesteten Zusammensetzungen (Trehalose, Inulin oder Trehalose/Dextran) zeigte keinen negativen Effekt auf die Stabilität der Partikel. Außerdem wurde keine Reduktion der Transduktionseffizienz

durch Gefrierdrying nach schnellem oder langsamem Protokoll festgestellt. AAV9 kann demnach problemlos zu Lagerungs- oder Transportzwecken als Pulver hergestellt werden. Zur Versorgung schwer zugänglicher Regionen oder Regionen, bei denen eine Kühlkette möglicherweise unterbrochen werden könnte, ist dies von großem Nutzen.

5.2 AAV9-BASIERTE IMMUNISIERUNG INDUZIERT LANG-ANHALTENDE TRANSGENEXPRESSION UND IMMUNANTWORT IN BL/6-MÄUSEN

Über 100 verschiedene, natürlich vorkommende AAV-Serotypen wurden bereits isoliert. Die Diversität geht mit einer hohen Spezifität gegenüber verschiedenen Wirtszellen einher (zusammenfassend dargestellt in (171,202)). Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Serotyp AAV9 zeichnet sich durch besonders effiziente Transduktion von Muskelzellen aus (203,204). Impfstoffe werden Menschen in der Regel intramuskulär verabreicht. Dies optimiert die Verfügbarkeit und systemische Immunogenität des Vakzins und minimiert gleichzeitig Nebenwirkungen. Da Muskelgewebe stark durchblutet ist, kann eine schnelle Interaktion des Antigens mit den Makrophagen, dendritischen Zellen sowie B- und T-Zellen des Immunsystems stattfinden (205). Dieser Interaktion ist bei einem Vektor-basierten Impfstoff noch die Antigenexpression vorgeschaltet. Das Antigen wird erst nach Transduktion der Muskelzellen produziert und muss dem Immunsystem über MHC-Moleküle präsentiert werden. Eine hohe Transgenexpression ist daher Voraussetzung einer wirkungsvollen Immunisierung. Neben der systemischen Immunantwort ist für Influenza eine Immunreaktion im respiratorischen Trakt von großem Interesse, um die Influenzaviren unmittelbar beim Eindringen in den Wirt zu bekämpfen. Zur Induktion einer Immunantwort in der respiratorischen Mukosa kann intranasale Verabreichung angewandt werden. Ein Ziel dieser Arbeit war daher AAV9-basierte Transgenexpression nach intramuskulärer und intranasaler Verabreichung mittels *in vivo* Imaging hinsichtlich der Stärke und Dauer über einen Zeitraum von einem Jahr zu vergleichen. Zusätzlich wurden IgG Antikörper-Titer im Serum als Indikator der humoralen Immunantwort korreliert.

Die Untersuchungen dieser Arbeit belegten, dass sowohl nach intramuskulärer als auch intranasaler, einmaliger Applikation des AAV9-Vakzins die Expression des Transgens maximal ist (siehe Abbildung 7). Eine zweite Immunisierung führte nicht zu einer Steigerung der Transgenexpression und erschien daher nicht erforderlich. Es kann angenommen werden, dass aufgrund der ersten Immunisierung gebildete AAV9-spezifische Antikörper (siehe Abbildung 8) schon während der zweiten Immunisierung neutralisierend wirken. Eine zweite Verabreichung würde dann vielmehr zusätzlich die Bildung neutralisierender Antikörper fördern, was eine erneute Immunisierung zu späteren Zeitpunkten (z.B. ein Jahr/eine Influenza-Saison später) schwieriger gestalten würde. Wie erwartet ist die Transgenexpression nach intramuskulärer Immunisierung deutlich stärker als nach intranasaler. Erwähnenswert ist, dass intranasale Applikation zur Expression im oberen und unteren respiratorischen Trakt führt. Dies kann von Vorteil sein, da humane Inflenzaviren primär im oberen respiratorischen Trakt Epithelzellen und Zilienzellen mit α -2,6-verknüpfter Sialinsäure als Rezeptor auf der Oberfläche infizieren, während aviäre Inflenzaviren bevorzugt an Zilien-freie Zellen und Pneumozyten Typ II des unteren respiratorischen Trakts mit α -2,3-verknüpfter Sialinsäure binden (5,206). Auch wenn gezeigt wurde, dass von Mensch zu Mensch übertragene humanpathogene Subtypen,, vorrangig an Zellen des oberen respiratorischen Trakts binden (207), erscheint eine lokale Immunantwort beim Auftreten einer Variante, die möglicherweise Zelltypen beider Regionen infizieren kann oder trotz Restriktion ans untere respiratorische Gewebe übertragen werden kann, vorteilhaft.

AAV2 führt nachweislich zu einer 1,5-Jahre-anhaltenden Transgenexpression in Mäusen (146). Für AAV9 konnten hohe Expressionsraten nach systemischer (171), intratrachealer oder intranasaler (208) Verabreichung detektiert werden. Innerhalb dieser Arbeit wurde erstmals die Expression eines AAV9-vermittelten Reportergens über die Dauer von einem Jahr mittels *in vivo* Imaging mit gleichzeitiger Verfolgung der Transgen-spezifischen humoralen Immunantwort untersucht. Auch 12 Monate nach Immunisierung konnte kein Rückgang der Transgenexpression festgestellt werden. Nach intramuskulärer Injektion waren die Titer der Transgen-spezifischen Antikörper stärker als nach intranasaler Verabreichung, was vermutlich auf stärkere

Transgenexpression zurückzuführen ist. Auffällig war, dass die Titer beider Versuchsgruppen nach sechs Monaten wieder geringer wurden. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit noch ein Jahr nach Immunisierung eine bestehende zelluläre Immunantwort gegen das Transgen detektiert werden. Da diese zum Abbau der Antigen-präsentierenden Zellen beiträgt, könnte anhand der reaktiven T-Zellen der Rückgang der Titer erklärt werden. Die stabile Transgenexpression kann folglich dadurch verdeutlicht werden, dass Zellen transduziert wurden, die nur sehr schwach MHC-Moleküle exprimieren und so das Antigen zwar produzieren, jedoch nur geringfügig MHC-gebunden präsentieren. Möglicherweise sind nach sechs Monaten MHC-positive, nicht jedoch MHC-negative, Antigen-produzierende Zellen lysiert, wodurch die Transgenexpression weiterhin stabil bleibt, die Antikörperantwort jedoch stetig abnimmt. Zu welchem Anteil MHC-positive und MHC-negative Zellen transduziert werden, könnte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen anhand von MHC- und Antigen-spezifischer Färbung von Gewebeschnitten sein.

Obwohl intranasale Immunisierung eine geringere Transgenexpression und schwächere humorale Immunantwort induzierte, ist ein dauerhafter protektiver Effekt gegen Influenza dank einer möglichen mukosalen Immunreaktion anzunehmen. Dies gilt es in weiteren Versuchen zu bestimmen.

5.3 HOMOLOGER SCHUTZ NACH AAV9-VERMITTELTEN IMMUNISIERUNG MIT INFLUENZA NUKLEOPROTEINEN

Voraussetzung für die Untersuchung einer heterologen Schutzwirkung war die Sicherstellung des protektiven Effekts gegen eine Infektion mit dem homologen Subtyp. Im Rahmen früherer Studien wurde untersucht, ob das AAV-vermittelte NP des humanpathogenen, pandemischen Influenza-Subtyps (H1N1pdm09) gegen eine homologe Belastung protektiv ist (179). Immunisierte Bl/6-Mäuse wurden mit dem humanen H1N1pdm09 infiziert. Da dieser Subtyp nicht an die Maus adaptiert und daher im Mausmodell auch geringfügiger pathogen war, überlebten auch ein Drittel der Kontrolltiere die Infektion. Alle immunisierten Tiere konnten trotz der Entwicklung von Symptomen das Virus bekämpfen. Eines der Ziele dieser Arbeit bestand in der Replikation dieser Ergebnisse. Es wurden ebenso Bl/6-Mäuse mit dem

AAV-vermittelten NP des Subtyps H1N1pdm09 immunisiert. Das NIBSC (*National Institute for Biological Standards and Control*, Potters Bar, Großbritannien) stellte dazu den Belastungsstamm zur Verfügung, welcher durch Passagieren an das murine Modell adaptiert wurde. Die am NIBSC ermittelte MLD₅₀ wurde für diese Versuche verwendet. Neun der zehn immunisierten Tiere überlebten die Infektion (siehe Abbildung 12). Ein immunisiertes Tier musste während des Beobachtungszeitraums von 14 Tagen eingeschläfert werden. Wie auch schon bei Sipo und Kollegen (2011) überlebten 40 % der Kontrolltiere die Infektion. Dies erklärt sich durch eine unzureichende Adaption des humanen Virus an das Mausmodell. NIBSC nutze für die Bestimmung der MLD₅₀ eine Kreuzung aus Bl/6 und Balb/C-Mäusen. In dieser Arbeit wurden reine Bl/6 verwendet, in denen das Virus trotz Adaptation offenbar eine geringere Letalität ausweist.

Um eine homologe Schutzwirkung des AAV-NP gegen eine zu 100 % letale Belastung nachzuweisen, wurde das NP des in der Maus hoch-pathogenen Subtyps PR8 als Antigen verwendet. Nach Belastung mit PR8 mussten alle Kontrolltiere aufgrund starken Gewichtsverlusts eingeschläfert werden, während alle immunisierten Tiere die Infektion überlebten (siehe Abbildung 12). Dies zeigte, dass die AAV-vermittelte Immunantwort ausreichend stark gegen ein aggressiv replizierendes Virus war.

Die Induktion aktivierter CD8⁺ T-Zellen wurde schon 1986 von Taylor und Askonas als Mediator einer zytotoxischen Immunreaktion nachgewiesen. Bei der Immunisierung mit Virus-internen Antigenen korreliert sie maßgeblich mit der Schutzwirkung des Vakzins. Es kann jedoch auch ein Beitrag nicht-neutralisierender Antikörper postuliert werden. Obwohl NP-spezifische Antikörper die Influenzaviren nicht neutralisieren, stehen NP-bindende Antikörper in Verdacht eine protektive Wirkung zu fördern. Carragher und Kollegen konnten 2008 nach Immunisierung mit löslichem NP des Subtyps PR8 die Letalität und Virusreplikation in homolog-infizierten Mäusen reduzieren. Bei dem Versuch war entscheidend, dass starke Antikörper-Antworten, jedoch kaum T-Zell-Antworten induziert wurden. Außerdem waren Antikörperdefiziente Tiere nicht geschützt, was auf eine Beteiligung nicht-neutralisierender Antikörper hinweist. Bei dieser antikörperabhängigen zellvermittelten Toxizität (ADCC, engl. *antibody dependent cellular cytotoxicity*) binden Effektorzellen wie

natürliche Killerzellen, dendritische Zellen, Makrophagen aber auch Granulozyten über Fc-Rezeptoren die konstante Domäne der Antikörper, die an das der infizierten Zellen präsentierte Antigen gebunden sind (211,212). Daraufhin schütten die Zellen Perforine und Granzyme aus, die zur Lyse der infizierten Zelle führen. ADCC wird als potentieller Bestandteil eines breitenwirksamen Schutzes diskutiert. Auch im Rahmen der homologen Infektionsversuche dieser Arbeit kann eine antikörperabhängige zellvermittelte Toxizität eine Rolle gespielt haben. Versuche mit einem Konstrukt, in dem das immunodominante NP CD8⁺ Epitop des Impfstammes dem Belastungsvirus angepasst wurde, zeigen jedoch, dass ADCC keine Wirkung bei heterologer Belastung hat (siehe Abschnitt 4.5).

5.4 FEHLENDER HETEROLOGER SCHUTZ NACH AAV9-VERMITTELTER IMMUNISIERUNG MIT INFLUENZA NP_{pdm09}

Nachdem sichergestellt war, dass die AAV-basierte Immunisierung auch gegen PR8 im homologen Modell gewährleistet ist, sollte eine Schutzwirkung im heterologen Modell untersucht werden. Bereits 1993 wurde nach DNA-Immunisierung gegen das NP ein breitenwirksamer Schutz in Mäusen nachgewiesen (213). Mehr als ein Jahrzehnt später lag der Fokus von Versuchen zur Induzierbarkeit breitenwirksamer Immunantworten auf der Übertragung konservierter Proteine mittels viraler Vektoren. Als stark immunogener Vektor konnte der Transfer des Nukleoproteins mittels rekombinanten Adenovirus 5 Mäuse vor einer letalen Infektion mit H5N1, H3N2 und H1N1 schützen (214). Hervorzuheben ist, dass seine intranasale Verabreichung gegenüber einer intramuskulären von Vorteil war. Als ein vielversprechender Vektor zu Immunisierungszwecken gilt auch ein attenuiertes Pockenvirus, MVA (engl. *modified vaccinia virus Ankara virus*) (zusammenfassend dargestellt in (81)). MVA-basierte Immunisierung mit dem NP als einziges Antigen oder dem NP als Komponente eines multivalenten Impfstoffes war in der Lage Mäuse zu schützen (119). Zudem konnte im Jahr 2015 das NP als essentielle Komponente eines multivalenten Impfstoffes determiniert werden (215). In allen Versuchen wurde der Schutz durch eine Antigen-spezifische CD4⁺ und/oder CD8⁺ T-Zell-Antwort begründet. Sipo und Kollegen (2011) setzten das NP ebenfalls als Komponente eines trivalenten Impfstoffes ein. Wie bereits beschrieben (siehe Seite 35) wurde das Überleben von 40 % der Mäuse auf eine

NP-spezifische- T-Zell-Antwort zurückgeführt. Auf Basis dieser Ergebnisse wurde im Zuge dieser Arbeit das NP des Subtyps H1N1pdm09 als monovalentes AAV-vermitteltes Antigen gegenüber einer Belastung mit PR8 getestet. Obwohl eine T-Zell-Antwort gegen das immunodominante Epitop des NP_{PR8} induziert wurde, konnte kein protektiver Effekt festgestellt werden (siehe Abschnitt 4.4).

So wie nach Belastung mit PR8 im homologen Modell (Immunisierung mit NP_{PR8}) die Viruslast in der Lunge drei Tage nach der Infektion signifikant geringer war, konnte auch eine signifikante Reduktion im heterologen Modell (Immunisierung mit NP_{pdm09}) beobachtet werden (siehe 4.8). Auch wenn statistisch die Reduktion schwächer signifikant war (NP_{PR8} $p = 0,0067$ gegen NP_{pdm09} $p = 0,0242$) kann doch angenommen werden, dass der Titer aufgrund einer Immunreaktion verringert war. Welcher Art die Reaktion war und welche Komponenten (angeboren oder erworben) dabei eine Rolle spielten kann aus den zur Verfügung stehenden Daten nicht ermittelt werden. Interessant wäre eine longitudinale Korrelation der Viruslast mit dem Gewichtsverlust über den Beobachtungszeitraum von 14 Tagen hinaus und eine detaillierte Bestimmung aussagekräftiger Parameter der angeborenen Immunantwort sowie der erworbenen T-Zell Immunität. De facto konnte eine anfängliche Verringerung des replizierenden Belastungsvirus in dem Modell nicht vor dem letalen Verlauf der Infektion schützen.

Es stellte sich daraufhin die Frage, welchen Beitrag der Vektor bei den genannten Studien, in welchen das NP als monovalentes Antigen gegen heterologe oder heterosubtypische Influenzaviren schützte, leistete. Verglichen zu AAVs sind die oben angeführten Vektoren stark immunogen. Charakteristisch für rAd5 (216) und MVA (217) ist eine intrinsische Immun-stimulierende Aktivität, die mit der eines Adjuvans vergleichbar ist. Nach zwei Rückschlägen innerhalb klinischer Studien, in denen Adenoviren als Vektoren dienten, fokussiert sich die Forschung in dem Bereich adenoviraler Vektoren auf ihre Sicherheit (zusammenfassend dargestellt in (81)). MVA gilt weiterhin als potentieller Kandidat für vektorielle Vakzine. Eine Erklärung für die fehlende protektive Wirkung des AAV-NP Vektors ist daher möglicherweise auch eine schwach immunogene Wirkung des Vektors selbst.

Bezugnehmend auf die Versuche von Sipo *et al.* (2011) kann postuliert werden, dass ein partieller, heterologer Schutz nach Immunisierung mit dem AAV-basierten trivalenten (NP+HA+M1) Vakzin nicht nur durch eine NP-spezifische CTL-Antwort ausgelöst wurde. Denkbar ist auch eine Beteiligung einer HA-spezifischen T-Zell-Antwort, die in Kombination mit den NP-reaktiven T-Zellen protektiv wirkt.

5.5 IMMUNODOMINANTES EPITOP NP₃₆₆₋₃₇₄ TRÄGT ENTSCHEIDEND ZU PROTEKTIVEM EFFEKT BEI

Bei Menschen ist nach einer natürlichen Influenza-Infektion eine CD8⁺ T-Zell-Antwort gegen das Nukleoprotein gegenüber anderen Proteinen dominant (212). Bei humanen Varianten konnte genauer eine Dominanz bestimmter NP-Epitope beschrieben werden (187,188). Im murinen H2-Db-Modell wurde eine Immunodominanz des Epitops NP₃₆₆₋₃₇₄ nachgewiesen (179,185,186). Im Zuge dieser Arbeit sollte der protektive Anteil des NP₃₆₆₋₃₇₄-Epitops quantifiziert werden. Dazu wurde ein Austausch einer Aminosäure, die neben zwei weiteren Aminosäuren den Kontakt der Antigen-präsentierenden Zelle zum T-Zell-Rezeptor vermittelt, vorgenommen. Es wurde festgestellt, dass Tiere, welche in der heterologen Belastung mit PR8 nicht geschützt waren (siehe Abschnitt 4.4), nach Angleichen des Epitops an den Belastungsstamm das Virus zu 60 % bekämpfen konnten (siehe Abschnitt 4.5). Des Weiteren werden die Ergebnisse durch die determinierte signifikante ($p = 0,0160$) Reduktion der Viruslast an Tag drei nach Belastung unterstützt (siehe 4.8).

Dies unterstreicht den starken Effekt einer sehr spezifischen zellulären Immunantwort. Im Umkehrschluss verdeutlicht das Ergebnis, dass Influenzaviren durch Mutationen in T-Zell Epitopen gezielt einer zellulären Immunantwort ausweichen können. Weiterhin kann angenommen werden, dass antikörperabhängige zellvermittelte Toxizität in diesem Modell keine Rolle spielt. Anderenfalls wäre dieser Effekt auch schon bei Belastung der NP_{pdm09}-immunisierten Mäuse messbar gewesen.

5.6 FEHLENDER SCHUTZ NACH IMMUNISIERUNG MIT CD8⁺ T-ZELL-EPITOPKETTE

Nachdem wie oben beschrieben der Einfluss eines einzelnen immunreaktiven Epitops quantifiziert wurde, konnte die Breitenwirksamkeit der Immunisierung mit einer Kette aller immunrelevanten CD8⁺ NP-Epitope aller bekannter Subtypen konstatiert werden. AAV-basierte Immunisierung mit der Epitopkette induzierte in der Maus CD8⁺ T-Zellen, welche reaktiv gegen das immundominante Epitop der Subtypen H1N1pdm09 und PR8 (siehe Abbildung 15) wirkten. Im Infektionsversuch unterlagen die Tiere jedoch einem rapiden Gewichtsverlust. Obwohl nicht signifikant nachweisbar schienen die immunisierten Tiere schneller an Gewicht zu verlieren als Tiere der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 15). Anders als geschützte Tiere (NP_{PR8}, NP_{V371M}) zeigten diese Mäuse an Tag drei nach der Belastung keine Veränderung bezüglich der Viruslast von replikationskompetenten Influenzaviren in der Lunge verglichen zur Kontrollgruppe (leer). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass immunisierte Mäuse nach dem Erreichen des humanen Endpunktes geringere Zellinfiltrationen und Gewebeschädigungen in der Lunge aufwiesen. Außerdem konnte zu diesem Zeitpunkt mittels Influenza A-spezifischer Färbung mehr Viruspartikel in den Bronchien und Alveolen nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine schwache Rekrutierung von Immunzellen in infizierte Regionen des unteren respiratorischen Traktes hin. Zur weitergehenden Untersuchung der im *in vitro*-Assay detektierten reaktiven T-Zellen wurde ein *in vivo*-Assay etabliert, anhand dessen die Lyse Antigen-präsentierender Zellen im lebenden Tier verfolgt werden konnte. Der Test ermöglichte nach bisherigem Erkenntnisstand erstmals die Lokalisierung intravenös injizierter, Epitop-bindender Präsentierzellen und deren zeitabhängige Eliminierung durch reaktive zytotoxische T-Zellen mittels *in vivo*-Imaging zu verfolgen (siehe Abschnitt 4.7). So konnte im homologen Modell unter Verwendung NP_{PR8}-immunisierter Mäuse verdeutlicht werden, dass etwa 50 % der Antigen-präsentierenden Zellen innerhalb von sechs Stunden abgebaut wurden. Nach weiteren sechs Stunden konnten keine Zellen mehr detektiert werden.

Hinsichtlich der Detektion der Zellen im Tier könnten zusätzlich Verbesserungen des Assays vorgenommen werden. Die Detektion der Zellen im Tier wurden in dieser

Arbeit anhand der Detektion von Luciferase durchgeführt. Nachteil dieses Markers ist, dass das Substrat D-Luciferin zuvor intraperitoneal injiziert werden muss. Dessen Bioverfügbarkeit und Metabolisierung ist unter anderem vom Gewicht, sowie der Nahrungs- und Wasseraufnahme des Tieres abhängig und daher von Individuum zu Individuum stark variabel. Es konnte beispielweise bei einer ersten Messung eines Tieres zunächst kein Signal detektiert werden. Die zweite Messung zeigte jedoch eine starke Luciferase-Expression. Das negative Ergebnis der ersten Messung deutet daher auf eine fehlerhafte Aufnahme des Substrats hin. So musste die Injektion von D-Luciferin während der Versuche zeitlich sehr genau abgestimmt werden, um Schwankungen durch Resorption und Abbau des Substrats zu vermindern. Überwunden werden könnte die Problematik durch Verwendung eines Fluoreszenzmarkers anstatt der Luciferase. Fluoreszenzmarker könnten ohne vorherige Verabreichung eines Substrats mit Hilfe des *in vivo*-Imagers detektiert werden. Da die Detektion von Luciferase im Gegensatz zu Fluoreszenz jedoch ohne Hintergrundsignal sehr viel einfacher und sicherer ist, wurde in dieser Arbeit zunächst auf Luciferase zurückgegriffen. Farbstoffe, die im Bereich größerer Wellenlängen emittieren und so einen geringeren Hintergrund durch Autofluoreszenz und bessere Penetrationseigenschaften aus tieferen Geweben nach Außen aufweisen, wurden für diese Zwecke entwickelt (218).

Anhand des *in vivo*-Tests wurde ersichtlich, dass, obwohl T-Zellen, die durch das komplette NP-Protein induziert wurden, NP₃₆₆₋₃₇₄-präsentierende Zellen lysieren können, während T-Zellen, die mittels Epitopkette induziert wurden, dies nicht vermitteln konnten. Das könnte an mangelnder Rekrutierung der Lymphozyten zu dem infizierten Gewebe oder an unzureichender Aktivierung liegen. Weiterführende Versuche sollten die Expression des Homing-Rezeptors CD62L, die Produktion von IL-2, des IL-2-Rezeptors als auch die Sekretion von TNF- α adressieren. Wird CD62L exprimiert, werden die Zellen in sekundäre lymphatische Gewebe rekrutiert und können nicht in infizierte Gewebe infiltrieren. IL-2 stellt in einer positiven Rückkopplungsschleife mit dem IL-2 Rezeptor das Signal zur Proliferation und Differenzierung aktivierter CD8⁺T-Zellen. Bei viralen Infektionen sind zur Stimulierung von CD8⁺T-Zellen meistens jedoch zusätzliche Signale von

CD4⁺ T-Helferzellen erforderlich. Dabei stimuliert die Antigen-präsentierende Zelle zunächst die CD4⁺ T-Zelle, welche rückkoppelnd zur vermehrten Expression von Faktoren wie B7 (219–221) oder 4-1BB (222–224) führt, die wiederum ko-stimulierend auf CD8⁺ T-Zellen wirken und so die Proliferation induzieren. Da die Epitopkette lediglich CD8⁺ T-Zell-Epitope kodiert, wird durch Immunisierung eine Aktivierung von CD4⁺ T-Helferzellen nicht gefördert. Folglich fehlt der ko-stimulierende Effekt, was die beschriebenen Ergebnisse erklären kann. Während für CD8⁺ T-Zellen der protektiven NPs im homologen Versuch die Expression der Zytokine IL-2 und TNF- α mittels intrazellulärer Zytokinfärbung nachgewiesen werden konnte, wurde der Test nicht im Versuch mit der Epitopkette durchgeführt. Ob also T-Zellen von Mäusen, immunisiert mit der Epitopkette, ko-stimulierende Faktoren synthetisieren, wurde bislang nicht geklärt. Diese Ergebnisse könnten jedoch zum weiteren Verständnis Epitop-basierter Vakzine beitragen.

Eine weitere Annahme stützt sich auf Erfahrungen anderer Wissenschaftler (persönliche Kommunikation innerhalb des UNISEC-Konsortiums), wonach Epitop-basierte Immunisierung zu verstärkten Symptomen nach Influenza-Infektion im Mausmodell verglichen zur Kontrollgruppe führten. Als Ursache wird eine Hyperstimulierung des adaptiven Immunsystems angesehen. Die Problematik einer ausbalancierten Influenza-spezifischen CTL-Antwort wird umfassend von Duan und Thomas (2016) (51) behandelt. Ziel wäre demnach eine Kette mit weniger Epitopen zu erzeugen, um so eine definiertere Immunantwort zu generieren. Zur Determination der optimalen Anzahl von Epitopen sollten idealerweise große Vergleichsstudien mit mehreren Konstrukten angesetzt werden. Bedacht werden sollte dabei, dass für eine Mauslinie nur ein MHC-Klasse-I-Haplotyp existiert, während im Menschen natürlicherweise diverse HLA Polymorphismen vorkommen. Das Prinzip einer Kette mehrerer CD8⁺ T-Zell-Epitope zur Induktion eines Subtyp-übergreifenden Schutzes kann daher zwar an Mäusen untersucht werden, ist jedoch schwer auf das humane System übertragbar.

5.7 ZUSAMMENFASSENDE DARSTELLUNG

In Anbetracht der Ergebnisse dieser Arbeit kann geschlussfolgert werden, dass das Nukleoprotein als monovalentes Antigen keinen umfassenden Schutz bieten kann. Es eignet sich einen Subtyp-spezifischen, nicht jedoch einen breitenwirksamen Schutz zu generieren. Trotz der hohen Sequenzhomologie genügen minimale Unterschiede in T-Zell-Epitopen, um eine funktionellen Immunreaktion zu unterbinden. Vielmehr sollten, wie in Abbildung 21 dargestellt, verschiedene Antigene kombiniert werden. Dies induziert nicht zur eine zelluläre und humorale Immunreaktion, sondern kann auch Antikörpertiter steigern, um so beispielsweise auch Menschen höheren Alters effizient zu immunisieren (226). Interessant wäre im Rahmen des EU-Projektes UNISEC AAV-basiertes NP in Kombination mit HA-Stamm-Konstrukten zu testen. Antikörper gegen die konservierte Stammregion des HA's können kreuzreaktive Influenzaviren verschiedener Subtypen neutralisieren (227–230). Ein mögliches Ergebnis könnte die Induktion einer zellulären Antwort mit zusätzlicher Produktion breiten-neutralisierender Antikörper sein. Außerdem sollte untersucht werden, ob die Titer der Antikörper so gesteigert werden können. Bedacht werden sollte dennoch, dass auch Stamm-spezifische Antikörper spezifisch gegen Viren der phylogenetischen Gruppe 1 (wie H1 und H5) oder Viren der Gruppe 2 (wie H3 und H7) neutralisierend sind, oft jedoch nicht gegen alle Influenzaviren.

Vielversprechend erscheint die Etablierung Epitop-basierter, multivalenter breitenwirksamer Impfstoffe. Dabei sollten Epitope zur Induktion einer möglichst breitgefächerten Immunantwort eingesetzt werden. Ein potentieller Kandidat, bestehend aus Epitopen von HA, M1 und NP, wurde von BiondVax entwickelt und bereits in klinischen Studien erfolgreich auf die Sicherheit im Menschen geprüft (106).

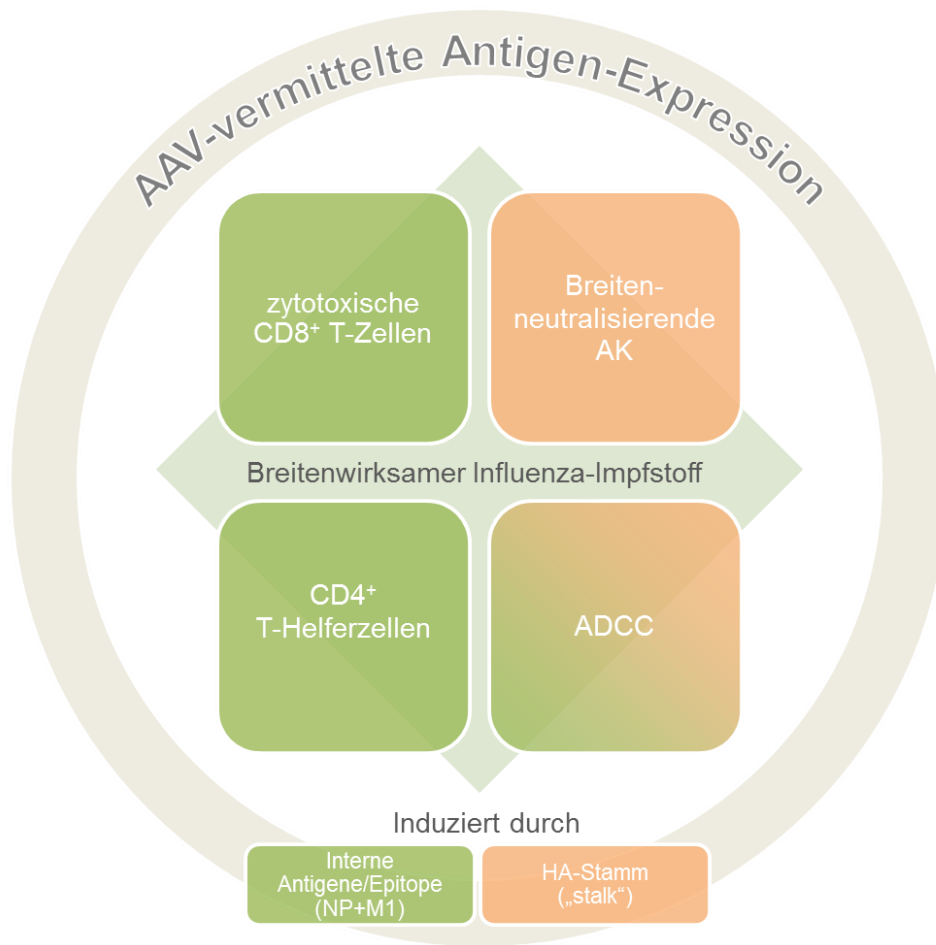


Abbildung 21: Anforderungen an einen breitenwirksamen Influenza-Impfstoff

Kreuzreaktivität sollte durch zytotoxische T-Zellen und breiten-neutralisierende Antikörper vermittelt werden. Unterstützend sollte auch CD4⁺ T-Helferzellen induziert werden, um die Proliferation der zytotoxischen T-Zellen zu unterstützen. Antikörperabhängige zellvermittelte Toxizität stellt eine Verbindung zwischen Komponenten der angeborenen und adaptiven Immunantwort dar und umfasst sowohl HA-Stamm-spezifische Antikörper als auch Antikörper gegen konservierte Proteine (NP+M1). Eine AAV-basierte Expression der Antigene kann Vorteile gegenüber nicht-vektorieller Immunisierung haben.

AAV-basierte Immunisierung bietet gegenüber Peptiden den Vorteil der langanhaltenden Transgenexpression und Stabilität. AAVs haben verglichen zu anderen viralen Vektoren den Vorzug, dass sie sicher im Menschen eingesetzt werden können. Eine intranasale Verabreichung könnte auch für AAV-basierte Vektoren die Applikationsroute der Wahl sein. Erwähnenswert ist zudem, dass AAVs ohne Zugabe eines Adjuvans starke Immunreaktionen induzieren. Sobald ein Antigen als immunogener und protektiver Impfstoff etabliert ist, sollte eine AAV-basierte Vermittlung eruiert werden.

Diese Arbeit zeigt, dass bei der Entwicklung breitenwirksamer Influenza-Vakzine das Nukleoprotein berücksichtigt werden sollte, da es eine robuste, T-Zell-vermittelte Immunreaktion gegen konservierte Bereiche auslöst. Da es dennoch dem Immundruck ausweicht, sollte es als Teil eines multivalenten Impfstoffes dienen, der über breitenneutralisierende Antikörperantworten, ADCC und T-Zell-Antworten protektiv ist. Zur Induktion einer lang anhaltenden Immunantwort ist die vektorielle Immunisierung der Protein-basierten Immunisierung vorzuziehen, wobei AAVs zur Übertragung der Antigene absolut geeignet sind.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die permanente Entstehung von Driftvarianten des Influenzavirus reduziert die Effektivität der derzeit angewandten Stamm-spezifischen Grippeschutzimpfung und erschwert eine zeit- und kosteneffizienten Produktion. Zusätzlich bergen zoonotische Influenza-Subtypen starkes pandemisches Risiko, was die Entwicklung eines breitenwirksamen Impfstoffes forciert. Als Teil des von der EU geförderten UNISEC-Projekts wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit ein vektorielles Impfstoffsystem untersucht, welches durch Immunisierung gegen das hoch-konservierte Influenza Nukleoprotein (NP) mittels Adenovirus-assoziierten Virus Serotyp 9 (AAV9) eine langanhaltende kreuzreaktive T-Zell-Antwort induziert.

Es konnte mittels *in vivo* Imaging im Mausmodell eine stabile AAV9-basierte Transgenexpression sowohl nach intramuskulärer als auch nach intranasaler Applikation über einen Zeitraum von 12 Monaten verfolgt werden. Die Stärke der Transgen-spezifischen humoralen Immunantwort im Serum und der Nachweis einer T-Zell-Reaktion 12 Monate nach Immunisierung wies die Induzierbarkeit einer langanhaltenden Immunität nach.

AAV-basierte Immunisierung mit dem NP des pandemischen Virus Influenza A H1N1pdm09 und dem NP der Maus-adaptierten Variante Influenza A H1N1 PR8 führte zu starken T-Zell-Antworten im Mausmodell und schützte die Tiere nach homologer Belastung. Obwohl Ergebnisse früherer Studien auf eine Kreuzreaktivität NP-spezifischer T-Zellen hinweisen, konnte eine Immunisierung mit dem NP von H1N1pdm09 nicht gegen eine heterologe Belastung mit PR8 schützen. Das immunodominante CD8⁺ T-Zell-Epitop (NP₃₆₆₋₃₇₄) wurde folglich durch Punktmutation an PR8 angepasst. Dieses modifizierte Konstrukt vermittelte eine bislang noch nicht im Belastungsversuch quantifizierte Impfeffektivität von 60 %. Basierend auf diesen Ergebnissen war ein subtyp-übergreifender Schutz nach AAV-basierter Immunisierung mit einer synthetischen Kette aller immunrelevanten CD8⁺ T-Zell-Epitope der verwendeten Mauslinie wahrscheinlich. Immunisierung mit diesem Vektor schützte die Tiere im Belastungsversuch mit PR8 jedoch nicht. Dies könnte auf

eine fehlende Induktion weiterer Komponenten des Immunsystems als den NP-Epitop-spezifischen CD8⁺ T-Zellen zurückgeführt werden.

Erstmalig konnte im Zuge der vorliegenden Arbeit ein System etabliert werden, das es erlaubt die zytotoxische Aktivität spezifischer CD8⁺ T-Zellen im lebenden Tier mittels *in vivo* Imaging zu verfolgen. Anhand des Assays konnte nachgewiesen werden, dass nach AAV-basierter Immunisierung mit dem Voll-längen-NP spezifische T-Zellen unmittelbar Target-Zellen im Tier eliminieren konnten. Dieser *in vivo*-Effekt konnte nach Immunisierung mit der Epitopkette jedoch nicht nachgewiesen werden.

Während im Rahmen der vorliegenden Arbeit Schwachstellen eines NP-basierten monovalenten Impfstoffes aufgezeigt werden konnten, konnte gleichzeitig geschlussfolgert werden, dass eine starke NP-spezifische Immunreaktion innerhalb einer multivalenten Immunisierung eine wichtige Rolle zugeschrieben werden kann. AAV eignet sich aufgrund vorteilhafter Charakteristika bezüglich Produktionseffizienz, Lagerung, Sicherheit im Menschen sowie Dauer und Stärke der Transgen-spezifischen Immunantwort ausgezeichnet für die Entwicklung einer Vektor-basierten, breitenwirksamen Influenza-Vakzine.

SUMMARY

The permanently evolving drift variants of influenza virus often reduce the effectiveness of commonly used strain-specific flu vaccines and make it difficult to produce vaccines in a time and cost effective manner. This, and the near certainty of a zoonotic influenza infection leading to a new pandemic in the future, drives efforts to develop broadly-protective vaccines. As part of the EU-funded UNISEC project, this work investigated a vectored vaccine system based on immunization against the highly conserved influenza nucleoprotein (NP). The aim was to use adenovirus-associated virus serotype 9-mediated NP gene transfer to induce a long-lasting, cross-reactive T cell response.

Stable AAV9-mediated transgene expression over a period of 12 months following intramuscular or intranasal administration in mice was demonstrated by *in vivo* imaging. The levels of transgene-specific antibodies and T-cells maintained during this time confirmed the induction of a sustained immune response.

Immunization of mice with AAVs expressing the NP of the pandemic influenza A strain H1N1pdm09 and of the mouse-adapted laboratory strain A H1N1 PR8 resulted in strong T cell responses and after challenge with the homologous influenza, all mice were protected. Although previous data had indicated that NP-specific T cells were cross-reactive, immunization with the NP of H1N1pdm09 was not able to protect against heterologous challenge with PR8. The AAV-NP of H1N1pdm09 was therefore modified by point mutation to match the immunodominant epitope (NP₃₆₆₋₃₇₄) of PR8. This showed, for the first time, that the epitope is protective for at least 60 % of the animals tested. Based on these results, it seemed likely that AAV-mediated immunization using a synthetic chain of all known NP CD8⁺ T cell epitopes for the mouse strain would be broadly protective. However, mice immunized with such a vaccine succumbed rapidly to challenge with PR8. This may be explained by the lack of immune responses other than selected NP epitope-specific CD8⁺ T cells.

The work presented here included, for the first time, the establishment of a system to track the cytotoxic activity of specific CD8⁺ T cells in living animals using *in vivo*

imaging. Using this assay it was possible to demonstrate that, whereas T-cells induced by AAVs expressing the complete NP were able to rapidly clear target cells from the body, no such *in vivo* effect was observed after immunization with the NP epitope chain.

This work demonstrates that although NP-based monovalent vaccines have weaknesses that need to be overcome, it nevertheless confirms that a strong NP-specific immune response could play a critical role as part of a multivalent vaccine. The advantages of AAV with regard to manufacturing efficiency, storage, safety in humans as well as the duration and strength of transgene-specific immune response, make it an excellent candidate for the further development of vectored broadly-reactive influenza vaccines.

LITERATUR

1. Jagger BW, Wise HM, Kash JC, Walters K-A, Wills NM, Xiao Y-L, u. a. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science*. 13. Juli 2012;337(6091):199–204.
2. Muramoto Y, Noda T, Kawakami E, Akkina R, Kawaoka Y. Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA. *J Virol*. März 2013;87(5):2455–62.
3. Wise HM, Foeglein A, Sun J, Dalton RM, Patel S, Howard W, u. a. A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J Virol*. August 2009;83(16):8021–31.
4. Shi Y, Wu Y, Zhang W, Qi J, Gao GF. Enabling the „host jump“: structural determinants of receptor-binding specificity in influenza A viruses. *Nat Rev Microbiol*. Dezember 2014;12(12):822–31.
5. van Riel D, Munster VJ, de Wit E, Rimmelzwaan GF, Fouchier RAM, Osterhaus ADME, u. a. Human and avian influenza viruses target different cells in the lower respiratory tract of humans and other mammals. *Am J Pathol*. Oktober 2007;171(4):1215–23.
6. Pan W, Dong Z, Li F, Meng W, Feng L, Niu X, u. a. Visualizing influenza virus infection in living mice. *Nat Commun*. 2013;4:2369.
7. Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:531–69.
8. Huang Q, Sivaramakrishna RP, Ludwig K, Korte T, Böttcher C, Herrmann A. Early steps of the conformational change of influenza virus hemagglutinin to a fusion active state: stability and energetics of the hemagglutinin. *Biochim Biophys Acta*. 11. Juli 2003;1614(1):3–13.
9. Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell*. 1. Mai 1992;69(3):517–28.
10. Boulo S, Akarsu H, Ruigrok RWH, Baudin F. Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Res*. März 2007;124(1–2):12–21.
11. Hale BG, Randall RE, Ortín J, Jackson D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J Gen Virol*. Oktober 2008;89(Pt 10):2359–76.
12. Samji T. Influenza A: understanding the viral life cycle. *Yale J Biol Med*. Dezember 2009;82(4):153–9.
13. Keil G, Lenhardt F, Weisser C. Vom Einfluss der Gestirne auf die Gesundheit und den Charakter des Menschen: Kommentar zur Faksimile-Ausgabe des Manuskriptes C 54 der Zentralbibliothek Zürich (Nürnberger Kodex Schürstab). Faksimile-Verlag; 1983.

-
14. Potter CW. A history of influenza. *J Appl Microbiol.* Oktober 2001;91(4):572–9.
 15. Pyle GF. *The diffusion of influenza : patterns and paradigms.* Rowman & Littlefield; 1986. 218 S.
 16. Crosby AW. *Epidemic and Peace, 1918.* Bd. 22, *Medical History.* Westford, CT: Greenwood Press; 1976. 111 S.
 17. Beveridge WIB. *Influenza: the Last Great Plague.* London: Heinemann; 1977.
 18. Nicholls H. Pandemic Influenza: The Inside Story. *PLoS Biol.* 14. Februar 2006;4(2):e50.
 19. EINet - Alert [Internet]. 2005 [zitiert 2. Oktober 2016]. Verfügbar unter: <https://depts.washington.edu/einet/newsbrief74.html>
 20. Michaelis M., Doerr H. W., Cinatl J. Jr. An influenza A H1N1 virus revival - pandemic H1N1/09 virus. *Infection.* 2009;37(5):381–9.
 21. Cheng VCC, To KKW, Tse H, Hung IFN, Yuen K-Y. Two years after pandemic influenza A/2009/H1N1: what have we learned? *Clin Microbiol Rev.* April 2012;25(2):223–63.
 22. Dawood FS, Iuliano AD, Reed C, Meltzer MI, Shay DK, Cheng P-Y, u. a. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. *Lancet Infect Dis.* September 2012;12(9):687–95.
 23. Centers for Disease Control and Prevention. First Global Estimates of 2009 H1N1 Pandemic Mortality Released by CDC-Led Collaboration | Spotlights (Flu) | CDC [Internet]. [zitiert 8. Oktober 2016]. Verfügbar unter: <http://www.cdc.gov/flu/spotlights/pandemic-global-estimates.htm>
 24. WHO. WHO | Avian influenza [Internet]. World Health Organization. World Health Organization; 2016 [zitiert 27. September 2016]. Verfügbar unter: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian_influenza/en/
 25. FDA. Questions about Vaccines - H5N1 Influenza Virus Vaccine, manufactured by Sanofi Pasteur, Inc. Questions and Answers. Center for Biologics Evaluation and Research; 2007.
 26. European Medicines Agency - Find medicine - Adjupanix [Internet]. Verfügbar unter: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/001206/human_med_001214.jsp&mid=WC0b01ac058001d124
 27. WHO. Global Action Plan for Influenza Vaccines (GAP) [Internet]. WHO. World Health Organization; 2016 [zitiert 2. Oktober 2016]. Verfügbar unter: http://www.who.int/influenza_vaccines_plan/en/
-

-
28. Robert Koch-Institut. RKI - RKI-Ratgeber für Ärzte - Influenza (Teil 1): Erkrankungen durch saisonale Influenzaviren [Internet]. 2016 [zitiert 2. Oktober 2016]. Verfügbar unter: http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Influenza_saisonal.html#doc2382022bodyText12
 29. Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 10. Aufl. München: Urban & Fischer Verlag in Elsevier GmbH; 2009.
 30. Jefferson T, Jones MA, Doshi P, Del Mar CB, Hama R, Thompson MJ, u. a. Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in adults and children. In: Jefferson T, Herausgeber. Cochrane Database of Systematic Reviews. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2014.
 31. Moore C, Galiano M, Lackenby A, Abdelrahman T, Barnes R, Evans MR, u. a. Evidence of person-to-person transmission of oseltamivir-resistant pandemic influenza A(H1N1) 2009 virus in a hematology unit. *J Infect Dis.* 1. Januar 2011;203(1):18–24.
 32. Spanakis N, Pitiriga V, Gennimata V, Tsakris A. A review of neuraminidase inhibitor susceptibility in influenza strains. *Expert Rev Anti Infect Ther.* November 2014;12(11):1325–36.
 33. Ebell MH, Call M, Shinholser J. Effectiveness of oseltamivir in adults: a meta-analysis of published and unpublished clinical trials. *Fam Pract.* April 2013;30(2):125–33.
 34. Michiels B, Van Puyenbroeck K, Verhoeven V, Vermeire E, Coenen S. The value of neuraminidase inhibitors for the prevention and treatment of seasonal influenza: a systematic review of systematic reviews. *PLoS One.* 2013;8(4):e60348.
 35. Ständige Impfkommision (STIKO). Empfehlungen der Ständigen Impfkommision (STIKO) am Robert Koch-Institut – 2016/2017. 2016.
 36. WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2017 southern hemisphere influenza season [Internet]. World Health Organization; 2016 [zitiert 2. Oktober 2016]. Verfügbar unter: http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2017_south/en/
 37. WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2016-2017 northern hemisphere influenza season [Internet]. World Health Organization; 2016 [zitiert 2. Oktober 2016]. Verfügbar unter: http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2016_17_north/en/
 38. Soema PC, Kompier R, Amorij J-P, Kersten GFA. Current and next generation influenza vaccines: Formulation and production strategies. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft für Pharm Verfahrenstechnik eV.* August 2015;94:251–63.
-

-
39. Paul Ehrlich-Institut. Liste zugelassener Impfstoffe gegen Grippe: Impfstoffe gegen Influenza [Internet]. 2016 [zitiert 2. Oktober 2016]. Verfügbar unter: <http://www.pei.de/DE/arzneimittel/impfstoff-impfstoffe-fuer-den-menschen/influenza-grippe/influenza-grippe-node.html>
 40. Ambrose CS, Levin MJ, Belshe RB. The relative efficacy of trivalent live attenuated and inactivated influenza vaccines in children and adults. *Influenza Other Respi Viruses*. März 2011;5(2):67–75.
 41. Ashkenazi S, Vertruyen A, Aristegui J, Esposito S, McKeith DD, Klemola T, u. a. Superior relative efficacy of live attenuated influenza vaccine compared with inactivated influenza vaccine in young children with recurrent respiratory tract infections. *Pediatr Infect Dis J*. Oktober 2006;25(10):870–9.
 42. Fleming DM, Crovari P, Wahn U, Klemola T, Schlesinger Y, Langussis A, u. a. Comparison of the efficacy and safety of live attenuated cold-adapted influenza vaccine, trivalent, with trivalent inactivated influenza virus vaccine in children and adolescents with asthma. *Pediatr Infect Dis J*. Oktober 2006;25(10):860–9.
 43. Belshe RB, Edwards KM, Vesikari T, Black S V, Walker RE, Hultquist M, u. a. Live attenuated versus inactivated influenza vaccine in infants and young children. *N Engl J Med*. 15. Februar 2007;356(7):685–96.
 44. Tosh PK, Boyce TG, Poland GA. Flu Myths: Dispelling the Myths Associated With Live Attenuated Influenza Vaccine. *Mayo Clin Proc*. 2008;83(1):77–84.
 45. Geeraedts F, Goutagny N, Hornung V, Severa M, de Haan A, Pool J, u. a. Superior Immunogenicity of Inactivated Whole Virus H5N1 Influenza Vaccine is Primarily Controlled by Toll-like Receptor Signalling. Subbarao K, Herausgeber. *PLoS Pathog*. 29. August 2008;4(8):e1000138.
 46. Doroshenko A, Halperin SA. Trivalent MDCK cell culture-derived influenza vaccine Optaflu[®] (Novartis Vaccines). *Expert Rev Vaccines*. 9. Juni 2009;8(6):679–88.
 47. Tree JA, Richardson C, Fooks AR, Clegg JC, Looby D. Comparison of large-scale mammalian cell culture systems with egg culture for the production of influenza virus A vaccine strains. *Vaccine*. 14. Mai 2001;19(25–26):3444–50.
 48. Hegde NR. Cell culture-based influenza vaccines: A necessary and indispensable investment for the future. *Hum Vaccin Immunother*. 2015;11(5):1223–34.
 49. World Health Organization. Weekly epidemiological record: H5N1 avian influenza: first steps towards development of a human vaccine [Internet]. 2005 [zitiert 3. Oktober 2016]. Verfügbar unter: <http://www.who.int/wer/2005/wer8033.pdf>
 50. Perdue ML, Arnold F, Li S, Donabedian A, Cioce V, Warf T, u. a. The future of cell culture-based influenza vaccine production. *Expert Rev Vaccines*. 9. August 2011;10(8):1183–94.
-

-
51. Jordan I, Sandig V. Matrix and backstage: cellular substrates for viral vaccines. *Viruses*. April 2014;6(4):1672–700.
 52. Potter CW, Oxford JS. Determinants of immunity to influenza infection in man. *Br Med Bull*. Januar 1979;35(1):69–75.
 53. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Serum cross-reactive antibody response to a novel influenza A (H1N1) virus after vaccination with seasonal influenza vaccine. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 22. Mai 2009;58(19):521–4.
 54. Black S, Nicolay U, Vesikari T, Knuf M, Del Giudice G, Della Cioppa G, u. a. Hemagglutination inhibition antibody titers as a correlate of protection for inactivated influenza vaccines in children. *Pediatr Infect Dis J*. Dezember 2011;30(12):1081–5.
 55. Centers for Disease Control and Prevention. Adjusted vaccine effectiveness estimates for influenza seasons from 2005 - 2016 [Internet]. 2016 [zitiert 3. Oktober 2016]. Verfügbar unter: <http://www.cdc.gov/flu/pdf/professionals/vaccination/vaccine-effectiveness-table-2016.pdf>
 56. Osterholm MT, Kelley NS, Sommer A, Belongia EA, Davenport F, Fiore A, u. a. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. Januar 2012;12(1):36–44.
 57. Buda S, Köpke K, Prahm K, Schweiger B, Wedde M, Duwe S, u. a. Bericht zur Epidemiologie der Influenza in Deutschland Saison 2014/15. 2015.
 58. Van Kerkhove MD, Mumford E, Mounts AW, Bresee J, Ly S, Bridges CB, u. a. Highly Pathogenic Avian Influenza (H5N1): Pathways of Exposure at the Animal-Human Interface, a Systematic Review. Braga EM, Herausgeber. *PLoS One*. 24. Januar 2011;6(1):e14582.
 59. WHO. H5N1 highly pathogenic avian influenza: Timeline of major events [Internet]. 2014 [zitiert 4. Oktober 2016]. Verfügbar unter: http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/H5N1_avian_influenza_update20141204.pdf?ua=1
 60. WHO. Current WHO global phase of pandemic alert: Avian Influenza A(H5N1) [Internet]. WHO. World Health Organization; 2013 [zitiert 4. Oktober 2016]. Verfügbar unter: <http://www.who.int/influenza/preparedness/pandemic/h5n1phase/en/>
 61. Luke CJ, Subbarao K. Vaccines for Pandemic Influenza. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(1):66–72.
-

-
62. WHO. Background and summary of human infection with avian influenza A(H7N9) virus – as of 31 January 2014 [Internet]. 2014 [zitiert 4. Oktober 2016]. Verfügbar unter: http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/20140131_background_and_summary_H7N9_v1.pdf
 63. Baz M, Luke CJ, Cheng X, Jin H, Subbarao K. H5N1 vaccines in humans. *Virus Res.* 5. Dezember 2013;178(1):78–98.
 64. Wu J, Liu S-Z, Dong S-S, Dong X-P, Zhang W-L, Lu M, u. a. Safety and immunogenicity of adjuvanted inactivated split-virion and whole-virion influenza A (H5N1) vaccines in children: a phase I-II randomized trial. *Vaccine.* 31. August 2010;28(38):6221–7.
 65. Paul Ehrlich-Institut. PEI Liste zugelassener Pandemischer Influenzaimpfstoffe [Internet]. 2016 [zitiert 4. Oktober 2016]. Verfügbar unter: <http://www.pei.de/DE/arzneimittel/impfstoff-impfstoffe-fuer-den-menschen/influenza-grippe/pandemische-influenzaimpfstoffe/pandemische-influenzaimpfstoffe-node.html>
 66. Paul Ehrlich-Institut. PEI Liste zugelassener Präpandemischer Influenzaimpfstoffe [Internet]. 2016 [zitiert 4. Oktober 2016]. Verfügbar unter: <http://www.pei.de/DE/arzneimittel/impfstoff-impfstoffe-fuer-den-menschen/influenza-grippe/praepandemische-influenzaimpfstoffe/praepandemische-influenzaimpfstoffe-node.html>
 67. Goji NA, Nolan C, Hill H, Wolff M, Noah DL, Williams TB, u. a. Immune responses of healthy subjects to a single dose of intramuscular inactivated influenza A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) vaccine after priming with an antigenic variant. *J Infect Dis.* 1. September 2008;198(5):635–41.
 68. Bright RA, Carter DM, Daniluk S, Toapanta FR, Ahmad A, Gavrillov V, u. a. Influenza virus-like particles elicit broader immune responses than whole virion inactivated influenza virus or recombinant hemagglutinin. *Vaccine.* 10. Mai 2007;25(19):3871–8.
 69. Pushko P, Tumpey TM, Van Hoesen N, Belser JA, Robinson R, Nathan M, u. a. Evaluation of influenza virus-like particles and Novasome adjuvant as candidate vaccine for avian influenza. *Vaccine.* 22. Mai 2007;25(21):4283–90.
 70. Latham T, Galarza JM. Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins. *J Virol.* Juli 2001;75(13):6154–65.
 71. Khurana S, Wu J, Verma N, Verma S, Raghunandan R, Manischewitz J, u. a. H5N1 virus-like particle vaccine elicits cross-reactive neutralizing antibodies that preferentially bind to the oligomeric form of influenza virus hemagglutinin in humans. *J Virol.* November 2011;85(21):10945–54.
 72. Kim JH, Jacob J. DNA vaccines against influenza viruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009;333:197–210.
-

-
73. Flingai S, Czerwonko M, Goodman J, Kudchodkar SB, Muthumani K, Weiner DB. Synthetic DNA vaccines: improved vaccine potency by electroporation and co-delivered genetic adjuvants. *Front Immunol.* 4. November 2013;4:354.
 74. WHO. DNA vaccines. WHO. World Health Organization; 2011.
 75. Sullivan SM, Doukas J, Hartikka J, Smith L, Rolland A. Vaxfectin: a versatile adjuvant for plasmid DNA- and protein-based vaccines. *Expert Opin Drug Deliv.* Dezember 2010;7(12):1433–46.
 76. Ferraro B, Morrow MP, Hutnick NA, Shin TH, Lucke CE, Weiner DB. Clinical applications of DNA vaccines: current progress. *Clin Infect Dis.* 1. August 2011;53(3):296–302.
 77. Siegismund CS, Hohn O, Kurth R, Norley S. Enhanced T- and B-cell responses to simian immunodeficiency virus (SIV)agm, SIVmac and human immunodeficiency virus type 1 Gag DNA immunization and identification of novel T-cell epitopes in mice via codon optimization. *J Gen Virol.* Oktober 2009;90(Pt 10):2513–8.
 78. Song R, Liu S, Adams RJ, Leong KW. Enhancing efficacy of HIV gag DNA vaccine by local delivery of GM-CSF in murine and macaque models. *J Interferon Cytokine Res.* Juni 2006;26(6):380–9.
 79. Smith LR, Wloch MK, Ye M, Reyes LR, Boutsaboualoy S, Dunne CE, u. a. Phase 1 clinical trials of the safety and immunogenicity of adjuvanted plasmid DNA vaccines encoding influenza A virus H5 hemagglutinin. *Vaccine.* 16. März 2010;28(13):2565–72.
 80. Ledgerwood JE, Wei C-J, Hu Z, Gordon IJ, Enama ME, Hendel CS, u. a. DNA priming and influenza vaccine immunogenicity: two phase 1 open label randomised clinical trials. *Lancet Infect Dis.* Dezember 2011;11(12):916–24.
 81. de Vries RD, Rimmelzwaan GF. Viral vector-based influenza vaccines. *Hum Vaccin Immunother.* 2016;5515(August):00–00.
 82. Hessel A, Schwendinger M, Holzer GW, Orlinger KK, Coulibaly S, Savidis-Dacho H, u. a. Vectors based on modified vaccinia Ankara expressing influenza H5N1 hemagglutinin induce substantial cross-clade protective immunity. *PLoS One.* 2011;6(1):e16247.
 83. Kreijtz JHCM, Goeijenbier M, Moesker FM, van den Dries L, Goeijenbier S, De Gruyter HLM, u. a. Safety and immunogenicity of a modified-vaccinia-virus-Ankara-based influenza A H5N1 vaccine: a randomised, double-blind phase 1/2a clinical trial. *Lancet Infect Dis.* Dezember 2014;14(12):1196–207.
 84. de Vries RD, De Gruyter HLM, Bestebroer TM, Pronk M, Fouchier RAM, Osterhaus ADME, u. a. Induction of influenza (H5N8) antibodies by modified vaccinia virus Ankara H5N1 vaccine. *Emerg Infect Dis.* Juni 2015;21(6):1086–8.
-

-
85. Gurwith M, Lock M, Taylor EM, Ishioka G, Alexander J, Mayall T, u. a. Safety and immunogenicity of an oral, replicating adenovirus serotype 4 vector vaccine for H5N1 influenza: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 study. *Lancet Infect Dis.* März 2013;13(3):238–50.
 86. Hong SS, Habib NA, Franqueville L, Jensen S, Boulanger PA. Identification of adenovirus (ad) penton base neutralizing epitopes by use of sera from patients who had received conditionally replicative ad (add11520) for treatment of liver tumors. *J Virol.* Oktober 2003;77(19):10366–75.
 87. Bauer U, Flunker G, Bruss K, Kallwellis K, Liebermann H, Luetlich T, u. a. Detection of antibodies against adenovirus protein IX, fiber, and hexon in human sera by immunoblot assay. *J Clin Microbiol.* September 2005;43(9):4426–33.
 88. Kostense S, Koudstaal W, Sprangers M, Weverling GJ, Penders G, Helmus N, u. a. Adenovirus types 5 and 35 seroprevalence in AIDS risk groups supports type 35 as a vaccine vector. *AIDS.* 21. Mai 2004;18(8):1213–6.
 89. Thorner AR, Vogels R, Kaspers J, Weverling GJ, Holterman L, Lemckert AAC, u. a. Age dependence of adenovirus-specific neutralizing antibody titers in individuals from sub-Saharan Africa. *J Clin Microbiol.* Oktober 2006;44(10):3781–3.
 90. Nwanegbo E, Vardas E, Gao W, Whittle H, Sun H, Rowe D, u. a. Prevalence of neutralizing antibodies to adenoviral serotypes 5 and 35 in the adult populations of The Gambia, South Africa, and the United States. *Clin Diagn Lab Immunol.* März 2004;11(2):351–7.
 91. Tursz T, Cesne AL, Baldeyrou P, Gautier E, Opolon P, Schatz C, u. a. Phase I study of a recombinant adenovirus-mediated gene transfer in lung cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 18. Dezember 1996;88(24):1857–63.
 92. 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. Randall TD, Herausgeber. *PLoS One.* 16. Dezember 2010;5(12):e15301.
 93. Bangari DS, Mittal SK. Development of nonhuman adenoviruses as vaccine vectors. *Vaccine.* 2006;24(7):849–62.
 94. Bangari DS, Shukla S, Mittal SK. Comparative transduction efficiencies of human and nonhuman adenoviral vectors in human, murine, bovine, and porcine cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 18. Februar 2005;327(3):960–6.
 95. Alonso-Padilla J, Papp T, Kaján GL, Benkő M, Havenga M, Lemckert A, u. a. Development of novel adenoviral vectors to overcome challenges observed with HAdV-5 based constructs. *Mol Ther.* 19. Oktober 2015;24(1):6.
-

-
96. Kreijtz JHCM, Fouchier RAM, Rimmelzwaan GF. Immune responses to influenza virus infection. *Virus Res.* 2011;162(1-2):19-30.
 97. Quiñones-Parra S, Loh L, Brown LE, Kedzierska K, Valkenburg SA. Universal immunity to influenza must outwit immune evasion. *Front Microbiol.* 2014;5:285.
 98. Cox NJ, Hickling J, Jones R, Rimmelzwaan GF, Lambert LC, Boslego J, u. a. Report on the second WHO integrated meeting on development and clinical trials of influenza vaccines that induce broadly protective and long-lasting immune responses: Geneva, Switzerland, 5-7 May 2014. *Vaccine.* 2015;33(48):6503-10.
 99. Deng L, Cho KJ, Fiers W, Saelens X. M2e-Based Universal Influenza A Vaccines. *Vaccines.* 13. Februar 2015;3(1):105-36.
 100. De Filette M, Ramne A, Birkett A, Lycke N, Löwenadler B, Min Jou W, u. a. The universal influenza vaccine M2e-HBc administered intranasally in combination with the adjuvant CTA1-DD provides complete protection. *Vaccine.* 30. Januar 2006;24(5):544-51.
 101. Ernst WA, Kim HJ, Tumpey TM, Jansen ADA, Tai W, Cramer D V, u. a. Protection against H1, H5, H6 and H9 influenza A infection with liposomal matrix 2 epitope vaccines. *Vaccine.* 12. Juni 2006;24(24):5158-68.
 102. Lee Y-N, Kim M-C, Lee Y-T, Kim Y-J, Kang S-M. Mechanisms of Cross-protection by Influenza Virus M2-based Vaccines. *Immune Netw.* Oktober 2015;15(5):213-21.
 103. Krammer F, Palese P. Advances in the development of influenza virus vaccines. *Nat Rev Drug Discov.* 27. Februar 2015;14(3):167-82.
 104. Jegaskanda S, Weinfurter JT, Friedrich TC, Kent SJ. Antibody-dependent cellular cytotoxicity is associated with control of pandemic H1N1 influenza virus infection of macaques. *J Virol.* Mai 2013;87(10):5512-22.
 105. Gottlieb T, Ben-Yedidia T. Epitope-based approaches to a universal influenza vaccine. *J Autoimmun.* November 2014;54:15-20.
 106. Atsmon J, Caraco Y, Ziv-Sefer S, Shaikevich D, Abramov E, Volokhov I, u. a. Priming by a novel universal influenza vaccine (Multimeric-001)-a gateway for improving immune response in the elderly population. *Vaccine.* 7. Oktober 2014;32(44):5816-23.
 107. Kobayashi H, Iwatsuki-Horimoto K, Kiso M, Uraki R, Ichiko Y, Takimoto T, u. a. A replication-incompetent influenza virus bearing the HN glycoprotein of human parainfluenza virus as a bivalent vaccine. *Vaccine.* 16. Dezember 2013;31(52):6239-46.
 108. FluGen. FluGen Inc. [Internet]. 2016 [zitiert 6. Oktober 2016]. Verfügbar unter: <http://flugen.com/>
-

-
109. Coughlan L, Lambe T. Measuring Cellular Immunity to Influenza: Methods of Detection, Applications and Challenges. *Vaccines*. 2015;3(2):293–319.
 110. Stoloff GA, Caparros-Wanderley W. Synthetic multi-epitope peptides identified in silico induce protective immunity against multiple influenza serotypes. *Eur J Immunol*. September 2007;37(9):2441–9.
 111. Pleguezuelos O, Robinson S, Stoloff GA, Caparrós-Wanderley W. Synthetic Influenza vaccine (FLU-v) stimulates cell mediated immunity in a double-blind, randomised, placebo-controlled Phase I trial. *Vaccine*. 29. Juni 2012;30(31):4655–60.
 112. Pleguezuelos O, Robinson S, Fernández A, Stoloff GA, Mann A, Gilbert A, u. a. A Synthetic Influenza Virus Vaccine Induces a Cellular Immune Response That Correlates with Reduction in Symptomatology and Virus Shedding in a Randomized Phase Ib Live-Virus Challenge in Humans. *Clin Vaccine Immunol*. Juli 2015;22(7):828–35.
 113. FLU VACCINE PROGRAMME – IMUTEX [Internet]. Verfügbar unter: <http://imutex.com/index.php/flu-vaccine-programme/>
 114. Berlanda Scorza F, Tsvetnitsky V, Donnelly JJ. Universal influenza vaccines: Shifting to better vaccines. *Vaccine*. 3. Juni 2016;34(26):2926–33.
 115. Lambe T, Carey JB, Li Y, Spencer AJ, van Laarhoven A, Mullarkey CE, u. a. Immunity against heterosubtypic influenza virus induced by adenovirus and MVA expressing nucleoprotein and matrix protein-1. *Sci Rep*. 2013;3:1443.
 116. Altenburg AF, Kreijtz JHCM, de Vries RD, Song F, Fux R, Rimmelzwaan GF, u. a. Modified vaccinia virus ankara (MVA) as production platform for vaccines against influenza and other viral respiratory diseases. *Viruses*. Juli 2014;6(7):2735–61.
 117. Florek NW, Weinfurter JT, Jegaskanda S, Brewoo JN, Powell TD, Young GR, u. a. Modified vaccinia virus Ankara encoding influenza virus hemagglutinin induces heterosubtypic immunity in macaques. *J Virol*. November 2014;88(22):13418–28.
 118. Antrobus RD, Coughlan L, Berthoud TK, Dicks MD, Hill AV, Lambe T, u. a. Clinical assessment of a novel recombinant simian adenovirus ChAdOx1 as a vectored vaccine expressing conserved Influenza A antigens. *Mol Ther*. März 2014;22(3):668–74.
 119. Hessel A, Savidis-Dacho H, Coulibaly S, Portsmouth D, Kreil TR, Crowe BA, u. a. MVA vectors expressing conserved influenza proteins protect mice against lethal challenge with H5N1, H9N2 and H7N1 viruses. *PLoS One*. 2014;9(2).
 120. Atchison RW, Casto BC, Hammon WM. ADENOVIRUS-ASSOCIATED DEFECTIVE VIRUS PARTICLES. *Science*. 13. August 1965;149(3685):754–6.

-
121. Hoggan MD, Blacklow NR, Rowe WP. Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Juni 1966;55(6):1467–74.
 122. Blacklow NR. Adeno-associated viruses of humans. In: *Parvoviruses and Human Disease*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press; 1988. S. 165–174.
 123. Rose JA, Berns KI, Hoggan MD, Koczot FJ. Evidence for a single-stranded adenovirus-associated virus genome: formation of a DNA density hybrid on release of viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. November 1969;64(3):863–9.
 124. Weitzman M, Linden R. Adeno-associated virus biology. *Methods Mol Biol*. 2011;807:1–23.
 125. Gene Therapy Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors Explained [Internet]. Verfügbar unter: <http://www.genetherapynet.com/viral-vector/adeno-associated-viruses.html>
 126. Bartlett JS, Wilcher R, Samulski RJ. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J Virol*. März 2000;74(6):2777–85.
 127. Vance MA, Mitchell A, Samulski RJ. AAV Biology, Infectivity and Therapeutic Use from Bench to Clinic. In: *Gene Therapy - Principles and Challenges*. InTech; 2015.
 128. Deyle DR, Russell DW. Adeno-associated virus vector integration. *Curr Opin Mol Ther*. August 2009;11(4):442–7.
 129. Carter B. Adeno-associated virus and the development of adeno-associated virus vectors: a historical perspective. *Mol Ther*. Dezember 2004;10(6):981–9.
 130. Daya S, Berns KI. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev*. Oktober 2008;21(4):583–93.
 131. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, u. a. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science*. 20. Oktober 1995;270(5235):475–80.
 132. Ginn SL, Alexander IE, Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update. *J Gene Med*. Februar 2013;15(2):65–77.
 133. Kaufmann KB, Bening H, Galy A, Schambach A, Grez M. Gene therapy on the move. *EMBO Mol Med*. 2013;5(11):1642–61.
 134. Kotterman MA, Schaffer D V. Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat Rev Genet*. 2014;15(7):445–51.
 135. Wilson JM. Gendicine: the first commercial gene therapy product. *Hum Gene Ther*. September 2005;16(9):1014–5.
 136. Peng Z. Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum Gene Ther*. September 2005;16(9):1016–27.
-

-
137. Tratschin JD, West MH, Sandbank T, Carter BJ. A human parvovirus, adeno-associated virus, as a eucaryotic vector: transient expression and encapsidation of the procaryotic gene for chloramphenicol acetyltransferase. *Mol Cell Biol.* Oktober 1984;4(10):2072–81.
 138. Hermonat PL, Muzyczka N. Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oktober 1984;81(20):6466–70.
 139. Flotte T, Carter B, Conrad C, Guggino W, Reynolds T, Rosenstein B, u. a. A phase I study of an adeno-associated virus-CFTR gene vector in adult CF patients with mild lung disease. *Hum Gene Ther.* 10. Juni 1996;7(9):1145–59.
 140. Rutledge EA, Halbert CL, Russell DW. Infectious clones and vectors derived from adeno-associated virus (AAV) serotypes other than AAV type 2. *J Virol.* Januar 1998;72(1):309–19.
 141. Xiao W, Chirmule N, Berta SC, McCullough B, Gao G, Wilson JM. Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. *J Virol.* Mai 1999;73(5):3994–4003.
 142. McClure C, Cole KLH, Wulff P, Klugmann M, Murray AJ. Production and Titering of Recombinant Adeno-associated Viral Vectors. *J Vis Exp.* 27. November 2011;(57):e3348–e3348.
 143. Rivière C, Danos O, Douar AM. Long-term expression and repeated administration of AAV type 1, 2 and 5 vectors in skeletal muscle of immunocompetent adult mice. *Gene Ther.* 11. September 2006;13(17):1300–8.
 144. Husain T, Passini MA, Parente MK, Fraser NW, Wolfe JH. Long-term AAV vector gene and protein expression in mouse brain from a small pan-cellular promoter is similar to neural cell promoters. *Gene Ther.* 21. Juli 2009;16(7):927–32.
 145. Piperno GM, López-Requena A, Predonzani A, Dorvignit D, Labrada M, Zentilin L, u. a. Recombinant AAV-mediated in vivo long-term expression and antitumour activity of an anti-ganglioside GM3(Neu5Gc) antibody. *Gene Ther.* Dezember 2015;22(12):960–7.
 146. Xiao X, Li J, Samulski RJ. Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J Virol.* 1996;70(11):8098–108.
 147. Kay MA, Manno CS, Ragni M V, Larson PJ, Couto LB, McClelland A, u. a. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet.* März 2000;24(3):257–61.
 148. Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M, Rasko JJ, u. a. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med.* März 2006;12(3):342–7.
-

-
149. Nathwani AC, Tuddenham EGD, Rangarajan S, Rosales C, McIntosh J, Linch DC, u. a. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med.* 22. Dezember 2011;365(25):2357–65.
 150. Kaplitt MG, Feigin A, Tang C, Fitzsimons HL, Mattis P, Lawlor PA, u. a. Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet (London, England).* 23. Juni 2007;369(9579):2097–105.
 151. LeWitt PA, Rezai AR, Leehey MA, Ojemann SG, Flaherty AW, Eskandar EN, u. a. AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *Lancet Neurol.* April 2011;10(4):309–19.
 152. Bainbridge JWB, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K, u. a. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med.* 22. Mai 2008;358(21):2231–9.
 153. Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, Cideciyan A V, Schwartz SB, Wang L, u. a. Treatment of leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. *Hum Gene Ther.* Oktober 2008;19(10):979–90.
 154. Leone P, Shera D, McPhee SWJ, Francis JS, Kolodny EH, Bilaniuk LT, u. a. Long-term follow-up after gene therapy for canavan disease. *Sci Transl Med.* 19. Dezember 2012;4(165):165ra163.
 155. Scott LJ. Alipogene tiparvovec: a review of its use in adults with familial lipoprotein lipase deficiency. *Drugs.* Februar 2015;75(2):175–82.
 156. UniQure. UniQure - Glybera [Internet]. [zitiert 18. September 2016]. Verfügbar unter: <http://www.uniqure.com/pipeline/glybera/>
 157. European Medicines Agency. Glybera alipogene tiparvovec EPAR summary for the public [Internet]. 2015 [zitiert 18. September 2016]. Verfügbar unter: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/002145/WC500135474.pdf
 158. Wollmann G, Tattersall P, van den Pol AN. Targeting human glioblastoma cells: comparison of nine viruses with oncolytic potential. *J Virol.* Mai 2005;79(10):6005–22.
 159. Verheije MH, Rottier PJM, Verheije MH, Rottier PJM. Retargeting of Viruses to Generate Oncolytic Agents. *Adv Virol.* 2012;2012:1–15.
 160. Laborda E, Puig-Saus C, Cascalló M, Chillón M, Alemany R. Adeno-associated virus enhances wild-type and oncolytic adenovirus spread. *Hum Gene Ther Methods.* Dezember 2013;24(6):372–80.
 161. Sayroo R, Nolasco D, Yin Z, Colon-Cortes Y, Pandya M, Ling C, u. a. Development of novel AAV serotype 6 based vectors with selective tropism for human cancer cells. *Gene Ther.* Januar 2016;23(1):18–25.
-

-
162. Rossi M, Carioli G, Bonifazi M, Zambelli A, Franchi M, Moja L, u. a. Trastuzumab for HER2+ metastatic breast cancer in clinical practice: Cardiotoxicity and overall survival. *Eur J Cancer*. Januar 2016;52:41–9.
 163. Münch RC, Muth A, Muik A, Friedel T, Schmatz J, Dreier B, u. a. Off-target-free gene delivery by affinity-purified receptor-targeted viral vectors. *Nat Commun*. 2015;6:6246.
 164. Santiago-Ortiz JL, Schaffer D V. Adeno-associated virus (AAV) vectors in cancer gene therapy. *J Control Release*. 2016;
 165. Boutin S, Monteilhet V, Veron P, Leborgne C, Benveniste O, Montus MF, u. a. Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors. *Hum Gene Ther*. Juni 2010;21(6):704–12.
 166. Halder S, Van Vliet K, Smith JK, Duong TTP, McKenna R, Wilson JM, u. a. Structure of neurotropic adeno-associated virus AAVrh.8. *J Struct Biol*. Oktober 2015;192(1):21–36.
 167. Li C, Wu S, Albright B, Hirsch M, Li W, Tseng Y-S, u. a. Development of Patient-specific AAV Vectors After Neutralizing Antibody Selection for Enhanced Muscle Gene Transfer. *Mol Ther*. Februar 2016;24(1):53–65.
 168. Wang M, Crosby A, Hastie E, Samulski JJ, McPhee S, Joshua G, u. a. Prediction of adeno-associated virus neutralizing antibody activity for clinical application. *Gene Ther*. Dezember 2015;22(12):984–92.
 169. Wang L, Calcedo R, Nichols TC, Bellinger DA, Dillow A, Verma IM, u. a. Sustained correction of disease in naive and AAV2-pretreated hemophilia B dogs: AAV2/8-mediated, liver-directed gene therapy. *Blood*. 15. April 2005;105(8):3079–86.
 170. Limberis MP, Wilson JM. Adeno-associated virus serotype 9 vectors transduce murine alveolar and nasal epithelia and can be readministered. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(35):12993–8.
 171. Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, Rabinowitz JE. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther*. 2008;16(6):1073–80.
 172. Lu Y-Y, Wang L-J, Muramatsu S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Okada T, u. a. Intramuscular injection of AAV-GDNF results in sustained expression of transgenic GDNF, and its delivery to spinal motoneurons by retrograde transport. *Neurosci Res*. Januar 2003;45(1):33–40.
 173. Tarantal AF, Lee CCI. Long-term luciferase expression monitored by bioluminescence imaging after adeno-associated virus-mediated fetal gene delivery in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Hum Gene Ther*. Februar 2010;21(2):143–8.

-
174. Doenecke A, Krömer A, Scherer MN, Schlitt H-J, Geissler EK. AAV plasmid DNA simplifies liver-directed in vivo gene therapy: comparison of expression levels after plasmid DNA-, adeno-associated virus- and adenovirus-mediated liver transfection. *J Gene Med.* Oktober 2010;12(10):810–7.
 175. Xin KQ, Urabe M, Yang J, Nomiya K, Mizukami H, Hamajima K, u. a. A novel recombinant adeno-associated virus vaccine induces a long-term humoral immune response to human immunodeficiency virus. *Hum Gene Ther.* 2001;12(9):1047–61.
 176. Tripp RA, Tompkins SM. Virus-vectored influenza virus vaccines. *Viruses.* 7. August 2014;6(8):3055–79.
 177. Balazs AB, Bloom JD, Hong CM, Rao DS, Baltimore D. Broad protection against influenza infection by vectored immunoprophylaxis in mice. *Nat Biotechnol.* Juli 2013;31(7):647–52.
 178. Limberis MP, Adam VS, Wong G, Gren J, Kobasa D, Ross TM, u. a. Intranasal antibody gene transfer in mice and ferrets elicits broad protection against pandemic influenza. *Sci Transl Med.* 2013;5(187):187ra72.
 179. Sipo I, Knauf M, Fechner H, Poller W, Planz O, Kurth R, u. a. Vaccine protection against lethal homologous and heterologous challenge using recombinant AAV vectors expressing codon-optimized genes from pandemic swine origin influenza virus (SOIV). *Vaccine.* 2011;29(8):1690–9.
 180. Hack R, Krüger C, Ruprecht L, Scheuber H-P, Thiel R, Weinert H, u. a. Ausschuss für Tierschutzbeauftragte in der GV-SOLAS 1 und Arbeitskreis 4 in der TVT 2 Empfehlung zur Substanzapplikation bei Versuchstieren. 2010.
 181. Ellis BL, Hirsch ML, Barker JC, Connelly JP, Steininger RJ, Porteus MH. A survey of ex vivo/in vitro transduction efficiency of mammalian primary cells and cell lines with Nine natural adeno-associated virus (AAV1-9) and one engineered adeno-associated virus serotype. *Virol J.* 2013;10(1):74.
 182. Amorij J-P, Hinrichs WL, Frijlink HW, Wilschut JC, Huckriede A. Needle-free influenza vaccination. *Lancet Infect Dis.* Oktober 2010;10(10):699–711.
 183. Tomar J, Born PA, Frijlink HW, Hinrichs WLJ. Dry influenza vaccines: towards a stable, effective and convenient alternative to conventional parenteral influenza vaccination. *Expert Rev Vaccines.* 21. Mai 2016;1–17.
 184. Vector Biolabs. Vector Biolabs: FAQ for adeno-associated virus (AAV) [Internet]. [zitiert 18. September 2016]. Verfügbar unter: <http://vectorbiolabs.com/vbs/page.html?m=262&s=AAV FAQ>
 185. Guo H, Topham DJ. Multiple distinct forms of CD8+ T cell cross-reactivity and specificities revealed after 2009 H1N1 influenza A virus infection in mice. *PLoS One.* 2012;7(9):e46166.
-

-
186. Zhong W, Liu F, Dong L, Lu X, Hancock K, Reinherz EL, u. a. Significant impact of sequence variations in the nucleoprotein on CD8 T cell-mediated cross-protection against influenza A virus infections. *PLoS One*. 2010;5(5):e10583.
 187. Voeten JT, Bestebroer TM, Nieuwkoop NJ, Fouchier R a, Osterhaus a D, Rimmelzwaan GF. Antigenic drift in the influenza A virus (H3N2) nucleoprotein and escape from recognition by cytotoxic T lymphocytes. *J Virol*. 2000;74(15):6800–7.
 188. Berkhoff EGM, Boon ACM, Nieuwkoop NJ, Fouchier RAM, Sintnicolaas K, Osterhaus ADME, u. a. A mutation in the HLA-B*2705-restricted NP383-391 epitope affects the human influenza A virus-specific cytotoxic T-lymphocyte response in vitro. *J Virol*. Mai 2004;78(10):5216–22.
 189. Kohler M, Rüttner B, Cooper S, Hengartner H, Zinkernagel RM. *Ancer Mmunology Mmunotherapy* ©. 1991;90–6.
 190. Yu P, Spiotto MT, Lee Y, Schreiber H, Fu Y-X. Complementary role of CD4+ T cells and secondary lymphoid tissues for cross-presentation of tumor antigen to CD8+ T cells. *J Exp Med*. 2003;197(8):985–95.
 191. Brandes M, Klauschen F, Kuchen S, Germain RN. A systems analysis identifies a feedforward inflammatory circuit leading to lethal influenza infection. *Cell*. 2013;154(1):197–212.
 192. Miyake K, Miyake N, Yamazaki Y, Shimanda T, Hirai Y. Serotype-independent Method of Recombinant Adeno-associated Virus (AAV) Vector Production and Purification. *J Nippon Med Sch*. 2012;79(6).
 193. Auricchio A, Hildinger M, O 'connor E, Gao G-P, Wilson JM. Isolation of Highly Infectious and Pure Adeno-Associated Virus Type 2 Vectors with a Single-Step Gravity-Flow Column. *Hum Gene Ther*. 2001;12:71–6.
 194. Liu Y, Wagner K, Robinson N, Sabatino D, Margaritis P, Xiao W, u. a. DRUG DISCOVERY Optimized Production of High-Titer Recombinant Adeno-Associated Virus in Roller Bottles. 2003;34(1).
 195. Chen VC, Couture LA. The suspension culture of undifferentiated human pluripotent stem cells using spinner flasks. *Methods Mol Biol*. 2015;1283:13–21.
 196. Kati S, Hage E, Mynarek M, Ganzenmueller T, Indenbirken D, Grundhoff A, u. a. Generation of high-titre virus stocks using BrK.219, a B-cell line infected stably with recombinant Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol Methods*. 1. Juni 2015;217:79–86.
 197. Ehrke-Schulz E, Zhang W, Schiwon M, Bergmann T, Solanki M, Liu J, u. a. Cloning and Large-Scale Production of High-Capacity Adenoviral Vectors Based on the Human Adenovirus Type 5. *J Vis Exp*. 2016;(107):e52894.
-

-
198. Thomas DL, Wang L, Niamke J, Liu J, Kang W, Scotti MM, u. a. Scalable recombinant adeno-associated virus production using recombinant herpes simplex virus type 1 coinfection of suspension-adapted mammalian cells. *Hum Gene Ther.* August 2009;20(8):861–70.
 199. Rayaprolu V, Kruse S, Kant R, Venkatakrishnan B, Movahed N, Brooke D, u. a. Comparative analysis of adeno-associated virus capsid stability and dynamics. *J Virol.* Dezember 2013;87(24):13150–60.
 200. Venkatakrishnan B, Yarbrough J, Domsic J, Bennett A, Bothner B, Kozyreva OG, u. a. Structure and dynamics of adeno-associated virus serotype 1 VP1-unique N-terminal domain and its role in capsid trafficking. *J Virol.* Mai 2013;87(9):4974–84.
 201. Potter M, Lins B, Mietzsch M, Heilbronn R, Van Vliet K, Chipman P, u. a. A simplified purification protocol for recombinant adeno-associated virus vectors. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2014;1:14034.
 202. Wu Z, Asokan A, Samulski R. Adeno-associated Virus Serotypes: Vector Toolkit for Human Gene Therapy. *Mol Ther.* September 2006;14(3):316–27.
 203. Inagaki K, Fuess S, Storm TA, Gibson GA, Mctiernan CF, Kay MA, u. a. Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Mol Ther.* Juli 2006;14(1):45–53.
 204. Pacak CA, Mah CS, Thattaliyath BD, Conlon TJ, Lewis MA, Cloutier DE, u. a. Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo. *Circ Res.* 18. August 2006;99(4):e3-9.
 205. Zuckerman JN. The importance of injecting vaccines into muscle. Different patients need different needle sizes. *BMJ.* 18. November 2000;321(7271):1237–8.
 206. Zeng H, Goldsmith CS, Maines TR, Belser JA, Gustin KM, Pekosz A, u. a. Tropism and infectivity of influenza virus, including highly pathogenic avian H5N1 virus, in ferret tracheal differentiated primary epithelial cell cultures. *J Virol.* März 2013;87(5):2597–607.
 207. van Riel D, den Bakker MA, Leijten LME, Chutinimitkul S, Munster VJ, de Wit E, u. a. Seasonal and pandemic human influenza viruses attach better to human upper respiratory tract epithelium than avian influenza viruses. *Am J Pathol.* April 2010;176(4):1614–8.
 208. Liqun Wang R, McLaughlin T, Cossette T, Tang Q, Foust K, Campbell-Thompson M, u. a. Recombinant AAV serotype and capsid mutant comparison for pulmonary gene transfer of alpha-1-antitrypsin using invasive and noninvasive delivery. *Mol Ther.* Januar 2009;17(1):81–7.
 209. Taylor PM, Askonas BA. Influenza nucleoprotein-specific cytotoxic T-cell clones are protective in vivo. *Immunology.* Juli 1986;58(3):417–20.
-

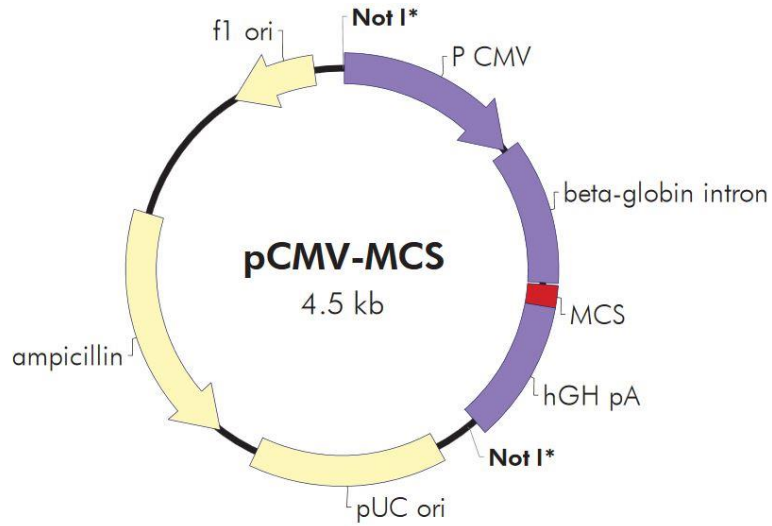
-
210. Carragher DM, Kaminski DA, Moquin A, Hartson L, Randall TD. A novel role for non-neutralizing antibodies against nucleoprotein in facilitating resistance to influenza virus. *J Immunol.* 2008;181(6):4168–76.
 211. Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H. *Molekulare Virologie.* 3. Aufl. Bd. 1, Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015. 2010. 68 S.
 212. Hayward AC, Wang L, Goonetilleke N, Fragaszy EB, Bermingham A, Copas A, u. a. Natural T cell-mediated protection against seasonal and pandemic influenza: Results of the flu watch cohort study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;191(12):1422–31.
 213. Ulmer JB, Fu TM, Deck RR, Friedman A, Guan L, DeWitt C, u. a. Protective CD4+ and CD8+ T cells against influenza virus induced by vaccination with nucleoprotein DNA. *J Virol.* Juli 1998;72(7):5648–53.
 214. Price GE, Soboleski MR, Lo CY, Mispion JA, Quirion MR, Houser K V., u. a. Single-dose mucosal immunization with a candidate universal influenza vaccine provides rapid protection from virulent H5N1, H3N2 and H1N1 viruses. *PLoS One.* 2010;5(10).
 215. Xue C, Tian G, Chen X, Liu Q, Ma J, Xu S, u. a. Incorporation of conserved nucleoprotein into influenza virus-like particles could provoke a broad protective immune response in BALB/c mice and chickens. *Virus Res.* 2015;195:35–42.
 216. Muruve DA, Barnes MJ, Stillman IE, Libermann TA. Adenoviral gene therapy leads to rapid induction of multiple chemokines and acute neutrophil-dependent hepatic injury in vivo. *Hum Gene Ther.* 10. April 1999;10(6):965–76.
 217. Lehmann MH, Kastenmuller W, Kandemir JD, Brandt F, Suezer Y, Sutter G. Modified vaccinia virus ankara triggers chemotaxis of monocytes and early respiratory immigration of leukocytes by induction of CCL2 expression. *J Virol.* März 2009;83(6):2540–52.
 218. Shcherbo D, Murphy CS, Ermakova G V, Solovieva EA, Chepurnykh T V, Shcheglov AS, u. a. Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues. *Biochem J.* 15. März 2009;418(3):567–74.
 219. Blazevic V, Trubey CM, Shearer GM. Analysis of the costimulatory requirements for generating human virus-specific in vitro T helper and effector responses. *J Clin Immunol.* Juli 2001;21(4):293–302.
 220. Liang L, Sha WC. The right place at the right time: novel B7 family members regulate effector T cell responses. *Curr Opin Immunol.* Juni 2002;14(3):384–90.
 221. Croft M. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol.* August 2003;3(8):609–20.
 222. Lee JS, Chowdhury MYE, Moon HJ, Choi YK, Talactac MR, Kim JH, u. a. The highly conserved HA2 protein of the influenza A virus induces a cross protective immune response. *J Virol Methods.* 2013;194(1–2):280–8.
-

-
223. Zhou Z, Kim S, Hurtado J, Lee ZH, Kim KK, Pollok KE, u. a. Characterization of human homologue of 4-1BB and its ligand. *Immunol Lett.* 1995;45(1):67–73.
 224. Sica G, Chen L. Biochemical and immunological characteristics of 4-1BB (CD137) receptor and ligand and potential applications in cancer therapy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 1999;47(5):275–9.
 225. Duan S, Thomas PG. Balancing Immune Protection and Immune Pathology by CD8(+) T-Cell Responses to Influenza Infection. *Front Immunol.* 2016;7(February):25.
 226. Gilbert SC. Advances in the development of universal influenza vaccines. *Influenza Other Respi Viruses.* 2013;7(5):750–8.
 227. Ekiert DC, Bhabha G, Elsliger M-A, Friesen RHE, Jongeneelen M, Throsby M, u. a. Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. *Science.* 10. April 2009;324(5924):246–51.
 228. Corti D, Voss J, Gamblin SJ, Codoni G, Macagno A, Jarrossay D, u. a. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins. *Science.* 12. August 2011;333(6044):850–6.
 229. Krammer F, Palese P. Influenza virus hemagglutinin stalk-based antibodies and vaccines. *Curr Opin Virol.* Oktober 2013;3(5):521–30.
 230. Sui J, Hwang WC, Perez S, Wei G, Aird D, Chen L, u. a. Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses. *Nat Struct Mol Biol.* März 2009;16(3):265–73.
 231. National Museum of Health and Medicine, Armed Forces Institute of Pathology W. Soldiers from Fort Riley, Kansas, ill with Spanish influenza at a hospital ward at Camp Funston [Internet]. [zitiert 18. September 2016]. Verfügbar unter: <https://www.army.mil/e2/-images/2008/09/24/22729/army.mil-2008-09-25-103608.jpg>

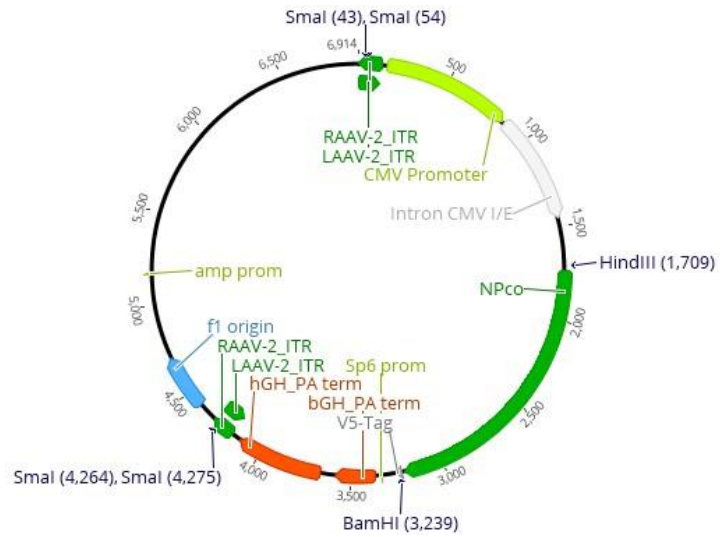
ANHANG

VEKTORKARTEN

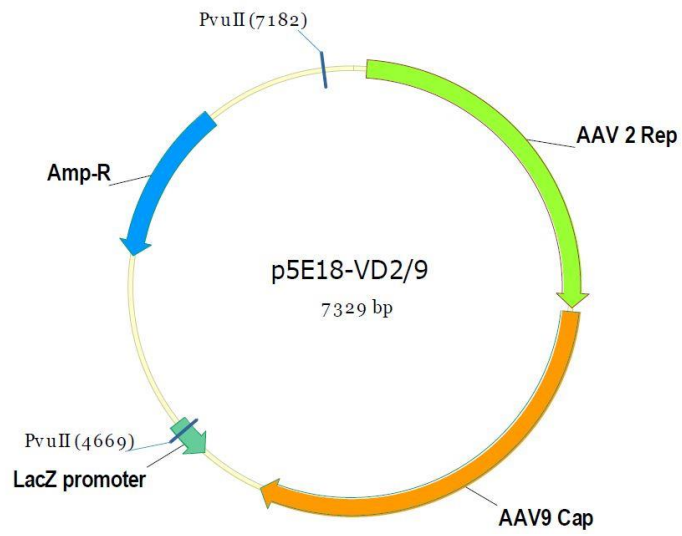
pAAV-MCS (Agilent Technologies)



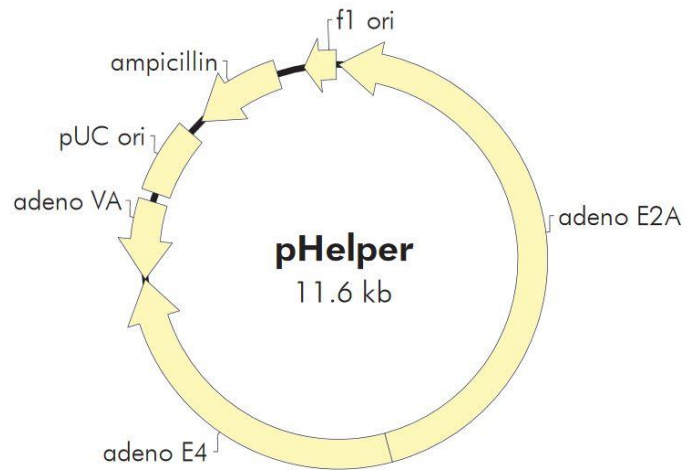
pAAV-NP_{pdm09} (Sipo u. a., 2011 (179))



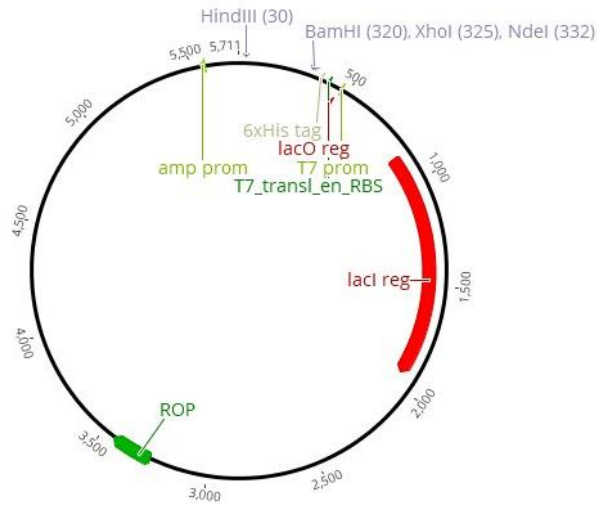
p5E18-VD2/9 (Sipo u. a., 2011 (179))



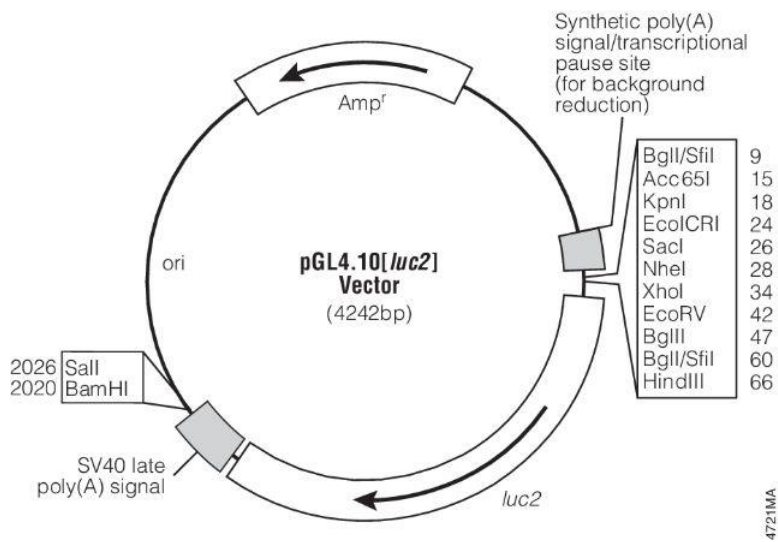
pHelper (Agilent Technologies)



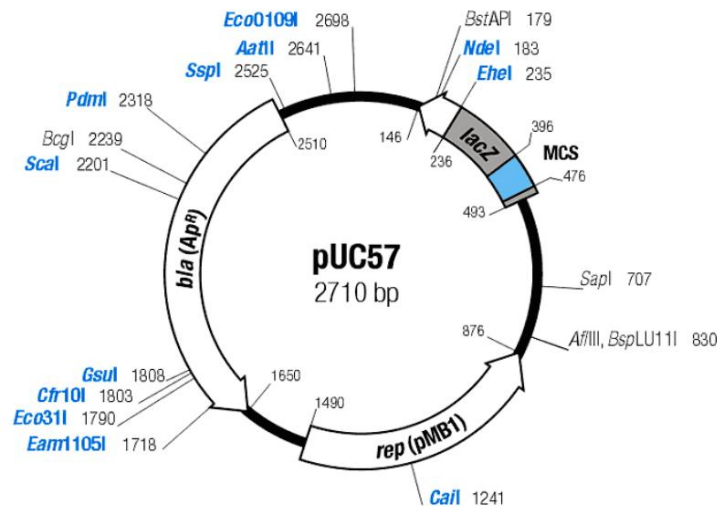
pET16b (Novagen)



pGL4.10-luc2 (Promega)



pUC57 (GenScript)



ABKÜRZUNGEN

5' / 3'	5-Strang / 3-Strang
6 x His	6 x Histidin
A	Sauer; engl. <i>acidic</i>
A, T, G, C	Adenin, Thymin, Guanin, Cytosin
A/California/7/2009	Influenza A, isoliert in Kalifornien, Isolat 7, im Jahr 2009
AAV	Adenovirus-assoziiertes Virus
AAV9	Adenovirus-assoziiertes Virus, Serotyp 9
ACK	Ammonium-Chlorid-Kalium
ADCC	Antikörperabhängigen zellvermittelten Toxizität; engl. <i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i>
AID	Autoimmun Diagnostika
AK	Antikörper
ALP, AP	Alkalische Phosphatase
AS03	Adjuvant System 03
B	Basisch
<i>Bam</i> H1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H1
BD	Becton Dickinson
BGH	Rinder-Somatotropin; engl. <i>bovine growth hormone</i>
bid	Bidestilliert

BI/6, B6N	Black 6
BrK.219	B-Zelllinie, infiziert mit rekombinantem Kaposi-Sarkom-Herpesvirus
BSA	Bovines Serumalbumin
<i>cap</i>	Kapsid; engl. <i>capsid</i>
CD	Unterscheidungsgruppen, engl. <i>Cluster of Differentiation</i>
CFSE	Engl. <i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i> , Derivat des 6-Carboxyfluorescein
ChAd	Adenovirus des Schimpansen; engl. <i>chimpanzee adenovirus</i>
cLSM	konfokalen Laserscanningmikroskop; engl. <i>confocal laser scanning microscope</i>
CMV	Cytomegalievirus
co	codon-optimiert
COP	Mit Schutzwirkung korrelierende Parameter; engl. <i>correlates of protection</i>
CRM1	Exportprotein; engl. <i>chromosomal maintenance 1</i>
DARPinS	Engl. <i>Designed Ankyrin Repeat Proteins</i>
DLIT	Engl. <i>diffuse light imaging tomography</i>
DMEM	Engl. <i>dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure; engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DRP	DNase-resistente Partikel
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
EGFR	Engl. <i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	Antikörperbasiertes Nachweisverfahren; engl. <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ELISpot	Antikörperbasierter Nachweis sezernierter Zytokine; engl. <i>enzyme linked immuno spot assay</i>
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur; engl. <i>European Medicines Agency</i>

ANHANG - ABKÜRZUNGEN

EU	Europäische Union
FACS	hier: Durchflusszytometrie; engl. <i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FAM	6-Carboxyfluorescein
FELASA	Engl. <i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
FGFR1	Engl. <i>fibroblast growth factor receptor 1</i>
FITC	Engl. <i>fluorescein isothiocyanate</i> , Derivat des <i>Fluorescein</i>
FKS	Fötale Kälberserum
for	In Leserichtung; engl. <i>forward</i>
FSC-H	Entgegen der Leserichtung; engl. <i>reverse</i>
G	Gauge
GAP	engl. <i>Global Action Plan for Influenza Vaccines</i>
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde, <i>Society for Animal Science</i>
H + L	Schwere und leichte Kette; engl. <i>heavy and light chain</i>
H&E	Hämatoxylin-Eosin
H1N1	Influenza mit HA-Serotyp 1 und NA-Serotyp 1, anwendbar auf alle Subtypen
H275Y	Substitution der Aminosäure Histidin an Position 275 durch Tyrosin
H2-Db	MHC-Klasse-I-Haplotyp der Maus
HA	<i>Hämagglutinin</i>
HA	Hämagglutinin
HEK	Humane embryonale Nierenzellen; engl. <i>human embryonic kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Her2	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor; engl. <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HGFR	Engl. <i>hepatocyte growth factor receptor</i>
HI	Hämagglutinationshemmtest; engl. <i>heamagglutinin inhibition</i>

HIER	Hitze-induzierte Wiederherstellung von Epitopen; engl. <i>heat induced epitope retrieval</i>
<i>Hind</i> III	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus; engl. <i>human immunodeficiency virus</i>
HLA	Humanes Leukozytenantigen; engl. <i>human leukocyte antigen</i>
HRP	Meerrettichperoxidase; engl. <i>horseradish peroxidase</i>
i.m.	Intamuskulär
i.n.	Intranasal
i.v.	Intravenös
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunoglobulin
IHC	Immunohistochemie
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ITR	Invertierte, terminale, repetitive Sequenzen; engl. <i>inverted terminal repeats</i>
LamR	Laminin-Rezeptor
LB	Engl. <i>lysogeny broth</i>
LCA	Lebersche kongenitale Amaurose
LPLD	Lipoproteinlipasedefizienz
LPLD	Lipoproteinlipasedefizienz
Luci	Luciferase
M	Molzahl
M-001	Multimeric-001
M1, M2	Matrixprotein 1, Matrixprotein 2
mAb	Monoklonaler Antikörper
MCS	Polylinker; engl. <i>multiple cloning site</i>
MDCK	engl. <i>Madin-Darby canine kidney</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex; engl. <i>major histocompatibility complex</i>
MLD ₅₀	Maus letale Dosis 50

ANHANG - ABKÜRZUNGEN

MPI	Monate post Boost-Immunisierung
mRNA	Boten-RNA; engl. <i>messenger RNA</i>
MVA	engl. <i>modified vaccinia virus Ankara virus</i>
MW	Molekulargewicht
N_A	Avogadro-Konstante
NA	Neuraminidase
<i>NdeI</i>	<i>Neisseria denitrificans</i> I
NIBSC	Engl. <i>National Institute for Biological Standards and Control</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NP	Nukleoprotein
NP	Nukleoprotein
NS	nicht-strukturell; engl. <i>non-structural</i>
OPD	Phenylendiamine
<i>p</i>	Signifikanzwert, <i>p</i> -Wert,
pA	Poly(A)-Schwanz
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung; engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PBS-MK	PBS mit KCl und MgCl ₂
PBST	PBS mit Tween-20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion; engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PDGFR	Engl. <i>beta-type platelet-derived growth factor receptor</i>
pdm09	pandemisch, 2009 (Influenza-Subtyp)
PEG	Polyethylenglycol
<i>Pfu</i>	<i>Pfu</i> -Polymerase; <i>Pyrococcus furiosus</i>
PM	PBS mit Milchpulver
PMT	PBS mit Milchpulver und Tween-20
post	nach
PR8	Puerto Rico 8 (Influenza-Subtyp)
Prä	davor
QIV	Quadrivalenter Influenza-Impfstoff; engl. <i>quadrivalent influenza vaccine</i>
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR, engl. <i>quantitative real time PCR</i>
rAd	Rekombinantes Adenovirus

rcf	Relative Zentrifugalkraft; engl. <i>relative centrifugal force</i>
rep	Replikation
rHA	Rekombinantes HA
RNA	Ribonukleinsäure; engl. <i>ribonucleic acid</i>
RNAi	Interferierende RNA
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute; engl. <i>revolutions per minute</i>
RPMI	Engl. <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
SCID	Schwerer kombinierter Immundefekt; engl. <i>severe combined immunodeficiency</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
<i>Sma</i> I	<i>Serratia marcescens</i> I
SSC-H	Seitwärtsstreulicht; engl. <i>side catter height</i>
STIKO	Ständige Impfkommision
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCID ₅₀	Zellkultur infektiöse Dosis 50; engl. <i>tissue culture infection dose</i> 50
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Th1	Typ1-T-Helferzellen
TIV	Trivalenter Influenza-Impfstoff; engl. <i>trivalent influenza vaccine</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UNISEC	Engl. Universal Influenza Vaccines Secured
USA	Vereinigte Staaten von Amerika; engl. <i>United States of America</i>
UZ	Ultrazentrifugation
V371M	Substitution der Aminosäure Valin an Position 371 durch Methionin
VLP	Virusartige Partikel; engl. <i>virus like particles</i>
VP	Virales Protein

w/v	Gewicht pro Volumen; engl. <i>weight per volume</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation; engl. <i>World Health Organization</i>
WIV	Ganzes, inaktiviertes Virus; engl. <i>whole inactivated virus</i>

UNTERNEHMENSVERZEICHNIS

Unternehmen	Sitz
AbD Serotec	Jetzt Bio-Rad, Sitz Puchheim
Adobe Systems	San José, Kalifornien, USA
Affimetrix	Santa Clara, Kalifornien, USA
Agfa – Gevaert	Mortsel, Belgien
Agilent Technologies	Santa Clara, Kalifornien, USA
AID	Straßberg, Deutschland
AppliChem	Darmstadt, Deutschland
BD Biosciences	Erembodegem, Belgien
Beckmann Coulter	Brea, Kalifornien, USA
Biochrom	Berlin, Deutschland
BiondVax	Ness Ziona, Israel
Bio-Rad Laboratories	Hercules, Kalifornien, USA
Biozym Scientific	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Cell Biolabs	San Diego, Kalifornien, USA
Charles River Laboratories	Wilmington, Massachusetts, USA
eBioscience	San Diego, Kalifornien, USA
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
GenScript	Piscataway, New Jersey, USA
HLC	Bovenden, Deutschland
Integra	Berlin, Deutschland
Invitrogen	Carlsbad, Kalifornien, Deutschland
Labotect Labor-Technik	Rosdorf, Deutschland
LI-COR Biosciences	Lincoln, Nebraska, USA
MabTech	Nacka Strand, Schweden

Merck Millipore	Billerica, Massachusetts, USA
Miltenyi Biotech	Bergisch Gladbach, Deutschland
New England Biolabs	Ipswich, Massachusetts, USA
NIBSC	<i>National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar, Großbritannien</i>
Nikon	Shinagawa, Tokyo, Japan
Novagen	Marke von Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
peptides&elephants	Potsdam, Deutschland
peQLab Biotechnology	Marke von VWR, Erlangen, Deutschland
PerkinElmer	Waltham, Massachusetts, USA
Polyscience	Warrington, Pennsylvania, USA
Promega	Fitchburg, Wisconsin, USA
PromoCell	Heidelberg, Deutschland
QIAGEN	Hilden, Deutschland
Roche Diagnostics	Rotkreuz, Schweiz
Santa Cruz Biotechnologie	Santa Cruz, Californien, USA
Sartorius	Göttingen, Deutschland
Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
SKATRON Instruments	Sterlin, Virginia, USA
Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
TPP Techno Plastic Products	Trasadingen, Schweiz
Tree Star Inc.	Ashland, Oregon, USA,
UNC Vector Core	Chapel Hill, North Carolina, USA
UniQure	Amsterdam, Niederlande
Vector BioLabs	Malvern, Pennsylvania, USA
Zeiss (Carl Zeiss)	Oberkochen, Deutschland

EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Die dieser Dissertation zugrunde liegenden Arbeiten wurden am Robert Koch-Institut in Berlin in der Zeit vom 15. Oktober 2013 bis 14. Oktober 2016 durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den

Katharina Fiddeke