

# **Entwicklung und präklinische Testung neuartiger virus-ähnlicher Partikel als Vakzinkandidaten gegen Viren des Respirationstraktes**



## **Dissertation**

**Angefertigt in der Abteilung für  
Molekulare und Medizinische Virologie  
bei Prof. Dr. med. Klaus Überla  
Koreferent: Prof. Dr. med. Albrecht Bufe**

**vorgelegt von Sandra Nitsche  
Bochum im Oktober 2014**

**"Was wir wissen, ist ein Tropfen –  
was wir nicht wissen, ein Ozean!"**

**Isaac Newton**

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>2</b>
2.1 Viren des Respirationstraktes	2
2.1.1 Das humane Respiratorische Syncytialvirus	2
2.1.2 Das humane Influenza Virus	5
2.2 Impfstoffentwicklung gegen Viren des Respirationstraktes	9
2.2.1 Impfstoffentwicklung gegen das Respiratorische Syncytialvirus	11
2.2.2 Impfstoffentwicklung gegen Influenza A	18
2.3 Virus-ähnliche Partikel	20
<b>3. Zielsetzung dieser Dissertation</b>	<b>23</b>
<b>4. Material und Methoden</b>	<b>24</b>
4.1 Materialien	24
4.1.1 Versuchstiere, Zelllinie und Bakterienstamm	24
4.1.1.1 Versuchstiere	24
4.1.1.2 Zelllinie	24
4.1.1.3 Bakterien- und Virenstämme	24
4.1.2 Nukleinsäuren	25
4.1.2.1 Plasmide	25
4.1.2.2 Weitere Nukleinsäuren	26
4.1.3 Peptide	26
4.1.4 Antikörper	26
4.1.5 Enzyme (Restriktionsendonukleasen)	27
4.1.6 Reagenzsysteme	27
4.1.7 Medien, Puffer und Lösungen	27
4.1.7.1 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten	27
4.1.7.2 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Arbeiten	28
4.1.7.2.1 Lösungen für SDS-PAGE und Western Blot	28
4.1.7.2.3 Medien für die Kultur eukaryontischer Zellen	29
4.1.7.2.4 Puffer und Lösungen für die Zellkulturarbeit	29
4.1.7.2.5 Lösungen für Lymphozyten/Splenozyten-Isolation	29
4.1.7.2.6 Lösungen für immunologische Assays	30
4.1.7.2.7 Medien für Bakterienkultur	30
4.1.7.3 Reagenzien	31
4.1.7.4 Geräte	32
4.1.7.5 Verbrauchsmaterialien	34
4.2 Methoden	35
4.2.1 Zytologische Methoden	35
4.2.1.1 Kultivierung von Zelllinien	35
4.2.1.2 Transfektion von Zellen mittels PEI-Reagenz	35
4.2.1.3 Pseudotypisierung lentiviraler Partikel (LV-Partikel)	35
4.2.1.4 VLP Aufreinigung	36
4.2.1.5 Virus Anzucht und Aufreinigung	36
4.2.1.6 Virus Titration	36

4.2.2 Molekularbiologische Methoden	37
4.2.2.1 Plasmid-Präparation mittels Kit	37
4.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von DNA	37
4.2.2.3 Restriktionskontrolle der Plasmid-Präparationen	37
4.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese von DNA	38
4.2.2.5 SDS-Page	38
4.2.2.6 Western-Blot	38
4.2.2.7 ELISA	39
4.2.2.8 Messung des Endotoxingehaltes in den hergestellten Impfstoffen	40
4.2.3 Immunologische Methoden	40
4.2.3.1 Immunisierungen von Mäusen	40
4.2.3.2 Blutentnahme und Serenisolation	41
4.2.3.3 Isolierungen von Splenozyten/Lymphozyten aus der Mäusemilz	41
4.2.3.4 Durchflusszytometrische Analyse (FACS-Analyse)	41
4.2.3.4.1 Modifizierte intrazelluläre Zytokinfärbung	42
4.2.3.5 ELISA zur Antikörperbestimmung aus Mausserum	43
4.2.3.6 Neutralisationstest zur Bestimmung von neutralisierenden Antikörpern im Serum	44
4.2.3.7 Differentialfärbung von zytologischem Material	44
<b>5. Ergebnisse</b>	<b>45</b>
5.1 Produktion und in vitro Analyse der hergestellten Virus-ähnlichen Partikel	45
5.1.1 Charakterisierung der Funktionalität von RSV-F, RSV-G und IVA-HA auf viralen Partikeln	45
5.1.2 Produktion und Analyse der VLPs	52
5.2 Immunogenitätsanalyse in vivo der hergestellten VLP im Maustiermodell	55
5.2.1 Immunisierung von RSV-M basierten VLPs mit RSV-F und RSV-G	56
5.2.2 Charakterisierung der Immunantwort von VLPs im Vergleich zu inaktiviertem RSV	60
5.2.3 Immunisierung von VLPs nach Erstimmunisierung mit rekombinantem RSV-F-Protein	65
5.2.3 Boost-Immunisierung von VLPs nach Erstimmunisierung mit DNA	69
5.2.4 Kombinatorische Immunisierung von VLPs gegen RSV und IVA	76
<b>6. Diskussion</b>	<b>85</b>
6.1 Produktion und in vitro Analyse der hergestellten virus-ähnlichen Partikel	86
6.2 Vakzineentwicklung gegen das Respiratorische Syncytial Virus	89
6.2.1 Herstellung von virus-ähnlichen Partikeln auf Basis von RSV-M	89
6.2.2 VLP Impfung im Mausmodell	91
6.2.3 Vakzinierungsvergleich von formalin-behandelten VLPs und RSV-Viruspartikeln	93
6.2.4 Boost Immunisierung von VLPs nach Erstimpfung mit rekombinantem RSV-F-Protein	95
6.2.5 Immunisierung von VLPs nach DNA-Erstimmunisierung im Maustiermodell	96
6.3 Kombinatorische Vakzineentwicklung gegen RSV und IVA	99
6.4 Ausblick	102
<b>7. Referenzen</b>	<b>104</b>
<b>8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>115</b>
<b>9. Anhang</b>	<b>117</b>
<b>10. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>124</b>
<b>11. Danksagung</b>	<b>125</b>

## 1. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation wurde das Potenzial von neu entwickelten RSV-basierten virus-ähnlichen Partikeln (VLP) als Impfstoff gegen humane virale Pathogene des Respirationstraktes untersucht. Es ist bisher noch nicht gelungen einen sicheren protektiven Impfstoff gegen das Respiratorische Syncytial Virus (RSV) zu etablieren. In dieser Arbeit konnte erstmalig ein auf dem RSV-Matrixprotein basierender VLP-Vakzinekandidat auf seine protektiven und immunogenen Eigenschaften untersucht werden und mit unterschiedlichen Erstimmunisierungen in seiner Immunogenität und Wirksamkeit gesteigert werden.

Die zweimalige RSV-M-VLP-Impfung induzierte keine Anzeichen für einen erschwerten Krankheitsverlauf nach der Belastungsinfektion mit RSV. Die Reduktion der Viruslast war nach der Infektion ca. 10-fach. Aus diesem Grund wurde die Erstimmunisierung in eine *Prime-Boost*-Protein-Impfung mit einer Erstimpfung von rekombinant hergestelltem RSV-F durchgeführt, um eine höhere Immunreaktion durch die VLP- *Boost*-Impfung zu erzielen. Eine deutliche Steigerung der neutralisierenden Antikörper und Reduktion der Viruslast wurde mit Hilfe der RSV-F-Protein + VLP-Immunsierung im Vergleich zur zweimaligen VLP oder zweimaligen rekombinanten F-Protein Applikation erzielt. Die geringe zelluläre Antwort bei diesen Immunisierungen konnte substantiell gesteigert werden, wenn als Erstimmunisierung eine Plasmid-DNA-Elektroporation (EP), welche für das lösliche RSV-F (RSV-F<sub>sol</sub>) kodierte, verwendet wurde. Die Kombination von DNA und VLP führte zur niedrigsten Virusbelastung in der Lunge der Mäuse, welche mit hohen Titern an neutralisierenden Antikörpern und starken zellulären Immunantworten bei den in dieser Arbeit durchgeführten Immunisierungsstudien einhergingen. In der durchgeführten DNA-VLP-Vakzinierung wurden sowohl CD4<sup>+</sup>- als auch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen induziert und aktiviert. Die zellulären Immunantworten konnten lediglich durch eine zweimalige Elektroporation der Mäuse mit Plasmid-DNA weiter gesteigert werden. Die DNA-VLP-Impfung stellt einen vielversprechenden Vakzinkandidaten dar, bei der die EP auf eine Applikation reduziert werden konnte.

Abschließend konnten die RSV-M-VLPs als Plattform für eine kombinatorische Vakzine gegen RSV und Influenzavirus A (IVA) verwendet werden. Es zeigte sich auch hierbei die Vielseitigkeit der RSV-M basierten VLPs mit den Hauptantigenen RSV-F und IVA-HA. Mit den kombinierten DNA-Erstimmunisierungen, welche sowohl Plasmide für RSV-F<sub>sol</sub> als auch IVA-HA beinhalteten, konnte sowohl eine protektive Immunantwort gegen IVA als auch eine starke Immunantwort gegen RSV mit der Zweitimpfung von RSV-VLPs erzielt werden. Somit stellen die hergestellten und charakterisierten RSV-VLPs eine vielversprechende Plattform für kombinatorische Vakzinkandidaten gegen humane Viren des Respirationstraktes dar.

## 2. Einleitung

### 2.1 Viren des Respirationstraktes

Viren, die den Respirationstrakt des Menschen infizieren, führen häufig zu Klinikaufenthalten bei Neugeborenen, Kleinkindern, immunsuprimierten Personen und älteren Menschen. Zu ihnen zählen unter anderem Parainfluenzaviren, Coronaviren und humane Adenoviren [1]. Zwei weitere wichtige Vertreter sind die Influenzaviren und das Respiratorische Syncytialvirus auf die im Folgenden detaillierter eingegangen wird.

#### 2.1.1 Das humane Respiratorische Syncytialvirus

Das humane Respiratorische Syncytialvirus (RSV) tritt verstärkt in den Wintermonaten auf und führt ca. alle zwei Jahre zu einem deutlichen Anstieg an viralen Infektionen des Respirationstraktes. Die grippeähnlichen Krankheitssymptome umfassen Fieber, Husten, Entzündungen der Rachen- und Luftröhrenschleimhäute und Bronchien. Bei fast der Hälfte aller infizierten Säuglinge und Kleinkinder kommt es im Verlauf der Infektion zu einer schweren Bronchiolitis oder einer Lungenentzündung [2]. Die Symptome treten ca. 3-5 Tage nach der Infektion auf. Es sind mehrere Reinfektionen innerhalb einer Saison sowohl mit unterschiedlichen RSV-Stämmen als auch mit identischen Stämmen möglich [3]. Die Symptome einer Reinfektion verlaufen meistens deutlich milder. Die Übertragung erfolgt mittels Tröpfcheninfektion im oberen Respirationstrakt. Weltweit werden schätzungsweise jährlich ca. 64 Mio. Menschen mit RSV infiziert [5]. Besonders schwerwiegende Symptomatiken entwickeln Säuglinge von Frühgeburten und immunosupprimierte Personen [4a-c]. In Deutschland sind ca. 25 % aller Erkrankungen des unteren Respirationstraktes auf eine RSV Infektion zurückzuführen und mit ca. 160.000 Toten stellt RSV eine der schwerwiegendsten Erkrankungen der unteren Atemwege dar, welche insbesondere zum Tod von Säuglingen und Kleinkinder in Entwicklungsländern führt [5].

Das Respiratorische Syncytialvirus (RSV) wird virologisch, als ein Mitglied der Familie der *Paramyxoviridae* eingeordnet. Zu dieser Familie gehören unter anderem auch die Masernviren und die Parainfluenzaviren. RSV wurde erstmals im Jahre 1956 aus einem Schimpansen mit Erkältungssymptomen isoliert und näher charakterisiert als „chimpanzee coryza agent“ (CCA) [6]. Ein Jahr später wurde das identische Virus aus kleinen Kindern isoliert, es bekam den Namen Respiratorisches Syncytialvirus aufgrund seiner Fähigkeit durch Zell-Zellfusion Syncytien zu bilden.

RSV wird in zwei Stämme (A und B) unterschieden [14]. Des Weiteren sind ein bovines und ein ovines RSV bekannt, die ähnliche Krankheitssymptomaten in Kälbern und Schafen auslösen.

RSV ist ein umhülltes RNA-Virus mit einzelsträngigem nicht-segmentiertem Genom in negativer Orientierung. Das RNA-Genom von RSV-A2 besteht aus 15.222 Nukleotiden, welche für 11 virale Proteine kodieren. Die Form von RSV ist überwiegend sphärisch mit einer Größe von ca.150-200 nm. RSV besitzt ein Nukleokapsid, dieses wird aus dem Nukleoprotein (N), dem Phosphatprotein (P), einer RNA-abhängigen Polymerase (L) und der viralen RNA gebildet. Nur die Interaktion von N, P und L zu einem Komplex bewirkt die Transkription des RNA-Genoms, wodurch sie zu einem helicalen Nukleoproteinkomplex aggregieren [7]. Das Matrixprotein (M) befindet sich im Inneren des Viruspartikels und ist mit der Lipid-Doppelschicht der Hüllmembran assoziiert. Es kann mit Proteinen des Nukleocapsides interagieren. Die Hauptaufgabe vom Matrixprotein ist jedoch die Bildung von Viruspartikeln und die Verpackung der viralen genomischen RNA [8]. Nur in geringer Anzahl ist das M2-1 (Matrixprotein 2-1) im Virion zu finden. M2-1 ist mit dem M-Protein verbunden, hilft bei der Interaktion mit dem Ribonukleinkomplex [9] und nimmt regulatorischen Einfluss auf die Transkription und Replikation [10].

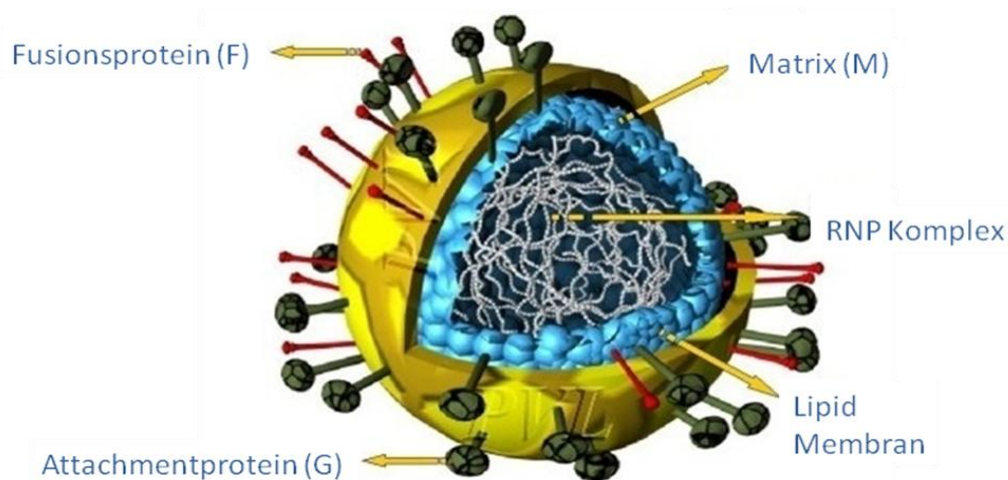
Das Virion besitzt zudem drei Oberflächenproteine. Das Glycoprotein (G) ist ein Transmembranprotein, welches die spezifische Anlagerung („Attachment“) des Viruspartikels an die Wirtszelloberfläche vermittelt. Das G-Protein liegt als Tetramer vor und tritt vermutlich über Glycosaminoglycane und Heperansulfat [11] mit der Zelloberfläche an einen bisher noch nicht identifizierten zellulären Rezeptor in Kontakt.

Das zweite glykosylierte Membranprotein, das Fusionsprotein (F) verfügt über die Fähigkeit zur Fusion der Virusmembran mit der Wirtszelle nach erfolgter Adsorption. Durch die Fusion wird die virale genomische RNA in die Wirtszelle eingeschleust und dadurch wird die Infektion der Zielzellen ermöglicht. Das aktive RSV-F setzt sich aus einem Komplex der Untereinheiten F1 und F2 zusammen, welche durch eine zelluläre Furinprotease proteolytisch aus dem Vorgänger F0 entstehen. RSV-F liegt in der Membran als Trimer vor. Einige Publikationen berichten, dass RSV-F über Nukleolin als zellulären Rezeptor interagiert [12]. In weiterführenden Arbeiten konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Nukleolin nicht als alleiniger Rezeptor zur Fusion zwischen Viruspartikel und Zellmembran ausreichend ist [13]. Bisher ist diese Interaktion nicht abschließend geklärt.

Bei Parainfluenzaviren wird davon ausgegangen, dass das Fusionsprotein über das zweite Hüllprotein G aktiviert wird und dadurch Rezeptor-unabhängig mit der Zielzelle fusionieren kann [122]. Es ist denkbar, dass es bei RSV ähnliche Prozesse gibt.

Das dritte Oberflächenprotein ist das kleine hydrophobe Protein (*small hydrophobic*, SH), welches ebenfalls glykosyliert vorliegt. Die genaue Funktion ist noch nicht voll aufgeklärt.

Es konnte bisher eine Porenbildung in der Membran durch SH nachgewiesen werden und es wurde gezeigt, dass eine Deletion von SH zu einer reduzierten Virusreplikation führt [14]. Es scheint jedoch für die Vermehrung von RSV nicht essentiell zu sein.



**Abbildung 1: Aufbau eines RSV Partikels (Verändert nach [15])**

Auf der Oberfläche befinden sich die Glykoproteine F (Fusionsprotein), G (Attachmentprotein) und das kleine Hydrophobeprotein (SH). Die RNA-Segmente sind mit Nucleoproteinen (NP) komplexiert als RNP Komplex. Der RNP Komplex ist von einer Hüllmembran umgeben, welche an der Innenseite mit dem Matrixprotein M ausgekleidet ist und an der Außenseite eine zelluläre Lipidmembran besitzt [].

Verschiedene RSV-Proteine weisen weiterhin Funktionen zur Reduktion der Immunantwort auf, so auch die beiden verbleibenden Proteine NS1 und NS2 (Nicht-Strukturproteine 1 und 2). Sie verfügen über regulative Eigenschaften auf die RNA Transkription und den Replikationsprozess [16], sind aber vorwiegend für die Umgehung des Immunsystems des Wirtes von entscheidender Bedeutung [17]. NS1 und NS2 inhibieren die Interferon-vermittelte Reaktion der infizierten Zellen [18]. Zudem wirken sie durch die Interferon-Unterdrückung den cytotoxischen T-Zellen des Wirtes entgegen. Eine weitere Funktion durch ein alternatives Startcodon besitzt das G-Protein. Durch das zweite Startcodon wird eine sekretierbare Form des G-Proteins gebildet und kann im Verlauf der Infektion die Antikörper, die gegen das RSV G gerichtet sind abfangen [19].



Ein möglicher Zusammenhang von einer RSV Infektion im Kindesalter und späterem Asthma oder reaktiven Atemwegserkrankungen ist bis heute nicht eindeutig herzustellen [20]. RSV ist eine Ursache von der schweren Infektionen des Respirationstraktes und aktuell ist kein lizenzierter Impfstoff verfügbar. Eindeutig scheint der Zusammenhang zwischen häufigen viralen Infektionen im Kindesalter und im späteren Verlauf der Kindheit die Zunahme von allergischen Asthma zu sein [123]. Da RSV der häufigste Erreger von viralen Atemwegserkrankungen im Kindesalter ist, scheint hier eine Korrelation als möglich.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit (2.2.1) wird auf die aktuelle Forschung im Bereich Impfstoffentwicklung gegen RSV näher eingegangen, da ein sicherer Impfstoffkandidat gegen RSV, wie z.B. eine Vakzine basierend auf virus-ähnlichen Partikeln, als Möglichkeit der Impfung gegen RSV darstellt.

### **2.1.2 Das humane Influenza Virus**

Influenzaviren zeichnen sich seit mehreren hundert Jahren durch regelmäßig auftretende große Grippe Pandemien in der Weltbevölkerung aus. Allein in den letzten ca. 100 Jahren gab es 6 große Pandemien, worunter auch die spanische Grippe als verheerende Pandemie im Jahr 1918/19 fällt, an der weltweit ca. 50 Millionen Menschen durch die Infektion mit Influenza und deren Folgen starben [21]. Eine vor 5 Jahren aufgetretene Pandemie von Influenza (H1N1; „Schweinegrippe“) im Jahre 2009 forderte laut WHO ca. 16.800 Todesopfer [22]. Zusätzlich zu den weltweiten Pandemien ereignen sich auch saisonale Epidemien in den Wintermonaten [23]. Eine Influenza Infektion löst Symptome aus, die als Grippesymptome zusammengefasst werden. Darunter sind hohes Fieber, Hals-, Kopf- und Gliederschmerzen, Husten und allgemeines Unwohlsein. Ein ganz typisches Symptom für eine Influenza ausgelöste Erkrankung ist die plötzlich eintretende Krankheitssymptomatik. Immungeschwächte Personen, Kinder und ältere Menschen können zusätzlich Symptome wie Mittelohrentzündungen entwickeln. Der Übertragungsweg von Influenza Viren erfolgt wie bei den meisten Viren des Respirationstraktes durch eine Tröpfcheninfektion, wobei die Inkubationszeit bis zum Ausbruch der Krankheitssymptomatik zwischen nur einem und fünf Tagen liegen kann [24].

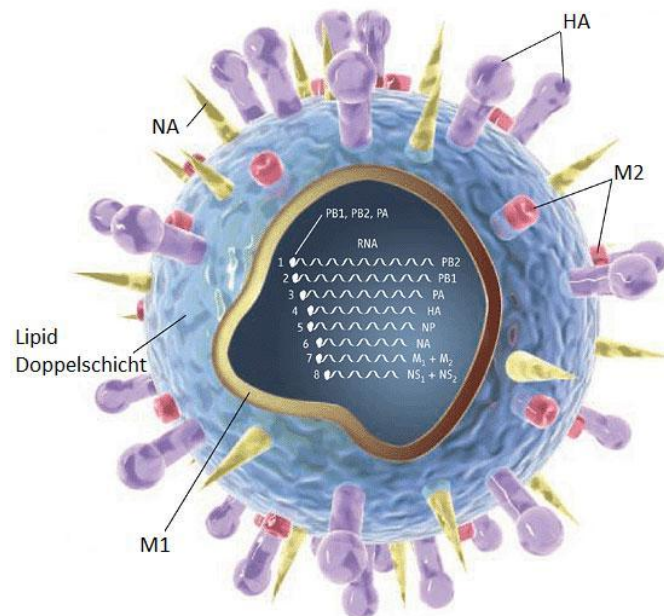
Erstmalig konnten Smith und Laidlaw in den 1930er Jahren das humane Influenza Virus isolieren und in Zellkultur passagieren. Kurz darauf folgte die Etablierung des ersten Tiermodells zur Untersuchung der Viruspathogenität und der damit ausgelösten Erkrankung im Frettchen [25].

Das humane Influenza Virus wird systematisch in die Familie der *Orthomyxoviridae* eingeordnet und ist ein umhülltes RNA Virus mit segmentiertem Genom in Negativstrangorientierung. Die Influenzaviren werden mit Hilfe von verschiedenen molekularen Eigenschaften und der serologischen Charakterisierung verschiedener Proteine in die Typen A, B und C eingeteilt.

Das Genom der Influenzaviren A (IVA) und B verfügt über 8 Segmente und kodiert die Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA), wohingegen das Genom von Influenza C nur aus 7 Segmenten besteht und die Eigenschaften der beiden Oberflächenproteine im Hämagglutinin-Esterase-Fusionsprotein (HEF) vereint. Influenza Viren sind nicht wirtsspezifisch und können Menschen, Pferde, Schweine und auch Vögel infizieren. So sind die weltweit verbreiteten IVA Stämme erstmalig in Wasservögeln aufgetreten [26]. Hier soll nun auf das sehr verbreitete Influenza Virus A näher eingegangen werden.

Die Gestalt von IVA kann von kugelförmig, sphärisch bis filamentös sein, bei einer Größe von ca. 100 nm im Durchmesser und bis zu 300 nm in der Länge. In der Hüllmembran sind die viruskodierten, glycosylierten Oberflächenproteine HA und NA als sogenannte *spikes* eingelagert. HA ist dreimal häufiger auf der Oberfläche vorhanden als NA. Die Oberfläche des IVA ist zusätzlich noch mit dem Matrix Protein 2 (M2) als drittes Oberflächenprotein versehen. Dieses kann nach Ansäuerung Poren auf der Viruspartikeloberfläche ausbilden. Die Innenseite des Viruspartikels ist mit dem Matrix Protein 1 (M1) ausgefüllt. M1 umschließt somit den Ribonukleoprotein-Komplex (RNP Komplex), welcher aus 8 RNA Segmenten besteht und durch das Nukleoprotein (NP) stabilisiert wird. Des Weiteren wird ein teils saurer (PA), teils basischer (PB1, PB2) Polymerasekomplex gebildet. Die 8 RNA Segmente kodieren für jeweils ein oder zwei virale Proteine, somit insgesamt für 11 bzw. 12 Proteine und umfassen 13.600 Nukleotide Gesamtgröße [27].

Das Glykoprotein Hemagglutinin (HA) nimmt eine entscheidende Rolle bei der Bindung des Viruspartikels an die Wirtszellmembran ein. HA kann an Sialsäuren (N-Acetylneuraminsäuren) binden. Diese befinden sich häufig an den Enden von Glykoproteinkonjugaten auf der Zelloberfläche.



**Abbildung 2: Aufbau eines Influenza A Virus Partikels [Abbildung nach 28]**

Auf der Oberfläche befinden sich die Glykoproteine Hemagglutinin (HA), Neuraminidase (NA) und die Ionenkanäle gebildet durch M2. Die 8 RNA-Segmente sind mit Nucleoproteinen (NP) komplexiert. An den 3'-Enden der RNA-Segmente haben sie den trimeren Polymerase-Komplex aus PB1, PB2 und PA gebunden. Die RNPs sind von einer Hüllmembran umgeben, welche an der Innenseite mit dem Matrixprotein M1 ausgekleidet ist [28].

Die verschiedenen Subtypen von HA (H1-H16) binden entweder  $\alpha$ -2,3- oder  $\alpha$ -2,6-verlinkte Sialsäuren und bestimmen somit den Tropismus des Virus, da die Verlinkung der Sialsäuren sich bei verschiedenen Spezies von Warmblütern in den Atemwegen unterscheidet [29]. Hemagglutinin liegt als Trimer auf der viralen Oberfläche vor und wird durch eine Serin-Protease proteolytisch gespalten und somit aktiviert. Durch die proteolytische Spaltung entstehen zwei Komponenten HA1, welches für die Rezeptor-Bindung verantwortlich ist und HA2, welches vermutlich die Fusion mit der Wirtszelle auslöst [30]. Die Neuraminidase (NA) hingegen ist an der Freisetzung neu synthetisierter Viruspartikel beteiligt, was durch die Spaltung endständiger N-Acetyl-Neuraminsäuren von komplexen Kohlenhydraten ermöglicht wird. Gleichzeitig verhindert das NA-Protein eine Virus-Akkumulation auf der bereits infizierten Wirtszelle [31].

Influenza hat wie die meisten Viren auch einige interessante Mechanismen, um der Immunantwort des Wirtes zu entkommen. Das Nichtstrukturprotein 1 (NS1) fungiert während der Replikation als ein Interferon-Antagonist und kann somit die Interferon-Antwort des Wirtes deutlich inhibieren. Das PB1-F2 Protein, ebenfalls ein Nichtstrukturprotein, besitzt zudem die Fähigkeit zur Permeabilisierung von Mitochondrienmembranen, worauf Cytochrom C freigesetzt und die Apoptose der infizierten Zelle ausgelöst wird [32].

Die saisonalen Influenza Epidemien und die regelmäßig auftretenden Pandemien basieren sowohl auf der Mutation, als auch auf der Neukombination der einzelnen RNA-Segmente des RNA-Genoms. Dadurch besitzt das Influenza Virus eine herausragende Fähigkeit sich stark zu verändern. Im Detail kommen Mutationen im RNA Genom zustande, da die RNA-Polymerase von Influenza keine Korrekturfunktion („*proof-reading*“ Funktion) besitzt. Somit kommt es zu zufälligen Mutationen in jedem Replikationszyklus und damit zu veränderten Viren in jedem Jahr. Normalerweise tritt eine Substitution von 1000-8000 Nukleotiden in der RNA auf [33]. Mutationen in den Oberflächenproteinen HA und NA spielen eine weitreichende Rolle, da sich dadurch die antigenen Eigenschaften verändern können. Induzierte spezifische Antikörper gegen HA und NA reduzieren die Virusinfektiosität bis hin zur Neutralisierung der Infektion. Bei strukturverändernden Mutationen im HA und NA müssen daher neue Antikörper im Infizierten generiert werden [34].

Die Unterscheidung der Influenzastämme in verschiedene Subtypen von Influenza basiert auf den Proteinvarianten von HA und NA. Es sind momentan 16 Formen des HA (H1-H16) und 9 Formen von NA (N1-N9) bekannt, die in unterschiedlichen Kombinationen auftreten können. Die Virusstämme werden anhand der verschiedenen Proteinvarianten von HA und NA eingeteilt, so gehörte zum Beispiel die spanische Grippe 1918/1919 zum Stamm H1N1. Im Jahre 1957 wurde H1N1 durch H2N2 abgelöst und anschließend durch H3N2 (1968). Seit 1977 gab es auch wieder H1N1 Pandemien, welche auch gleichzeitig bis heute mit H3N2 auftreten [35]. Durch Punktmutationen im HA und NA können Influenzaviren einen Selektionsvorteil erlangen und es kommt dadurch zu *Immune-Escape*-Varianten des Influenza Virus.

Diese Veränderung durch Punktmutation im Virusgenom von Influenza Viren wird als antigenischer *drift* bezeichnet und führt zu lokalen Grippeepidemien. Pandemien mit weitreichenden Folgen können durch den antigenischen *shift* ausgelöst werden. Dieser bezeichnet die Neukombination von RNA-Segmenten, darunter HA- und NA-Segmenten zwischen Viren des gleichen Typs (Influenza A, B oder C). Zum antigenischen *shift* kann es nur dann kommen, wenn zwei verschiedene Influenza Viren dieselbe Zelle infizieren und die RNA-Segmente im Replikationsprozess vermischt werden [36]. Daraus kann ein neuer Subtyp entstehen. Gegen den neu entstandenen Subtypen besteht keine Immunität und somit kann das neue Virus sich in der Population ausbreiten [37].

Influenzaviren stehen im stetigen Wandel und durchlaufen eine nicht vorhersehbare Veränderung. Die heute zugelassenen trivalenten Impfstoffe von inaktivierten Viren benötigen viel Zeit zur Herstellung, da die neuen Virusstämme zuerst in bebrüteten Hühnereiern vermehrt werden müssen und anschließend in einen Impfstoff mit drei verschiedenen Influenzastämmen zusammengefügt werden [38]. Aus diesen Gründen ist es von entscheidender Bedeutung Impfstoffe zu entwickeln, die schnell an die aktuellen Antigenkombinationen angepasst werden können und eine Kreuzprotektion aufweisen, damit bei einer neuen Epidemie oder Pandemie schnellstmöglich reagiert werden kann. Hierfür stellen virus-ähnliche Partikel und die DNA-Impfung als mögliche Vakzinkandidaten durch die Option, sie schnell anzupassen und kombinatorisch zu verwenden, einen vielversprechenden Ansatz dar. In dieser Arbeit wurden virus-ähnliche Partikel zur Vakzinierung verwendet, welche die Immunantwort des Wirtes nicht durch verschiedene Mechanismen von Influenzaproteinen (NS1, PB1-F2) modulieren können [39].

### **2.2 Impfstoffentwicklung gegen Viren des Respirationstraktes**

Die Impfstoffentwicklung gegen RSV und auch IVA ist in den vergangenen Jahrzehnten in vielerlei Richtungen vorangetrieben worden. Es gibt eine große Bandbreite an Strategien für einen Impfstoff. Im Folgenden wird nur ein Teil der Vakzinekandidaten aufgeführt. Insbesondere wird hierbei auf genetische Vakzine eingegangen.

Der menschliche Körper besitzt bereits bei der Geburt ein funktionales Immunsystem, welches in den ersten Lebenswochen vom angeborenen, unspezifischem Immunsystem bestimmt und mittels Impfungen beeinflusst wird.

Die ersten Abwehrbarrieren sind mechanisch, wie z.B. die Schleimhäute oder die Haut des Menschen und chemisch, wie z.B. der niedrige pH im Magen, Fettsäuren oder ähnlichem. Wenn es trotz dieser ersten Barrieren zu einem Eindringen des Pathogens kommt und eine Infektion ausgelöst wird, so greift zunächst die angeborene Immunabwehr. Die angeborene Immunreaktion hat jedoch den Nachteil, dass sie pathogenunspezifisch und somit relativ ineffektiv fungiert. Sie kann allerdings eine Ausbreitung meistens verhindern. Hierzu wird der vorhandene zelluläre Abwehrmechanismus mit phagozytierenden Zellen aktiviert, diese Zellen erkennen allgemeine Merkmale der Pathogene (PAMPs, *pathogen associated molecular patterns*) [40]. Von großer Bedeutung sind für die Erkennung von Fremdanitigenen von Pathogenen antigenpräsentierende Zellen (APC, wie dendritische Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten), da sie die infizierten Zellen phagozytieren und mittels saurer Hydrolyse eliminieren können [42].

Die verdauten Peptide werden dann mittels MHC I und II-Molekülen (*major histocompatibility complex*) auf APCs präsentiert und können dadurch die adaptive Immunantwort aktivieren. Phagozyten wie z.B. Makrophagen sind langlebige Immunzellen und können Zytokine und weitere Botenstoffe freisetzen. Die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) setzen lytische Granula frei, wodurch virusinfizierte Zellen ebenfalls lysiert werden. NK-Zellen erkennen Zellen, welche keine, fremde oder untypische MHC-I-Moleküle auf der Oberfläche tragen [43]. Die angeborene Immunantwort kann jedoch eine schwere RSV oder IVA Infektion nicht vollständig kontrollieren, somit ist es notwendig, das erworbene Immunsystem mittels Impfung zu modulieren und virus-spezifische Abwehrmechanismen zu induzieren.

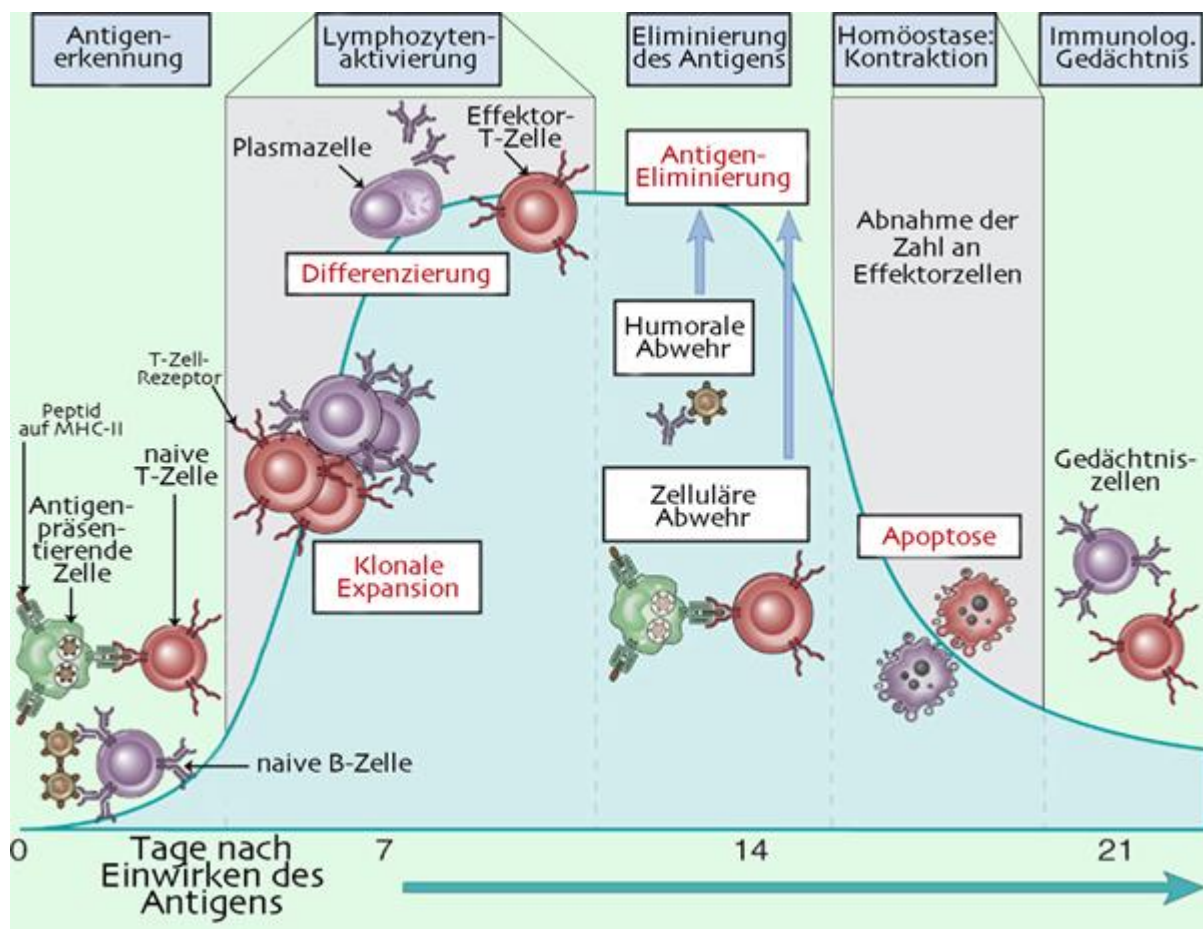


Abbildung 3: Phasen der adaptiven Immunantwort auf das Einwirken eines unbekanntes Antigenes [Nach: 41]

### 2.2.1 Impfstoffentwicklung gegen das Respiratorische Syncytialvirus

Bei dem respiratorischen Syncytial Virus gestaltet sich die Impfstoffentwicklung besonders schwierig, denn auch nach über 50 Jahren Forschungsarbeit ist kein lizenzierter Impfstoff verfügbar. In der ersten durchgeführten klinischen Studie 1967 wurden Formalin-inaktivierte Viren (FI-RSV) mit Aluminiumhydroxid als Adjuvants für die Impfung in RSV naiven Kindern verwendet [44]. Die Impfung vermittelte jedoch keinen Schutz vor einer folgenden natürlichen RSV Infektion, sondern sie verschlimmerte deutlich den Infektionsverlauf, so dass ca. 70 % der mit FI-RSV immunisierten Kinder im Vergleich zu der Placebogruppe im Krankenhaus stationär behandelt werden mussten.

Zwei der Studienteilnehmer verstarben an den Folgen des verstärkten Infektionsverlaufs von RSV nach der Impfung mit Formalin-inaktivierten Viruspartikeln. Spätere Studien zeigten, dass sowohl eine besonders starke  $T_H2$ -Antwort (deutlicher Überschuss an IgG1 und  $T_H2$  Zytokinen), als auch kaum neutralisierende und gering affine/avide Antikörper induziert wurden. Es konnte zudem gezeigt werden, dass nach Impfung mit weiteren Stimulationen über *toll-like* Rezeptoren (TLR 4) eine deutlich protektivere Immunantwort ausgelöst werden kann [45], wodurch die Impfung einen deutlich protektiveren Schutz hätte vermitteln können. Des Weiteren wurde gezeigt, dass dieser erschwerte Krankheitsverlauf nicht auftritt, wenn eine RSV Infektion bereits vorher durchlebt wurde [46]. Ein weiterer Effekt auf die Modulation der Immunantwort wurde in den zellulären Bestandteilen der verwendeten Vakzine nachgewiesen [47].

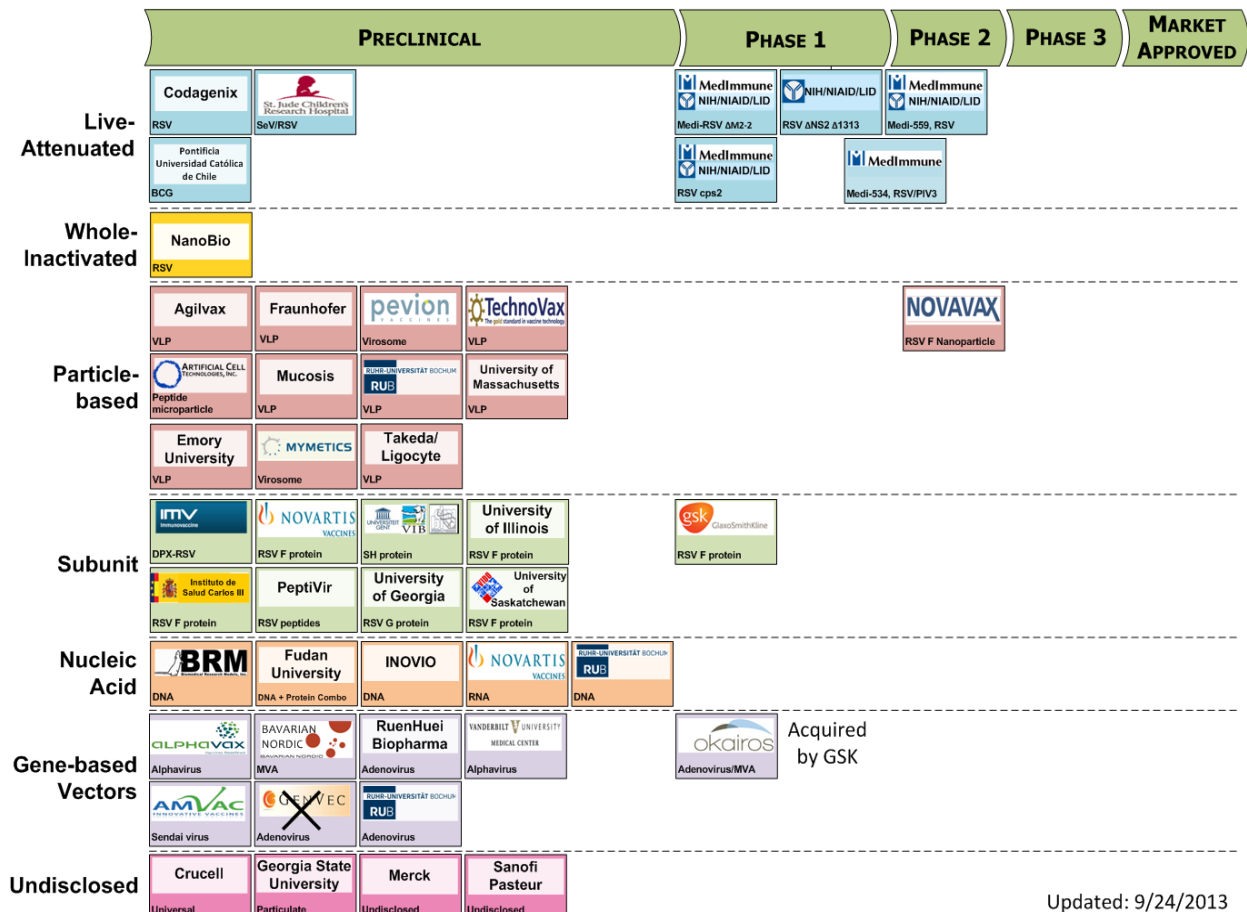
Die T-Helferzellen spielen bei der FI-RSV Vakzine eine entscheidende Rolle und sie werden in unterschiedliche Subtypen unterteilt [48], unter anderem in  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen, die sich in ihrer Funktion stark unterscheiden.  $T_H1$ -Zellen sind entscheidend bei der Aktivierung von cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL, zelluläre Immunantwort), wohin gegen  $T_H2$ -Zellen für die B-Zellaktivierung und der damit verstärkten Produktion von Antikörpern (humorale Immunantwort) von Bedeutung sind.

Des Weiteren werden weitere Subtypen unterschieden, wie z.B.  $T_H17$ - Zellen oder regulatorische  $CD4^+$ -T-Lymphozyten ( $CD4$ , *cluster of differentiation* 4) [49]. Entscheidend für die Ausdifferenzierung der T-Lymphozyten in die verschiedenen Subtypen ist das herrschende Zytokinmilieu im lymphatischen Gewebe und der Milz. Bei viralen Infektionen wird hauptsächlich eine  $T_H1$ -Antwort induziert, um eine starke zelluläre Immunreaktion zu erhalten.  $T_H2$ -Zellen produzieren Interleukine wie IL-4, IL-5 und IL-13 und lösen dadurch hauptsächlich allergische und antiparasitäre Immunantworten aus [50].

$T_H17$ -Zellen sind wichtig bei der T-Zell-vermittelten Immunantwort gegen extrazelluläre Pathogene und sind vermutlich bei Autoimmunerkrankungen, wie z.B. bei der Multiplen Sklerose involviert. Sie sekretieren hauptsächlich das Interleukin 17. Die Rolle von  $T_H17$ -Zellen bei Virusinfektionen ist bisher nicht detailliert verstanden. Bei der Autoimmunität lösen sie schädliche Entzündungen aus und tragen nach ersten Erkenntnissen bei der Antwort auf Virusinfektionen zur Immunpathologie bei [51]. Für RSV ist bekannt, dass  $T_H17$ - Zellen einen Einfluss auf die Schwere der RSV-Erkrankung nach der Infektion haben [52]. IL-17 Interleukine wirken pro-inflammatorisch. In Mäusen ist gezeigt worden, dass die Neutralisation von IL-17A, einem Mitglied der IL-17-Zytokinfamilie, zu einer signifikanten Reduktion der Schleimbildung aufgrund einer akuten RSV führt [53]. IL-17 Interleukine können einen entscheidenden Einfluss auf den Infektionsverlauf von RSV nehmen. Kürzlich wurden  $CD4^+$ -T-Zellen beschrieben, welche ein cytotoxisches Potenzial besitzen und mittels cytotoxischer Mechanismen zur Apoptose von virusinfizierten Zellen führen [54]. Die hier erläuterten  $T_H17$ - Zellen und weiteren T-Zellen spielen bei der Protektion gegen eine RSV-Infektion eine wichtige Rolle.

Die direkte Zielgruppe für einen RSV-Impfstoff sind Säuglinge, Kleinkinder und immunsupprimierte Personen. Dies bedeutet, dass ein potenzieller Impfstoff absolut sicher sein muss und es zu keinem erschwerten Krankheitsverlauf wie mit FI-RSV kommen darf. Säuglinge in den ersten Lebensmonaten besitzen maternale RSV-spezifische Antikörper, die für einen Impferfolg gegen RSV von Bedeutung sind. Eine Alternative wäre die Impfung von schwangeren Frauen, um maternalen Antikörpern auf den Säugling zu übertragen. Allerdings gibt es eine Vielzahl an Risiken, die durch die Impfung induzierten Antikörper und die damit möglichen Nebenwirkungen lassen sich für das ungeborene Kind nur schwer abschätzen. Der Säugling kann gering affine Antikörper erhalten und könnte somit einen erschwerten Verlauf nach der natürlichen Infektion mit RSV erleiden. Ein ähnlicher Verlauf ist nach Infektion von unterschiedlichen Stämmen durch das Denguefiebertivirus bekannt [55]. Die Mütter besitzen meistens eine Präinfektion mit RSV, somit ist der Impfeffekt möglicherweise reduziert, um vermehrt Antikörper auf das ungeborene Kind zu übertragen.





**Abbildung 4: Übersicht RSV Vakzinkandidaten [56]**

Die Abbildung 4 zeigt eine Übersichtsdarstellung der aktuellen Vakzinekandidaten, die als RSV Impfstoff in den unterschiedlichen klinischen Phasen untersucht werden. Die Abbildung zeigt den Stand vom September 2013 und wurde von PATH zusammengestellt [56]. Hier sind auch die in dieser Arbeit untersuchten VLPs im Bereich Partikel-basierte Vakzine in der präklinischen Entwicklungsstufe aufgeführt.

In der präklinischen Phase sind einige Vakzinekandidaten vertreten, die sowohl auf lebend-attenuierte Viren fokussieren, als auch auf genetische Vakzine (siehe Abbildung 4). Die Problematik bei den lebend-attenuierten Viren als Impfstoffkandidat ist der Grad der Attenuierung. Lebend-attenuierte Impfstoffe sind für viele virale Erkrankungen (wie z.B.: Masern-Mumps-Röteln oder Varizella-Zoster) zugelassen und wirken protektiv [57]. Da als Vakzine gegen RSV sowohl Säuglinge als auch erwachsene Menschen geimpft werden sollen, ist eine passende Attenuierung der Viren schwierig. Die Attenuierung des Virus muss eine genügende Immunogenität gegen eine Infektion bieten und gleichzeitig keine oder kaum Krankheitssymptomatiken auslösen.

Zu stark attenuierte Viren lösen eine zu schwache Immunantwort aus und stellen keinen Schutz vor der Infektion dar. Ist die Immunreaktion auf die attenuierten Viren zu gering, kann kein protektiver Schutz vor einer natürlichen RSV Infektion gewährleistet werden.

Das Sicherheitsrisiko ist bei attenuierten Viren relativ hoch, da sie im Menschen replizieren, obgleich sie eine gute Protektivität erzielen können [58]. Die Hauptzielgruppe von Säuglingen verfügt nach der Geburt für einen Zeitraum von 6-9 Monaten über maternale Antikörper gegen verschiedene Viren, so auch gegen RSV und Influenza A. Die maternalen Antikörper verhindern, dass die zur Impfung eingesetzten lebend-attenuierten Viren eine genügend starke Immunantwort auslösen können, um vor einer viralen Infektion zu schützen. Studien belegen, dass eine gute Protektion für IVA mit lebend-attenuierten Viren in einem Alter von mindestens 6 Monaten bei den Kindern induziert wird [59]. In weiteren Verlauf wird die Immunantwort auf die lebend-attenuierten Viren durch die bereits bestehende Immunität durch Impfung oder natürliche Infektion weiter reduziert [60]. Somit stellen lebend-attenuierte Viren für eine große Gruppe an Personen keinen geeigneten Impfstoff gegen RSV oder IVA dar.

Des Weiteren werden mit zunehmender Anzahl genetische Vakzine getestet. Genetische Vakzinierungen wie z.B. adenovirale Vektoren, welche das RSV-F Protein exprimieren, zeigten in verschiedenen Tiermodellen u.a. Maus [61] und Rhesusaffe [62] eine gute Immunogenität mit langanhaltenden hohen neutralisierenden Antikörpertitern, die eine nachfolgende RSV Infektion innerhalb kürzester Zeit bekämpfen oder sogar verhindern konnten. Adenovirale Vektoren wurden bereits bei zahlreichen Infektionen als Gentransfervektor eingesetzt, um Antigene in körpereigenen Zellen zu exprimieren. Hierbei wurde für Immunisierungen und Gentherapie der humane Serotyp Ad5 am häufigsten verwendet [63]. Dieser Virussubtyp kommt häufig vor und somit besitzen viele Menschen bereits eine Immunität gegen diesen Subtyp. Die bestehende Immunität verringert in vielen Fällen den gewünschten Impferfolg, aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren seltenere Virustypen wie Ad11 oder Ad35 als Impfvektoren verwendet [64].

Weitere genetische Vakzinierungsstrategien wie das  $\alpha$ -Replikonsystem [65] oder die Impfung mit RNA [66] werden ebenfalls untersucht.

In dieser Arbeit wurde unter anderem die Plasmid-DNA Vakzinierung näher untersucht, hierzu konnte bereits in Mäusen ein Impfschutz gegen eine Belastungsinfektion mit RSV gezeigt werden [67, 69], dieses wurde ebenfalls für Influenza A untersucht [68]. Die verwendete kodon-optimierte Plasmid-DNA kodiert für das Fusionsprotein. Durch die Kodonoptimierung konnte die Expression des stark konservierten RSV-F-Proteins deutlich gesteigert und somit ein Impfschutz nach zweimaliger Verabreichung mittels Elektroporation vermittelt werden [67, 69]. Bei einer Elektroporation wird der Impfstoff in den Muskel appliziert und anschließend die Aufnahme der DNA-Vakzine durch einen mittels Elektroden im Muskel ausgelösten elektrischen Impulses in die umgebenden Zellen verstärkt.

Die DNA wird in den Muskelzellen aufgenommen und das Protein, welches von der DNA kodiert ist, wird produziert. Das produzierte Antigen wird als Fremdanigen erkannt und löst somit eine langanhaltende Stimulation des Immunsystems aus.

Kürzlich konnte zudem gezeigt werden, dass eine Kombinationsimmunisierung mit Plasmid-DNA kodierend für RSV-F und IVA-HA zu einem Schutz vor einer Belastungsinfektion mit Influenza A und RSV führte. Es wurden sowohl neutralisierende Antikörper als auch eine virusspezifische cytotoxische zelluläre Immunantwort ( $CD8^+$ ) induziert [70]. Eine Kombinationsvakzine würde die notwendigen Impfungen für den Patienten minimieren und könnte somit zu einer Steigerung der generellen Impftrate beitragen. Kombinationsvakzine, die auf Fusionen der konservierten Region von RSV-G und der fusionskompetenten Untereinheit von IVA-HA bestehen, erreichten im Mausmodell eine signifikante Reduktion der Virusbelastung. Sie wurden jedoch mit Adjuvanzen verabreicht und bergen somit Risiken [71]. Risiken durch die Verwendung von Adjuvanzen in Impfstoffen sind unter anderem starke Entzündungsreaktionen an der Einstichstelle und eine unverhältnismäßig hohe Immunreaktion auf die Impfantigene. Ein weiteres Konjugat des RSV-F und des IVA-HA konnte ebenfalls neutralisierende Antikörper, sowohl gegen RSV als auch IVA im Maustiermodell induzieren. Die Viruslast gegen beide Viren konnte in einer folgenden Belastungsinfektion deutlich gesenkt werden [72]. Somit stellen Kombinationsvakzine einen vielversprechenden Ansatz gegen weitverbreitete Viren des Respirationstraktes wie RSV und IVA dar. Die etablierten Kombinationsvakzine Hepatitis B- und Hepatitis A-Virus oder auch Masern-Mumps-Röteln zeigen eine hohe Protektivität und können sogar durch die Kombination die einzelnen Immunreaktionen verstärken. Zu einer guten Protektivität vor einer Virusinfektion führen neben Antigen-spezifischen Antikörpern auch cytotoxische  $CD8^+$ -T-Lymphozyten, auf diese wird an dieser Stelle genauer eingegangen.

Virusinfizierte Zellen können von cytotoxischer  $CD8^+$ -T-Lymphozyten (CTL), die virale Peptide über MHC I-Moleküle auf ihrer Oberfläche präsentieren, erkannt und eliminiert werden. Sie besitzen zudem ein antivirales Potenzial, da sie entsprechende Zytokine exprimieren und sekretieren können. Das cytotoxische Potenzial der  $CD8^+$ -T-Zellen kann über zwei voneinander unabhängige Mechanismen vermittelt werden, diese führen beide zur Apoptoseinduktion der Zielzelle. Beim Granula-Exocytose-Weg werden lytische Granula freigesetzt, die Granzyme und Perforine enthalten. Granzyme sind Serinproteasen, unter anderem Granzym B (GzmB), welches am besten charakterisiert ist [73].

Für die Apoptoseinduktion muss GzmB in die Zielzelle gelangen, Perforin kann hierfür kalziumabhängige Membranschäden verursachen und somit das diffundieren von GzmB in die Zielzelle ermöglichen. Es wirkt dort proapoptotisch. Des Weiteren ist eine Fas-vermittelte Apoptose möglich, hierbei wird an den Fas-Rezeptor auf der Zielzelle durch den Fas-Liganden gebunden [74].

Der Fas-Ligand wird auf CD8<sup>+</sup>-T-Zellen exprimiert und somit findet eine Aktivierung von Caspasen statt. Durch die Caspaseaktivierung wird dann in der infizierten Zelle eine Apoptose ausgelöst [75]. Weiterhin exprimieren cytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen IFN- $\gamma$  und in geringeren Mengen auch TNF- $\alpha$  sowie weitere Zytokine. Durch die IFN- $\gamma$  Sekretion wird die Expression von MHC-I erhöht und damit die Antigenpräsentation stimuliert [76]. Weiterhin erhöht IFN- $\gamma$  die Zytokinproduktion durch antigenpräsentierende Zellen, aktiviert Makrophagen oder inhibiert die Replikation eines Pathogens [77]. TNF- $\alpha$  ist ein proinflammatorisches Zytokin, das direkt cytotoxische Effekte ausüben kann. Durch die Bindung dieses Zytokins an den TNF-Rezeptor 1 wird der Zelltod der Zielzelle induziert [78]. Somit stellen cytotoxische T-Zellen einen entscheidenden Beitrag zur Eliminierung einer Virusinfektion dar und sollten für einen effektiven Schutz mittels Immunisierung gegen das Pathogen induziert werden. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen können auch Mäuse für einen kurzen Zeitraum vor einer RSV-Infektion schützen [79]. In Kindern wurde nachgewiesen, dass bei einer schweren RSV Infektion die hohe Anzahl an CD8<sup>+</sup>-T-Zellen mit der schnellen Genesung des Patienten korrelieren und sind für die Viruseliminierung mitverantwortlich. Zudem können sie die Kleinkinder vor einer erneuten Reinfektion schützen [80]. Eine verzögerte Aktivierung von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen kann zu einer übermäßigen Schleimproduktion im Respirationstrakt führen, damit eine Virusinhibition vorangetrieben wird [81]. CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen spielen eine kritische Rolle in der Bekämpfung einer viralen Infektion (u.a. RSV) und sollten für einen protektiven Schutz mittels Immunisierung induziert werden.

In der aktuellen klinischen Erprobung befindet sich eine Proteinvakzine, die auf oligomerisierten RSV-F Partikeln basiert [82], welche sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort induziert. Die Partikel werden mittels einer Expression des RSV-F Proteins in Insektenzellen produziert. Die Nanopartikel bestehen aus mehreren zusammengelagerten RSV-F-Oligomeren und sind in verschiedenen Tiermodellen (Maus, Baumwollratte und weitere Nagetiere) bisher erfolgreich getestet worden. Allerdings wurden auch diese auf RSV-F-Protein basierten Nanopartikel mit einem Aluminium-Adjuvans versetzt verabreicht, was zu einem erhöhten Risiko zur Induktion eines erschwerten Krankheitsverlaufes führen kann.

Die bisher einzige verfügbare prophylaktische Immunisierungsmöglichkeit gegen RSV ist eine passive Impfung mit einem humanisierten, monoklonalem IgG1 Antikörper (Palivizumab, Synagis®) der neutralisierend gegen ein hochkonserviertes Epitop im F-Protein von RSV gerichtet ist [83]. Diese Immunisierung ist nur Hochrisikopatienten, wie kleinen Kindern mit Herz- und Atemwegsdysplasien vorbehalten, da sie sehr kostenintensiv ist. Sie erfordert eine mindestens monatliche Gabe über die gesamte RSV Saison, um einen Schutz vor RSV-Infektionsbedingten schweren Erkrankungen zu vermitteln.

Es wurde gezeigt, dass die prophylaktische Gabe von Palivizumab in 57 % der Fälle eine stationäre Behandlung im Krankenhaus verhindern konnte [84]. Die Kosten und häufigen Gaben von Palivizumab in jeder RSV-Saison stellen für viele Entwicklungsländer keine Option zur Reduktion der RSV Infektionen dar.

Im menschlichen Körper werden pathogenspezifische neutralisierende Antikörper, wie sie hier als humanisierter Antikörper bei der passiven Impfung verabreicht werden durch B-Zellen produziert und stellen einen weiteren entscheidenden Baustein der adaptiven Immunantwort gegen virale Infektionen dar [85].

Denn B-Zellen sind mit T-Zellen zusammen die wichtigsten Zellen des adaptiven Immunsystems. B-Lymphozyten sind die Vermittler der humoralen Immunantwort, da sie Antikörper produzieren und sekretieren können. Die B-Zelle entsteht im Knochenmark ausgehend von einer hämatopoetischen Stammzelle. Die B-Lymphozyten durchlaufen eine Reifung im Knochenmark, bei denen unter anderem der B-Zellrezeptor ausdifferenziert. Der B-Zellrezeptor ist notwendig, damit die reife B-Zelle fremde Antigene erkennen kann und spezifische Antikörper gegen das Fremdantigen produziert. Die unreife B-Zelle trägt einen kompletten B-Zellrezeptor (IgM). Naive (reife, ohne Fremdantigenkontakt) B-Lymphozyten wandern aus dem Knochenmark in den Blutstrom ein und zu den sekundären lymphatischen Geweben (z.B. Lymphknoten). Trifft die naive B-Zelle auf ein Antigen, so sind für deren Aktivierung zwei Signale erforderlich, zum einen der direkte Kontakt mit dem Antigen an den B-Zellrezeptor und zum zweiten ein kostimulatorisches Signal durch eine  $T_H$ -Zelle. Die  $T_H$ -Zelle erkennt das auf der B-Zelle präsentierte Antigen und bindet an den Antigen-MHC-Komplex. Anschließend ist die B-Zelle vollständig aktiviert und wandert in das Keimzentrum in Lymphknoten oder der Milz (Maus). Im Keimzentrum expandiert die aktivierte B-Zelle polyklonal und kann gegen das gebundene Antigen als Plasmazelle Antikörper produzieren und ausschütten. Differenzierte B-Zellen besitzen einen B-Zellrezeptor auf ihrer Oberfläche und können nicht von einem weiteren Antigen erneut aktiviert werden [86].

Des Weiteren gibt es Pathogen spezifische Immunreaktionen die mittels adaptiven Immunsystems ausgeführt werden. Das adaptive Immunsystem ist für eine Gedächtnisfunktion entscheidend und verhindert gleichbleibend starke Reinfektionen. Die differenzierten spezifischen B-Zellen nehmen ebenfalls eine Gedächtnisfunktion ein und schütten bei einer erneuten Infektion mit dem Pathogen direkt spezifische Antikörper aus. Der Zeitraum bis zur effektiven Reaktion des Immunsystems wird aufgrund der spezifischen Gedächtnis-B-Zellen deutlich verringert [87].

Wenn ein Pathogen von APC's erkannt wurde und mittels MHCII auf ihrer Oberfläche die Peptide präsentiert werden, so führt dies zu einer Aktivierung von T-Zellen, welche positiv für das *cluster of differentiation 4* (CD4) sind. Sie eliminieren mit Hilfe von cytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen die virus-infizierte Zelle. Dabei unterscheiden sich die MHC-Moleküle I und II in wichtigen Punkten [88].

Über MHC I werden Peptide aus dem Cytosol, endogene Peptide, mit einer Größe von 8 - 10 Aminosäuren, präsentiert, die im endoplasmatischen Retikulum beladen werden. Exogene Peptide aus Vesikeln werden hingegen über MHC II präsentiert, deren Beladung in den intrazellulären Vesikeln erfolgt. Es befinden sich MHC I-Komplexe auf allen kernhaltigen Zellen des Körpers, während MHC II ausschließlich auf spezialisierten und antigenpräsentierenden Zellen vorkommt [89].

Für einen effektiven Schutz gegen eine virale Infektion ist es sinnvoll, sowohl Antikörper zu induzieren, als auch eine zelluläre, vor allem cytotoxische T-Zellantwort auszulösen. Eine Korrelation zwischen systemischen neutralisierenden Antikörpern und der Protektion gegen RSV ist vielfach gezeigt worden [90].

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit eine weitere vielversprechende Möglichkeit für einen proteinbasierten Impfstoff gegen RSV oder RSV und IVA als Kombinationsvakzine genauer analysiert. Hierbei handelt es sich um virus-ähnliche Partikel, die aufgrund ihrer Eigenschaften einen protektiven humoralen und zellulären Schutz zeigen (siehe 2.3).

### **2.2.2 Impfstoffentwicklung gegen Influenza A**

Für Influenza A gibt es lizenzierte inaktivierte Virus-Impfstoffe, die jährlich von einer Kommission der WHO (*World Health Organisation*) neu festgelegt werden. Sie bestehen immer aus zwei verschiedenen IVA-Stämmen und einem IVB-Stamm. Welche Stämme in den aktuellen Impfstoff kombiniert werden, hängt davon ab, welche Stämme in der Bevölkerung am häufigsten aufgetreten sind.

Gegen Influenza muss jährlich geimpft werden. Eine schnelle Anpassung auf neu auftretende Virusstämme ist möglich, allerdings dauert die Entwicklung und Herstellung mehrere Monate und ist sehr kostenintensiv. Mit Verabreichung dieser mit Formalin- oder Propiolacton inaktivierten Viren kann in der Gruppe der 14 – 60 jährigen geimpften Personen eine Reduktion der Infektionen mit Influenza von ca. 70 % beobachtet werden [91]. Hierbei kommt es auch darauf an, ob komplette Viruspartikel eingesetzt (Proteinimpfstoff) wurden oder die Impfstoffe lediglich aus viralen Untereinheiten (Spaltimpfstoff) bestehen. Die stärkere Immunogenität besitzen komplett-inaktivierte Impfstoffe, denen meist noch ein Adjuvants zugesetzt wird. Für bestimmte Personengruppen kann dies zu schwerwiegenden Nebenwirkungen führen [92]. So ist als Vorsichtsmaßnahme momentan ein trivalenter Impfstoff mit H1N1, N3N2 und einem IVB Stamm als inaktiverter Spaltimpfstoff in den USA erst ab einem Alter von 6 Monaten zugelassen [93].

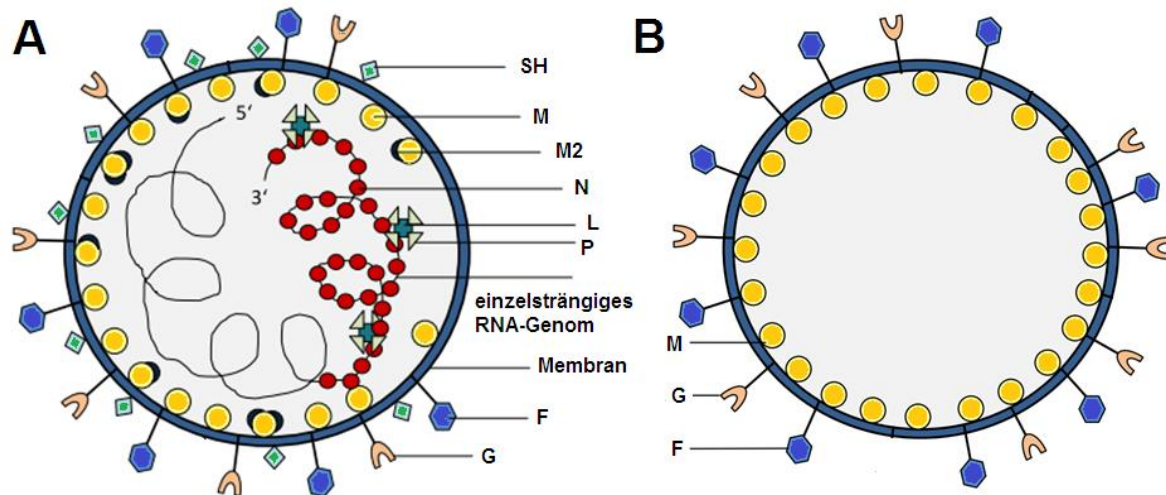
Eine weitere Möglichkeit an potenziellen Influenzavakzinen ist die Impfung mit lebend-attenuierten Viren. Auch hierbei gibt es eine Vielzahl von Verfahren, hitze- oder kälteadaptierte Viren, genetische Modifikationen in den Proteinen M2, PB2 oder NS1 [94] und es kann in der jeweiligen Saison mit Hilfe eines attenuierten Masterstammes die entsprechenden antigenischen Phänotypen von HA bzw. NA eingefügt werden. Die Immunantwort richtet sich somit hauptsächlich gegen HA und NA, welche wenig konserviert zwischen den Influenza-Stämmen vorliegen und somit eine Kreuzprotektion unwahrscheinlich ist [95]. Die Gabe von lebend-attenuierten Influenzaviren kann über eine nasale Gabe verabreicht werden [96].

Genetische Impfstoffe, wie z.B. DNA-Impfungen mit Plasmiden, die für die aktuellen HA und/oder NA Varianten kodieren und in den Zellen des Impflings exprimieren sind besonders günstig und schnell anpassbar. Sie zeigten im Maustiermodell einen protektiven Schutz gegen eine letale Belastungsinfektion [68, 97]. Die Verabreichung einer DNA-Vakzine ist mittels Elektroporation für den Menschen noch in der klinischen Entwicklung.

Eine weitere Alternative sind Proteinimpfstoffe, wozu auch virus-ähnliche Partikel (siehe 2.3) zählen, die die gewünschten Hauptantigene in repetitiver Form auf der Oberfläche eines nicht infektiösen Partikels besitzen und somit ebenfalls leicht angepasst werden können. Dieser Ansatz wurde in dieser Arbeit als Kombinationsvakzine gegen RSV und IVA ebenfalls im Tiermodell auf Immunogenität und Wirksamkeit untersucht.

### 2.3 Virus-ähnliche Partikel

Virus-ähnlichen Partikeln (*virus-like particles*, kurz: VLPs) fällt vermehrtes Interesse der Impfstoffforschung zu, da sie als starkes Immunogen wirken und sowohl eine gute humorale, als auch eine zelluläre Immunantwort auslösen können [98].



**Abbildung 5: Schematische Darstellung eines infektiösen RSV-Viruspartikels und einem RSV-M basierten Virus-ähnlichen Partikel [Verändert nach 99].** A: Modelldarstellung eines RS-Viruspartikel mit den Oberflächenproteinen F, G und SH, sowie den mit dem einzelsträngigen RNA-Genom gebildetem Nucleocapsid aus den Proteinen N,L und P. Der Partikel wird mittels Zellmembran und den Matrixmolekülen M und M2 gebildet. B: RSV-M basierter virus-ähnlicher Partikel hier mit RSV-F und RSV-G auf der Oberfläche. Der VLP enthält kein RNA-Genom und besteht nur aus einer verminderten Anzahl Virusproteinen.

Die in dieser Dissertation hergestellten VLPs (z.B. HIV-VLPs oder RSV-VLPs) bestehen unter anderem aus zellulären Proteinen und Lipiden der äusseren Membran der Produktionszelllinie und den Oberflächen- und Kapsidproteinen von Lentiviren bzw. RSV oder aus Kombinationen von diesen. Sie zeichnen sich durch ihre repetitive Anordnung der Oberflächenproteine auf einem virus-ähnlichen Partikel aus, der in der Größe mit dem entsprechenden Virus vergleichbar ist. VLPs sind in vielen Fällen durchschnittlich ca. 80-140 nm groß und sind somit ähnlich groß, wie IVA und RSV [100].

Die ersten kommerziell verfügbaren VLP-basierten Impfstoffe sind gegen das humane Papillomavirus (HPV) und gegen das Hepatitis B Virus gerichtet. Die HPV-VLPs besitzen nur Kapsidproteine, da HPV ein unbehülltes Virus ist.

Die HPV-VLPs lagern sich spontan zusammen und bestehen aus zwei oder vier unterschiedlichen L1-Proteinen von verschiedenen HPV-Stämmen. Sie unterscheiden sich in ihrer Größe (ca. 50 nm) kaum von den HPV-Partikeln (ca. 60 nm) [101].



VLPs sind Viruspartikel, die nur die viralen Strukturproteine ohne virale Nukleinsäuren enthalten und somit nicht replikationsfähig sind [102]. Ihre repetitive Antigenstruktur vermittelt eine effektive T-Zell- und B-Zell-Antwort [103]. VLPs können dendritische Zellen (DCs) und auch B-Zellen aktivieren und diese spielen eine entscheidende Rolle in der Initiation der Immunantwort im Organismus (s.o.).

Die antigenpräsentierenden Zellen (APCs) können die VLPs aufnehmen und prozessieren. Sie präsentieren anschließend die Peptidbestandteile mittels MHC Klasse II Moleküle auf ihrer Oberfläche und vermitteln kostimulatorische Signale für die Aktivierung des Immunsystems. Somit besitzen VLPs die Fähigkeit, sowohl gute Antikörperantworten zu induzieren, als auch cytotoxische T-Zellen zu aktivieren [104, 105].

Ein weiterer Vorteil der VLPs ist, dass sie nicht durch ihre Größe behindert werden auch folliculäre Regionen in der geimpften Person zu erreichen und somit weiterführende Immunreaktionen auch in den Lymphknoten auslösen können [106].

Im Bereich von VLPs als Vakzine gegen RSV gibt es einen weiteren Ansatz, der auf dem Matrixprotein des Newcastle-Disease-Virus (NDV) basiert [107]. Hierbei wurde jeweils die Ectodomäne des NDV Fusionsproteins und der NDV Hemagglutinin-Neuraminidase gegen die entsprechende Ectodomäne des RSV-F und -G ausgetauscht. Diese Protein-Fusion wurde in NDV Partikel eingelagert und zeigte im Mausmodell neutralisierende Antikörper. Die Antikörpertiter waren langanhaltend und konnten auch ca. 14 Monaten nach Immunisierung die Virusbelastung von RSV in Folge einer Belastungsinfektion deutlich verringern. Im Vergleich hierzu sinkt die Antikörperantwort nach einer RSV-Infektion bereits nach ca. 40 Tagen stark ab [107].

Des Weiteren gibt es aktuelle Vakzinkandidaten in denen das Influenza Matrixprotein (M1) mit dem RSV-F- oder dem RSV-G-Protein auf der Oberfläche der Influenza-M1-Partikel assoziiert wird. Die Immunisierung mit diesen IVA-M1-basierten VLPs induzierte eine protektive Immunreaktion gegen eine Belastungsinfektion mit RSV im Tiermodell [108].

Neue Untersuchungen ergaben, dass Influenza-VLPs im Vergleich zu herkömmlichen Influenza-Vakzinen einen stärkeren und längeren Schutz gegen Influenza-Viren aufweisen [109]. Zudem ist die Produktionszeit mit ca. 4-8 Wochen deutlich kürzer als bei traditionellen Influenza-Vakzinen mit bis zu 9 Monaten.

In frühen klinischen Versuchen scheinen VLPs einen kompletten Schutz gegen das H5N1-Influenza Virus und auch gegen das 1918 aufgetretene spanische Influenza Virus zu bewirken [109]. Weitere VLPs mit Influenza M1, HA und NA konnten ebenfalls eine protektive Antikörper Antwort gegen Influenza im Tiermodell auslösen [110].

VLPs stellen somit eine vielversprechende Vakzine-Plattform gegen eine große Anzahl viraler Erkrankungen dar. Insbesondere bei Viren, die den Respirationstrakt des Menschen infizieren können, zeigte sich eine Protektivität in präklinischen Studien mit VLP-Impfstoffen [106-110].

Zudem können sie durch die Kombination von Oberflächenproteinen von unterschiedlichen Viren als effektive Kombinationsvakzine verwendet werden. Dieser Ansatz wurde im Rahmen dieser Dissertation für VLPs gegen RSV und auch als Kombinationsvakzine gegen RSV und IVA verfolgt.

### **3. Zielsetzung dieser Dissertation**

Bis zum heutigen Tage ist es nicht gelungen einen sicheren und protektiv wirksamen Impfstoff gegen das Respiratorische Syncytial Virus (RSV) zu entwickeln. Eine Vielzahl an potentiellen Kandidaten scheiterte bereits in der präklinischen Testung. Im Rahmen einer klinischen Studie zeigte sich ein verstärkter Infektionsversuch nach der natürlichen Infektion mit RSV für die Vakzinprobanden. Sie hatten eine Formalin-inaktivierte Viruspräparation erhalten und diese klinische Studie verdeutlichte die enorme Wichtigkeit einer sicheren Vakzine gegen RSV.

Diese Dissertation sollte einen Beitrag zur Vakzinforschung gegen das Respiratorische Syncytial Virus leisten und hierbei sollte ein funktionaler Vakzinkandidat etabliert werden, welcher in Form einer virus-ähnlichen Partikelvakzine (VLP-Vakzine; *virus-like particle*) vorliegt. Ein wichtiger Punkt ist die Funktionalität der Oberflächenproteine auf den VLPs und mit Hilfe einer Pseudotypisierung von lentiviralen Partikeln sollte dieses analysiert werden. Da das weiterführende Ziel dieser Dissertation ein VLP-basierter Impfstoffkandidat gegen RSV sein sollte, wurde anschließend das HIV-Gag-Protein durch das RSV-M-Protein ersetzt und diese Partikel ebenfalls auf ihre Immunogenität untersucht. Hierfür sollte eine vergleichende Immunisierung durchgeführt werden, bei der die protektiven Eigenschaften der erstmalig hergestellten RSV-M-VLPs mit den HIV-Gag-VLPs verglichen würde. In dieser VLP-VLP-Impfung sollten weitere Erkenntnisse über die Immunogenität und die Sicherheit der hergestellten VLPs erhalten werden. Im weiteren sollten die hergestellten VLPs mit den analog zu den damals hergestellten Formalin-inaktivierten Viruspartikeln aus der klinischen Studie [44] in einer weiteren Immunisierung im Tiermodell analysiert und die Unterschiede charakterisiert werden, um einen verstärkten Krankheitsverlauf für unwahrscheinlich anzunehmen. Bei einer unzureichenden Immunogenität sollten *Prime-Boost* Immunisierungsschemata mit verschiedenen Erstimpfungen herangezogen werden, um die Immunogenität der VLPs zu erhöhen. Hierfür eignet sich sowohl eine DNA-Applikation als auch eine Impfung mit Proteinen mit Adjuvants.

Für die vielversprechendste Kombination der Impfung als *Prime-Boost* Immunisierung mit *VLP-Boost* sollte zusätzlich eine kombinatorische Vakzine gegen Influenza A und RSV hergestellt und im Infektionsmodell in der Maus näher untersucht werden. Dies sollte die flexiblen Einsatzmöglichkeiten der RSV-M-basierten VLPs unterstreichen.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Versuchstiere, Zelllinie und Bakterienstamm

##### 4.1.1.1 Versuchstiere

Weibliche balb/c Mäuse (6-8 Wochen) von Charles River wurden unter S2 Bedingungen in einzelventiliierten Käfigen gehalten.

##### 4.1.1.2 Zelllinie

HEK 293T Humane Nierenepithelzellen (HEK; *human embryonic kidney*), welche mit Ad5 transformiert wurden und das große T-Antigen (ATCC) des SIV40 exprimieren

HEK 293A Humane Nierenepithelzellen (HEK; *human embryonic kidney*), welche mit Ad5 transformiert wurden

HEp2 Humane Epitheliom Zellen Typ 2 eines Larynxcarzinoms

MDCK-II Hunde Nierenepithel Zellen (*madin darby canine kidney*)

HT1080 Humane Epithelzellen eines Fibrosarkomas

HeLa Humane Epithelzellen eines Cervixkarzinoms

##### 4.1.1.3 Bakterien- und Virenstämme

Der verwendete Bakterienstamm zur Herstellung von Plasmid-DNA ist ein ultrakompetenter Stamm (XL2-Blue) von *Escherichia coli*.

Influenza PR8 Influenza A Virus Isolat aus Puerto Rico (2008) [A/PR/8/34(H1N1)]

Bezogen von Dr. Christina Ehrhardt, Mol.Virol.WWU Münster

rgRSV Rekombinantes RSV, welches GFP exprimiert

Bezogen von M-Peebles USA

RSV-A2 Labor-isolat des Respiratorischen Syncytial Virus, Antigenische Subgruppe A, Stamm A2

Bezogen von Robert-Koch Institut Deutschland

## 4.1.2 Nukleinsäuren

### 4.1.2.1 Plasmide

<i>Hgp<sub>syn</sub></i>	Kodonoptimiertes HIV-1 Gag/Pol-Expressionsplasmid unter CMV-Promoter Kontrolle. Es besitzt das Polyadenylierungssignal des bovinen Wachstumsfaktors BGH, es enthält durch Sequenzoptimierung auf die humane Kodonnutzung keine ursprünglichen viralen nt-Sequenzen mehr, trotz gleicher Aminosäureabfolge [77].
<i>pcDNA M<sub>syn</sub>-His</i>	Codonoptimiertes Plasmid zur Expression des RSV Matrixproteins RSV-M mit His-Tag
<i>pcDNA F<sub>syn</sub></i>	Codonoptimiertes Plasmid zur Expression des RSV Fusionsprotein RSV-F (Glycoprotein)
<i>pcDNA F<sub>syn</sub>Δ1711II</i>	Codonoptimiertes Plasmid zur Expression des am cytoplasmatischen Ende um 4 Aminosäuren deletiertes RSV-F
<i>pcDNA G<sub>syn</sub></i>	Codonoptimiertes Plasmid zur Expression des RSV Attachmentprotein RSV-G (Glycoprotein)
<i>pcDNA G<sub>syn</sub>Δ105</i>	Codonoptimiertes Plasmid zur Expression des am cytoplasmatischen Ende um 34 Aminosäuren deletiertes RSV-G
<i>pVaxHA</i>	Codonoptimiertes Plasmid zur Expression des IVA Glykoproteins Hämagglutinin (HA) mit Olla-Tag
<i>pVaxNA</i>	Codonoptimiertes Plasmid zur Expression des IVA Glykoproteins Neuraminidase (NA)
<i>pVax F<sub>syn</sub>ED</i>	Codonoptimiertes Plasmid zur Expression der Ektodömäne vom RSV Fusionsprotein RSV-F (Glycoprotein)
<i>pVax G<sub>sol</sub></i>	Codonoptimiertes Plasmid zur Expression einer löslichen Form vom RSV Attachmentprotein RSV-G (Glycoprotein)

<i>HIV-CS-CS</i>	Lentiviraler Vektor, basierend auf dem Humanen Immundefizienzvirus (HIV), welcher ein SIN-Vektor (self-inactivating vector) und das grün fluoreszierende Protein kodiert
<i>pcTat</i>	Eukaryotisches Plasmid zur Expression des Tat Proteins von HIV-1
<i>pcRev</i>	Eukaryotisches Plasmid zur Expression des Rev Proteins von HIV-1

### 4.1.2.2 Weitere Nukleinsäuren

DNA Größenstandard (1kB- und 100 bp-Leiter) Invitrogen

### 4.1.3 Peptide

Hämagglutinin MHC II-Epitop 127-137 (SFERFEIFPKE) (A/Puerto Rico/8/34 H1N1)

Das HA-Peptid wurde freundlicherweise von Prof.Dr. Matthias Tenbusch (Virologie, Bochum) zur Verfügung gestellt.

F-Peptide (RSV-A2):

CD4-Peptidpool: B1 (LRTGWYTSVITIELS), B2 (WYTSVITIELSNIKE)

D11 (NGVSVLTSKVLDLKN), D12 (VLTSKVLDLKNYIDK)

CD8-Peptidpool: B9 (KQELDKYKNAVTELQ), B10 (DKYKNAVTELQLLMQ)

F2 (VTTPVSTYMLTNSEL), F3 (VSTYMLTNSELLSLI)

### 4.1.4 Antikörper

HRP-gekoppelter Ratte anti-Maus IgG1	BD Bioscience
HRP-gekoppelter Ratte anti-Maus IgG2a	BD Bioscience
HRP-gekoppelter Kaninchen anti-Maus Ig (Polyklonal)	Dako
HRP-gekoppelter Kaninchen anti-Ziege Ig (Polyklonal)	Dako
HRP-gekoppelter Schwein anti-Kaninchen Ig (Polyklonal)	Dako
HRP-gekoppelter Kaninchen anti-Ovalbumin (Polyklonal)	Dako

## 4.1.4 Antikörper (Fortsetzung)

Kaninchen anti-Maus IgG-h+l

Bethyl

Fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen murine Proteine für die FACS-Analyse von BD oder eBioscience:

$\alpha$ CD4-FITC,  $\alpha$ CD4-APC,  $\alpha$ CD8-PerCP,  $\alpha$ CD8-APC,  $\alpha$ CD107a-FITC,  $\alpha$ IFN $\gamma$ -PE,  $\alpha$ IL2-APC

## 4.1.5 Enzyme (Restriktionsendonukleasen)

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen und entsprechende Puffer wurden von New England Biolabs (NEB) oder von MBI Fermentas bezogen.

## 4.1.6 Reagenzsysteme

Chemiglow<sup>®</sup>

Biozym

Haema-Schnellfärbung

L&T Haema

Limulus Amebocyte Lysate QCL-1000

Lonza

M&N NucleoBond Xtra Maxi EF

Macherey&Nagel

M&N NucleoSpin Plasmid

Macherey&Nagel

QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA-Kit

Qiagen

Quantitect<sup>™</sup> Probe RT-PCR-Kit

Qiagen

## 4.1.7 Medien, Puffer und Lösungen

### 4.1.7.1 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten

PBS

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH 7.4

### Lösungen für DNA-Gelelektrophorese

TAE-Puffer (50x)	2,0 M Tris
	0,05 M Na <sub>2</sub> -EDTA
	1 M Essigsäure

Der Puffer wird in einer 1x Konzentration für die Gelelektrophorese verwendet.

DNA-Ladepuffer (6x)	0,25% (w/v) Bromphenolblau
	0,25% (w/v) Xylencyanol FF
	30% (v/v) Glycerin
	Autoklaviert

Ethidiumbromid-Stammlösung	1% (w/v) Ethidiumbromid
----------------------------	-------------------------

### 4.1.7.2 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Arbeiten

#### 4.1.7.2.1 Lösungen für SDS-PAGE und Western Blot

SDS-PAGE Probenpuffer (2x)	150 mM Tris-HCl (pH 6.8)
	30% (v/v) Glycerin
	1,2% (v/v) SDS
	0,0018% (w/v) Bromphenolblau
	15% (v/v) β-Mercaptoethanol

Laufpuffer (10x)	0,25 M Tris
	1.9 M Glycin
	1% SDS

Transferpuffer	0,02 M Tris
	0,15 M Glycin
	20% (v/v) Ethanol

PBS-T (Waschpuffer)	0.05% Tween 20 in PBS (1x)
---------------------	----------------------------

Blockpuffer	0,5-5% (w/v) Magermilchpulver in PBS-T
	1x Roti in Wasser



### 4.1.7.3 Medien für die Kultur eukaryontischer Zellen

Als Grundmedien für die Zellkultur werden Fertigmedien der Firma Invitrogen verwendet:

DMEM (4,5g/l D-Glucose) (*Dulbecco's modified Eagle's Medium*)  
RPMI 1640

Zusätze zu den Fertigmedien:

Ciproflaxin (Konzentration: 100 µg/ml)	Invitrogen
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom KG
Penicillin G (Konzentration: 100 Units/ml)	Invitrogen
Streptomycin (Konzentration 100 µg/ml)	Invitrogen
L-Glutamin, HEPES, β-Mercaptoethanol	Invitrogen

### 4.1.7.4 Puffer und Lösungen für die Zellkulturarbeit

D-PBS (1x, Invitrogen)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Trypsin (1x)	0,05% (w/v) Trypsin in 1 x D-PBS

### 4.1.7.5 Lösungen für Lymphozyten/Splenozyten-Isolation

HBSS (Hank's gepufferte Salzlösung)	Invitrogen
ACK Lysispuffer	Bio Whitaker

### 4.1.7.6 Lösungen für immunologische Assays

CFSE-Stammlösung	5 mM CFSE in DMSO
PBS-T	0,05% (v/v) Tween 20 in 1x PBS
FACS-Puffer in PBS	0,05% (w/v) BSA 1 mM NaN <sub>3</sub>
4 % Paraformaldehyd	4 g Paraformaldehyd in 100 ml 1x PBS
Permeabilisierungspuffer in FACS-Puffer	0,01% (w/v) Saponin
ELISA-Coating-Puffer	0,1 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,1 M NaHCO <sub>3</sub> pH 9.5
ECL Chemilumineszenz-Substrat für ELISA	

Lösung A: 200 ml Tris-Cl pH8.6

50 mg Luminol

30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Verhältnis: 1(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) : 3225 Lösung A

Lösung B: 1,1 mg/ml p-Hydroxycoumarinsäure in DMSO

Verhältnis: 1 (Lösung B) : 100 (Lösung A)

### 4.1.7.7 Medien für Bakterienkultur

Alle Medien werden autoklaviert. Die entsprechenden Platten werden durch Zusatz von 2% (w/v) Agar zum Medium hergestellt.

LB	1% (w/v) Hefe-Extrakt 1% (w/v) Bacto-Peptide 0,5% (w/v) NaCl
----	--

SOC	2% (w/v) Bacto-Peptide
	1% (w/v) Hefe-Extrakt
	0,1% (w/v) NaCl
	20 mM Glucose

### 4.1.8 Reagenzien

Acryl-Bisacrylamid Mix (30:0,8) (Acrylamid)	Roth
Agar	AppliChem
Agarose	Roth
Ampicillin	Gibco
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
Calciumchlorid	J.T. Baker
Dimethylsulfoxid (DMSO)	J.T. Baker
Essigsäure	J.T. Baker
Ethanol	J.T. Baker
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma
Glucose	J.T. Baker
Glycerin	Riedel-de Haen
Glycin	AppliChem
Hefeextrakt	Merck
4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin-Ethansulfonsäure (HEPES)	Biomol AG
Imidazol	Sigma
Inflexal V	Baxter
Isopropanol	Merck
Kaliumacetat	J.T. Baker
Kaliumchlorid	J.T. Baker
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
di-Kaliumhydrogenphosphat	Riedel-de Haen
Magermilchpulver	Heirler
Magnesiumchlorid	J.T. Baker
Magnesiumsulfat	J.T. Baker
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth
Natriumacetat	J.T. Baker
Natriumazid	Riedel-de Haen
Natriumchlorid	J.T. Baker
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem
Natriumfluorid	AppliChem
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	J.T. Baker
Ovalbumin	Sigma
Paraformaldehyd (PFA)	Riedel-de Haen

### 4.1.8 Reagenzien (Fortsetzung)

Rek. murines GM-CSF	Biomol
Rek. murines IL-4	Biomol
Roti <sup>R</sup> Block	Roth
Salzsaure	J.T. Baker
Saponin	Sigma
Schwefelsaure	J.T. Baker
Streptomycinsulfat	AppliChem
Sucrose	J.T. Baker
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	AppliChem
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan-HCl (Tris-HCl)	AppliChem
Trypsin	Biochrom Ag
Trypton	AppliChem
Tween-20	AppliChem
Wasser	Braun

### **4.1.9 Geräte**

ELISA Washer	Thermolabsystems Wellwash4Mk2
37°C Brutschrank	ThermoScientific Heraeus
BioPhotometer	Eppendorf
Brutschrank Heracell 150; CO2 Incubator	Thermo Scientific
Eismaschine	Ziegra
Elektrophoresesysteme und Zubehör:	Mini-PROTEAN® Tetra Cell ventrikuläres lektrophoresesystem Mini Trans-Blot® cell Perfect Blue™ Elektrophoresis System 40-1214
Stromquelle E844	BioRad
Fluoreszenzmikroskop CKX41	Olympus
Gefrierschrank -20°C: comfort	Liebherr
Gefrierschrank -80°C: vip series -86°C	Sanyo
Kühlschrank profi line	Liebherr
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss

## Material und Methoden

Magnetrührer RH basic 2	IKA
Mastercycler	Eppendorf
Multipette plus	Eppendorf
Orion Microplate Luminometer u. Injection Unit	Berthold Detection Systems
pH-Meter 766 Calimatic	Knick
Pipetten Eppendorf Research family	Eppendorf
Sartorius cpa124S	Sartorius
Schüttler MaxQ 4000	Thermo Scientific
Sterilbank Hera safe	Heraeus
Thermomixer comfort	Eppendorf
Vortex-genie 2	Scientific Industries
Waage Kern 572	Oehmen
Wasserbad Typ 1008	GFL
Wellwash 4MK2	Thermo Labsystems
<u>Zentrifugen:</u>	
Centrifuge 5424	Eppendorf
Biofuge pico	Heraeus
Centrifuge 5417R	Eppendorf
Heraeus Fresco21 Centrifuge	Thermo Scientific
Heraeus Multifuge X3R centrifuge	Thermo Scientific

Rotor: 75003608 round bucket, 75003618 plate carrier

### 4.1.10 Verbrauchsmaterialien

24- und 96-Kavitätenplatten	Sarstedt
Bakterienröhrchen	Sarstedt
Filterspitzen (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000µl)	Starlab
Kryoröhrchen	Sarstedt
Nitrozellulosemembran	Roth
Petrischalen	Sarstedt
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml, 15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Spitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Starlab
Sterilfilter (0,2 µm, 0,45 µm)	Sarstedt
Ultrazentrifugenröhrchen	Herolab
UV-Filme	Thermo Scientific
Whatman-Papier	Schleicher&Schuell
Zellkulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> )	Nunc

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Zytologische Methoden

#### 4.2.1.1 Kultivierung von Zelllinien

Die verwendete Zelllinie wurde, je nach Flaschengröße, in 5 ml, 20 ml oder 30 ml des entsprechenden Mediums bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Im Abstand von 2-3 Tagen wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit 1x D-PBS gewaschen, dann mit 3 ml Trypsin-Lösung für 5-10 min bei 37°C inkubiert und in 10 ml Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 10 ml frischem Medium aufgenommen. Ein Teil dieser Suspension wurde in eine neue Kulturflasche mit entsprechendem Medium gegeben. Die Erhaltungskultur wurde in Kulturmedium DMEM mit 10% FKS und 1% Ciprofloxacin kultiviert. Wurden Zellen für eine nachfolgende Transfektion ausgesät, so geschah dieses in Kulturmedium DMEM mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin.

#### 4.2.1.2 Transfektion von Zellen mittels PEI-Reagenz

Für die Transfektion wurden die Zellen in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen am Tag zuvor ausplattiert. Zu 2 ml Kulturmedium (DMEM + 1% P/S) wurden insgesamt 40 µg Plasmide zugegeben, gründlich durchmischt und anschließend mit 60 µl PEI-Reagenz (c= 1mg/ml) vermischt. Nach Durchmischung wurde der Reaktionsansatz für 10 min bei RT inkubiert, um eine Komplexbildung des PEI-Reagenzes und der DNA zu gewährleisten. Die Komplex-Lösung wurde mit 18 ml Medium (DMEM mit 10% FKS + 1% P/S) vermischt und auf die Zellen gegeben. Nach 12 h erfolgte ein Mediumwechsel auf Kulturedium mit lediglich 0,5 % FKS.

#### 4.2.1.3 Pseudotypisierung lentiviraler Partikel (LV-Partikel)

Für die Herstellung von pseudotypierten lentiviralen Partikeln wurden HEK 293T-Zellen wie in 3.2.1.2 beschrieben mittels PEI transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden für 48 h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Mit Hilfe eines 0,45 µm Filters wurde das erhaltene letivirale Partikel enthaltende Medium filtriert, um verbliebene Zelltrümmer zu entfernen.

Die LV-Partikel wurden anschließend unverdünnt oder in Verdünnungen (1 zu 10 oder 1 zu 100) auf 24 Kavitätenplatten mit 50.000 HEK 293 A-Zellen oder anderen Zelllinien gegeben und für 72 h unter den vorher genannten Kultivierungsbedingungen inkubiert. Anschließend erfolgte die Auswertung der Transduktion der Zielzellen durch Auszählen der grün fluoreszierenden Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop. Der Transduktionstiter wurde mit Hilfe der gezählten Gesichtsfelder, dem Flächenfaktor der Kavität und der Verdünnung berechnet.

### **4.2.1.4 VLP Aufreinigung**

Für die Herstellung von VLPs wurden HEK 293T-Zellen wie in 3.2.1.2 beschrieben mittels PEI transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden für 48 h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die größeren Zellfragmente wurden anschließend durch 10 min zentrifugieren bei 1000 rpm (4°C) entfernt. Mit Hilfe eines 0,45 µm Filters wurde das erhaltene VLP-haltige Medium filtriert, um verbliebene Zelltrümmer zu entfernen. Die VLPs wurden mittels 20% Succrose-Gradienten durch Zentrifugation (*High Speed*: 20000 g, 3h, 4°C oder *Low Speed* 3500 g, über Nacht, 4°C) aufgereinigt. Anschließend wurde das Pellet in einem gewünschten Volumen 1x D-PBS mit 10 % Succrose resuspendiert und aliquotiert. Die VLPs wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

### **4.2.1.5 Virus Anzucht und Aufreinigung**

Die Anzucht von RSV ist auf Hep2-Zellen durchgeführt worden. Diese wurden 24 h vor der Infektion in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät. Die Infektion mit RSV erfolgte mit einer multiplicity of infection (MOI) von 0,05-0,5 in DMEM+ 1% P/S ohne FKS für 2 h im Inkubator (5 % CO<sub>2</sub>; 90 % Luftfeuchtigkeit, 37 °C). Nach der Inkubation wurde das Infektionsmedium verworfen und durch 10 ml frisches Medium (DMEM+ 0,5% FKS+1% P/S) ersetzt. Nach 72 h wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Flaschenboden im Medium abgelöst und für 10 min bei 300 xg zentrifugiert, um Zelltrümmer abzutrennen. Der Virus-haltige Überstand wurde durch einen 0,45 µm Filter filtriert und mittels Ultrazentrifugation durch ein 20 %iges Succrosekissen für 2 h bei 18.000 xg (4°C) aufgereinigt. Das Pellet wurde in PBS mit 10 %iger Succrose resuspendiert und bei -80°C gelagert.

### **4.2.1.6 Virus Titration**

Zur Bestimmung des Virustiters wurden Hep2-Zellen in einer 96-Kavitätenplatte ausgesät und mit verschiedenen Verdünnungen des erhaltenen Virus infiziert. Die infizierten Zellen wurden durch eine Immunfärbung mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 3C4 (P-Protein) gefärbt.



Dieser wurde mit Hilfe eines sekundären anti-mouse HRP Antikörpers detektiert. Abschließend konnte so mittels AEC-Färbereagenz die infizierten Zellen angefärbt werden. Für den Virustiter wurde die Verdünnungsstufe mit noch einer infizierten Zelle bestimmt.

### 4.2.2 Molekularbiologische Methoden

#### 4.2.2.1 Plasmid-Präparation mittels Kit

Die Plasmid-Präparation erfolgte laut Herstellerangaben (Macherey&Nagel NucleoBond Xtra Maxi EF und NucleoSpin Plasmid).

Das Grundprinzip ist bei den Kits identisch, variiert wird lediglich das Kulturvolumen, hiervon ist entsprechend die isolierbare DNA-Menge abhängig. Nach der Zentrifugation sammeln sich die Bakterien als Pellet an. Dieses wird resuspendiert, um anschließend die Bakterienwand alkalisch zu lysieren. Nach der Lyse wird neutralisiert. Das Lysat wird mittels Filter filtriert, um die Zelltrümmer zu entfernen. Anschließend wird das Filtrat gewaschen und dabei ein Pufferwechsel durchgeführt. Das Gemisch wird mittels Säulenchromatographie aufgereinigt. Nach DNA-Elution erfolgt eine Isopropanol-Fällung und Ethanol-Reinigung. Abschließend kann die gereinigte DNA in Puffer oder Wasser aufgenommen werden.

#### 4.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung einer DNA-Lösung erfolgt mit Hilfe der Bestimmung der Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm. Hierbei gilt die folgende Umrechnung:

$$OD_{260} = 1 = 50 \mu\text{g/ml doppelsträngige DNA}$$

#### 4.2.2.3 Restriktionskontrolle der Plasmid-Präparationen

Zur Kontrolle der Plasmid-Präparationen wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Dieses ist mit Hilfe von spezifisch schneidenden prokaryotischen Restriktionsendonukleasen möglich. Sie schneiden die DNA an definierten Stellen und bieten somit die Möglichkeit die Plasmid-DNA anhand ihres Fragmentierungsmusters zu kontrollieren. Der Einsatz der Restriktionsenzyme erfolgte in den zugehörigen Puffern und BSA-Zugabe laut Herstellerangabe. Hierzu wurden 2  $\mu\text{l}$  des entsprechenden Puffers mit 0,75  $\mu\text{l}$  spezifischem Enzym und 5  $\mu\text{l}$  Mini-Präparation-DNA bzw. 1  $\mu\text{g}$  DNA bei Maxi-Präparation auf 20  $\mu\text{l}$  mit bidest. Wasser aufgefüllt und vorsichtig vermischt. Die Restriktion erfolgt für mind. 1 h bei 37° C.

### 4.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Es wurden 1 %ige Gele durch Aufkochen der Agarose in 1x TAE-Puffer mit Zusatz von 0,07 % Ethidiumbromid-Lösung und anschließendem Erstarren in der Elektrophoresekammer hergestellt. Die DNA-Proben (15 µl) wurden mit 1/6 DNA-Ladepuffer versetzt und in die Taschen des mit TAE-Puffer überschichteten Gels pipettiert.

Als Größenstandard der DNA wurden 5 µl 1kb-Leiter und 100bp-Leiter von Invitrogen aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte für ca. 1 h bei konstanter Spannung von 100-120 V.

### 4.2.2.5 SDS-Page

Bei einer SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese werden Proteine nach ihrer molekularen Größe aufgetrennt. Hier wird ein diskontinuierliches System nach Laemmli verwendet, dieses gewährleistet eine gute Auftrennung und klar erkennbare Proteinbanden. Es wurden 8- 15 %ige Trenn- und 5 %ige Sammelgele verwendet.

Die Proben wurden mit ¼ Probenvolumen 4x Laemmli-Puffer versetzt und bei 95 °C für 5 min denaturiert oder lediglich mit 2x Laemmli-Puffer ohne β-Mercaptoethanol für die Detektion des RSV-F versetzt. Die Proben wurden in die Taschen des Sammelgels überführt. Die Elektrophoresekammer wurde mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt und bei 80-120 V für 1-2 h in einem Mini PROTEARN Tetra Cell Elektrophorese-System erfolgte die Auftrennung.

### 4.2.2.6 Western-Blot

Die spezifische Nachweisanalyse von Proteinen mittels Western-Blot, wird mit Hilfe des Transfers der Proteine nach einer SDS-Page (Acrylamidgel) auf eine Nitrozellulose-Membran und anschließender Detektion mit spezifischen Antikörpern durchgeführt.

Die in der SDS-Page (3.2.2.5) aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Hierfür wurde das Acrylamidgel vorsichtig und luftblasenfrei auf die Membran gelegt. Für den Transferprozess wurde eine über und unter der Gel/Membran-Schicht ein Whatman<sup>R</sup> Filterpapier und ein Schwamm gelegt. Diese wurden zuvor in Transferpuffer getränkt. Der Transferprozess wurde in 1x Transferpuffer für ca. 1 h bei 100 V unter Eiskühlung in einer Mini Trans-Blot<sup>R</sup> Apparatur durchgeführt.

### 4.2.2.6 Western-Blot (Fortsetzung)

Die Membran wurde anschließend in Blocklösung bei RT für 2 h leicht geschüttelt. Der primäre Antikörper wurde in Blocklösung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Zum Entfernen nicht gebundener Antikörper wurde die Membran dreimalig für 5 min mit PBS-T gewaschen. Die Membran wurde mit dem entsprechenden sekundären Antikörper für 1 h bei RT inkubiert und erneut gewaschen. Die Membran wurde zur Detektion für ca. 5 min mit ECL (*enhanced chemiluminescence*)-Detektionslösung inkubiert und in Folie eingeschweißt. Mit Hilfe der Exposition der Membran auf einem UV-Film konnte die Chemilumineszenzreaktion detektiert werden.

### **4.2.2.7 ELISA**

Das Grundprinzip eines ELISA (*Enzyme-linked immuno sorbent Assay*) besteht aus einem an der Festphase immobilisierten zu messenden Protein oder dessen Standard. An das Antigen bindet ein primärer spezifischer Antikörper, der als Nachweisantikörper fungiert. An den Nachweisantikörper wird das Konjugat gebunden, welches eine enzymatische Aktivität aufweist, z.B.: HRP (Meerrettichperoxidase). An das Konjugat kann ein spezifisches Substrat gebunden werden, welches durch die enzymatische Aktivität des Konjugat-Komplexes zu einem nachweisbaren Reaktionsprodukt umgesetzt wird. Mit Hilfe z.B.: eines Photometers bei Farbstoffsubstraten, ist diese Färbung messbar. Dieses kann anhand der Intensität der Färbung mittels einer Standardkurve in Beziehung zu einander gesetzt und somit die Konzentration des Proteins bestimmt werden.

### ELISA mit rekombinantem Protein (Standard)

Für den ELISA wurde eine Beschichtung der Platte mit rekombinantem Protein gp41 und RSV-F, sowie den hergestellten VLPs (Verdünnungsreihe, Inkubation über Nacht bei 4° C) verwendet. Es wurde dreimalig mit 250 µl PBS-T mit dem ELISA-Wäscher gewaschen. Das Blockieren der Platte erfolgte mit 200 µl/Well 5 % Magermilch-Lösung für 1 h bei RT. Anschließend wurde die Platte mit 3 x 250 µl PBS-T mit Hilfe des ELISA-Wäschers gewaschen. Es erfolgte die Auftragung des entsprechenden Antikörpers (gp41 mit Antikörper-3D6 und RSV-F mit dem monoklonalen Mausantikörper 18F12) in der Verdünnung 1:1000-1:5000 für 1 h bei RT. Von dem Konjugat (Kaninchen anti-mouse IgG HRP Verdünnung 1:2000) wurden 100 µl je Well für 1 h bei RT inkubiert. Die Verdünnung des Konjugates und der Antikörper erfolgte in 2% Milch-Lösung. Abschließendes sechsmaliges waschen mit 250 µl PBS-T wurde gefolgt von der Auftragung des Substrates (ECL), an die sich die Messung der relativen Lichteinheiten (RLU/s) direkt mit dem Luminometer anschloss. Die RLU wurden für 1s gemessen.

### **4.2.2.8 Messung des Endotoxingehaltes in den hergestellten Impfstoffen**

Die verwendeten Impfstoffpräparationen wurden vor ihrem Einsatz auf ihren Endotoxin-Gehalt untersucht. Der Endotoxin-Gehalt wurde mit Hilfe des Kits Limulus Amebocyte Lysate QCL-1000 von Lonza bestimmt. Es konnte damit eine Endotoxinkonzentration von weniger als 0,1 EU/Dosis bestimmt werden und somit entsprachen die verwendeten Vakzine den Richtlinien für Impfstoffe.

### **4.2.3 Immunologische Methoden**

Die Haltung der Mäuse erfolgt in der Zentralen Versuchstierhaltung der Medizinischen Fakultät der RUB im S2-Bereich nach den Richtlinien der Zentralen Versuchstierhaltung.

#### **4.2.3.1 Immunisierungen von Mäusen**

In den Immunisierungsexperimenten wurden 7-9 Wochen alte, weibliche Mäuse verwendet. Es wurden Mäuse des Stammes balb/c (Charles River) verwendet.

Die Injektionen erfolgten subkutan in die Hinterpfoten der Mäuse, intra muskulär in die Hinterläufe oder mittels intra muskulärer Applikation mit anschließender Elektroporation ebenfalls in beide Hinterläufe.

Bei der subkutanen Injektion wurden die jeweiligen Vakzine in einem Gesamtvolumen von max. 50 µl isotonischer NaCl-Lösung verteilt auf die beiden Hinterpfoten der Mäuse injiziert. Bei der intramuskulären Applikation mit und ohne anschließende Elektroporation werden ebenfalls 50 µl NaCl-Lösung injiziert. Wenn eine Elektroporation durchgeführt wurde, erhielten die Mäuse zuvor eine Ketamin/Xylazin Narkose und wurden an den Hinterläufen rasiert. Die entsprechenden verwendeten Mengen werden im entsprechenden Ergebnisteil angegeben, da diese bei den durchgeführten Immunisierungen variierten.

Die Analyse der Immunantwort erfolgte durch Blutabnahme 3-4 Wochen nach Erstimmunisierung und nach 4 Wochen wurden die Tiere laut Immunisierungsschema mit dem entsprechend angegebenen Impfstoff erneut immunisiert. Es wurde 4 Wochen nach der letzten Immunisierung eine Belastungsinfektion mit RSV bzw. Influenza durchgeführt und die Tiere nach 5 (6) Tagen euthanisiert. Die benötigten Proben wurden entnommen (BAL, Lunge, Serum). Alternativ wurde 7 Tage nach der letzten Immunisierung den Mäusen Blut abgenommen, anschließend euthanisiert und je nach Bedarf die Milz und Blut entnommen.

### 4.2.3.2 Blutentnahme und Serenisolation

An den angegebenen Tagen wurde den Tieren unter Isofluran-Narkose retro-bulbär Blut entnommen. Es wurden ca. 8-10 Tropfen (ca. 300 µl) Blut über ein Mikro-Haematokritröhrchen in ein Reaktionsgefäß überführt. Das Blut wurde direkt mit einem Tropfen 77 mM EDTA vermischt und für 5 min bei 8000 rpm und 4 °C zentrifugiert, um das Plasma von den sonstigen schweren Bestandteilen des Blutes zu trennen. Das erhaltene Plasma (Überstand) wurde bei -20 °C gelagert.

### 4.2.3.3 Isolierungen von Splenozyten/Lymphozyten aus der Mäusemilz

Für die Isolierung der Splenozyten/Lymphozyten aus der Mäusemilz war es notwendig, die Maus laut Richtlinien zu euthanasieren und die Milz zu präparieren. Die Milz wurde durch ein steriles Zellsieb in 5 ml HBSS-Puffer zerrieben, so dass die kollagenen Bestandteile im Sieb zurück blieben. Anschließend wurde die Zelllösung mit einer Pipette gründlich resuspendiert und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit 1 ml ACK-Puffer zur Lyse der Erythrozyten resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zelllösung wurde auf 10 ml mit HBSS-Puffer aufgefüllt, um die Lyse zu unterbrechen. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert (5 min, 1000rpm, 4°C) und in 1 ml 1x D-PBS aufgenommen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen kurzzeitig auf Eis gelagert. Die benötigte Zelldichte wurde eingestellt.

### 4.2.3.4 Durchflusszytometrische Analyse (FACS-Analyse)

Die Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*; FACS) ermöglicht eine simultane Messung von unterschiedlichen physikalischen Zelleigenschaften in einer Suspension auf Einzelzellebene. In der Messkuvette werden am Analysepunkt Streu- und Fluoreszenzeigenschaften der Zelle gemessen und dokumentiert. Aufgrund der Streulichteigenschaften lassen sich Informationen zur Größe (Vorwärtsstreulicht) und Granularität (Seitwärtsstreulicht) der untersuchten Zellen sammeln. Die Fluoreszenzeigenschaften ergeben sich aufgrund von Expression von fluoreszierenden Proteinen oder durch das anfärben von Proteinen mit Hilfe von Fluoreszenz markierten Antikörpern. Der Antikörper ist mit einem Fluorophor gekoppelt und löst somit bei Bindung an das spezifische Protein eine Fluoreszenz aus, die im FACS messbar ist. Je nach Gerät ist es möglich mehrere Fluoreszenzbereiche anzuregen und gleichzeitig zu detektieren. Hierbei ist auf möglichst weit auseinander liegende Adsorptionsspektren der verwendeten Fluorophore der Antikörper zu achten, um eine gute Differenzierung zu ermöglichen. Somit ist es mit Hilfe der FACS-Analyse möglich gleichzeitig, schnell und mit hohen Probenanzahlen mehrere Parameter an der einzelnen Zelle zu vermessen.

In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrische Analyse für eine Vielzahl von immunologischen Analysen verwendet. Dazu zählen unter anderem intrazelluläre Zytokinfärbungen und Proliferationstests. In dieser Arbeit wurde das FACSCalibur™ der Firma BD Bioscience laut Herstellerangaben verwendet.

### 4.2.3.4.1 Modifizierte intrazelluläre Zytokinfärbung

Die intrazelluläre Zytokinfärbung dient der Analyse von Lymphozyten. Sie wird verwendet, um zu messen, ob immunmodulatorische Zytokine von Lymphozyten nach spezifischem Antigen-Kontakt ausgeschüttet werden. Hierbei wurden Milzzellen verwendet. Die Zellen der immunisierten Tiere werden *in vitro* mit dem spezifischen Peptid restimuliert. Durch die Zugabe von Monensin wird die Sezernierung von Zytokinen während der Restimulation verhindert und die Zytokine akkumulieren in der Zelle. Die akkumulierten Zytokine können mittels fluoreszenz-markierter Antikörper intrazellulär angefärbt und durch eine FACS-Analyse nachgewiesen werden. Es wurden die Milzzellen wie beschrieben (siehe 3.2.3.4) isoliert. Die Zellen wurden für 6 h in Gegenwart von 2 µM Monensin in 200 µl R10-Medium und spezifischem Peptid (5 µg/ml Peptidkonzentration) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 90% Luftfeuchtigkeit in einer 96-Rundböden-Mikrotiterplatte im Brutschrank inkubiert. Bei den Ansätzen zur Untersuchung von CD8<sup>+</sup>-Zellen wurden zudem 2 µl αCD107a-FITC Antikörper zugesetzt. Der αCD107a-FITC-Antikörper markiert degranulierende Zellen. Nach der Inkubation erfolgte die Blockierung des Fc-Rezeptors durch Zugabe von 50 µl Fc-Block-Lösung (Verdünnung 1:100 in FACS-Puffer). Die Zellen wurden für 10 min bei 4 °C inkubiert. Um überschüssige Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen mit 150 µl FACS-Puffer und anschließend zentrifugieren (3 min, 872 g, 4°C) gewaschen. Es erfolgte die Färbung der Oberflächenmarker mit αCD8-PerCP bzw. αCD4-FITC Antikörpern durch Zugabe von 100 µl Antikörperverdünnung (1:100 in FACS-Puffer). Die Zellen wurden kurz resuspendiert und für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden zweimalig mit 1x D-PBS gewaschen. Nun wurden die Zellen in 100 µl PBS resuspendiert und in 2 % Formaldehyd fixiert (20 min, RT, dunkel). Die Zellen wurden mit FACS-Puffer gewaschen (zweimalig mit 200 µl) und bei Bedarf über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Zur Permeabilisierung wurden die Zellen in 150 µl Permeabilisierungspuffer aufgenommen und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden sedimentiert. Die Färbung der Zytokine erfolgte, indem die Zellen in 100 µl Antikörperlösung (αIFN-γ-PE; αGranzm-B.PE; αIL-10-PE und ggf. αIL-2-APC in Permeabilisierungspuffer) resuspendiert wurden. Die Zellen wurden für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Folgend wurden zwei Waschschrte mit Permeabilisierungspuffer (je 200 µl) und einmaliges Waschen mit FACS-Puffer (200 µl), um die ungebundenen Antikörper zu entfernen, durchgeführt.

Die Zellen wurden für die Analyse in 250 µl FACS-Puffer resuspendiert und in entsprechende FACS-Röhrchen überführt. Abschließend konnten die Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert werden.

### **4.2.3.5 ELISA (Enzyme-linkes immunosorbent Assay) zur Antikörperbestimmung aus Mausserum**

Ein ELISA zur Antikörperbestimmung unterscheidet sich von einem gewöhnlichen ELISA in der Form, dass hierbei das Antigen, gegen das Antikörper in den Proben erwartet werden, an die Platte gekoppelt wird. Die Proben bzw. die enthaltenen Antikörper können an die Antigene auf der Plattenoberfläche binden. Diese gebundenen Antikörper können dann mit einem antikörperklassenspezifischem Antikörper detektiert werden. Die verwendeten Antikörper enthalte meistens eine HRP-kopplung und können durch diese Enzymaktivität die Reaktion des abschließend eingesetzten Substrates auslösen und somit werden die Antigen-spezifischen Antikörper in den Proben messbar.

Mit Hilfe des verwendeten ELISA konnten die erhaltenen Seren von immunisierten Tieren auf die Präsenz von antigenspezifischen Antikörpern untersucht werden. Für den ELISA wurde eine Beschichtung der Mikrotiterplatte (MaxiSorb, Nunc, weiß) mit spezifischem Protein oder inaktiviertem Virus mit Inkubation über Nacht bei 4° C verwendet. Die entsprechende Menge Protein wurde in Beschichtungspuffer verdünnt und jeweils 100 µl der Verdünnung je Vertiefung auf die Mikrotiterplatte gegeben. Am folgenden Tag wurde dreimalig mit 250 µl PBS-T gewaschen. Das Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen an der Oberfläche der Platte erfolgte mit 200 µl/Well 1x Roti-Block in PBS-T für 1 h bei RT. Anschließend wurde die Platte mit 3 x 250 µl PBS-T mit Hilfe des ELISA-Wäschers gewaschen. Es erfolgte die Auftragung der Testseren von immunisierten Mäusen (Verdünnung soweit nicht anders angegeben 1:100 in 0,1x Roti-Block in PBS-T) mit 100 µl je Ansatz für 1 h bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit 250 µl PBS-T im ELISA-Wäscher wurden für 1 h bei RT 100 µl entsprechendem Antikörper für die jeweilige Analyse aufgetragen. Die Verdünnung der Antikörperlösungen erfolge in 0,1x Roti-Block. Die verwendeten Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper können Immunglobuline der Klasse IgG1 und IgG2a nachweisen. Die Antikörper gegen totales IgG(h+l) und IgM besitzen keine gekoppelte Enzymaktivität und wurden in einem weiteren Schritt mittels Nachweisantikörper mit Enzymaktivität detektiert. Es erfolge sechsmaliges waschen mit PBS-T, um ungebundene Sekundärantikörper zu entfernen. Direktes auftragen der ECL-Lösung für eine Chemilumineszenz-Reaktion schloss die Detektion ab. Die Messung der RLU/s erfolge sofort mit Hilfe des Luminometers.

### **4.2.3.6 Neutralisationstest zur Bestimmung von neutralisierenden Antikörpern im Serum**

Im Serum der immunisierten Mäuse wurden mittels Neutralisationstest die RSV-spezifischen neutralisierenden Antikörper nachgewiesen. Hierfür wurde das Serum 1:6 in HBSS-Puffer verdünnt und bei 56 °C für 30 min. Komplement-inaktiviert. In einer 96-Kavitätenplatte wurde eine serielle Verdünnung hergestellt und mit  $10^3$  PFU/ml rekombinant grünem RSV (rgRSV) in DMEM ohne FKS für 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Serum-Virus-Lösung wurden 10.000 Hep2-Zellen zugefügt und für 48 h bei 37°C, 5%CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Abschließend konnte im Fluoreszenzmikroskop durch die GFP-Detektion bestimmt werden, in welcher Serumverdünnung die Infektion mit rgRSV um 50 % (*inhibitory concentration of 50 %*; IC<sub>50</sub>) verringert wurde.

### **4.2.3.7 Differentialfärbung von zytologischem Material**

Die Bestimmung der Zellkomposition der BAL wurden diese Zellen nach ACK-Lyse mittels Cytospin auf einen Objektträger aufgebracht und mit Entellan eingedeckt. Die Zellen wurden mittels HAEMA-Schnellfärbung nach Herstellerangaben gefärbt und unter dem Lichtmikroskop ausgewertet.



## **5. Ergebnisse**

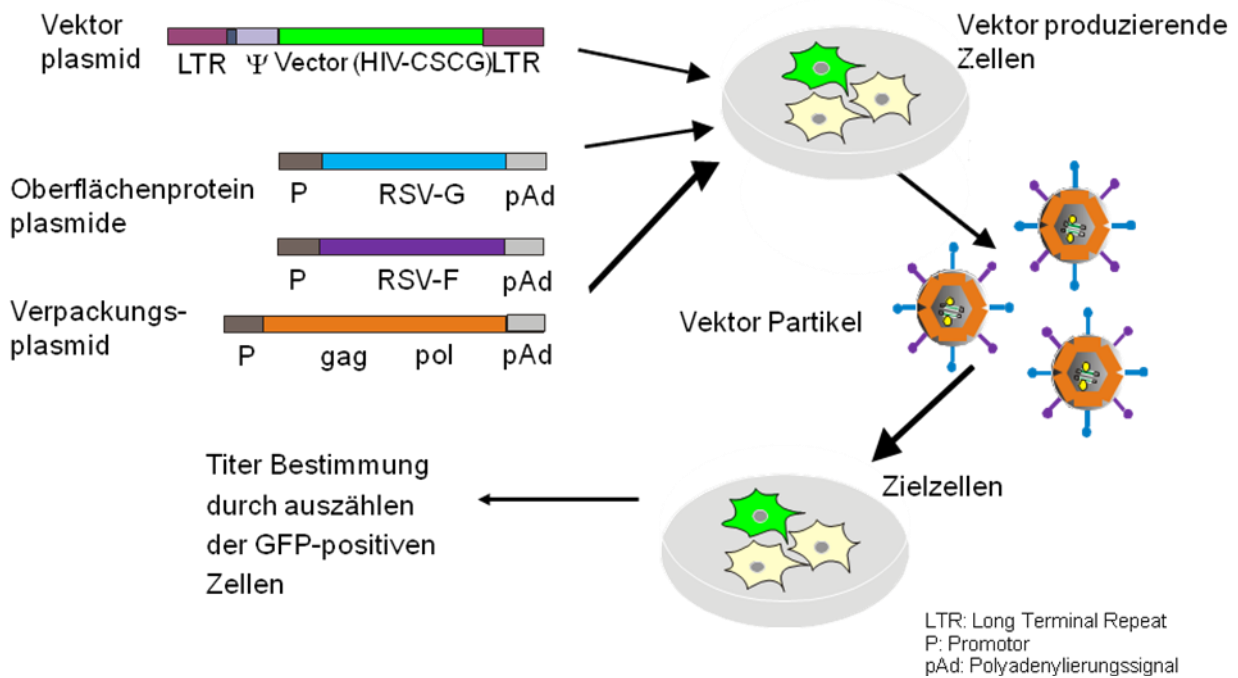
Im Rahmen dieser Dissertation wurden Impfstoffkandidaten gegen das Respiratorische Syncytial Virus (RSV) und gegen das Influenza A Virus auf Basis von virus-ähnlichen Partikeln untersucht. Bisher war es nicht gelungen Virus-ähnliche Partikel basierend auf dem Matrixprotein von RSV und den Oberflächenproteinen von RSV bzw. RSV und Influenza A herzustellen. Die VLPs wurden hier molekular-biologisch und *in vivo* im Mausmodell genauer analysiert. Bei der *in vivo* Analyse wurden die immunogenen Eigenschaften anhand von humoraler und zellulärer Immunantwort erfasst und die protektiven Effekte mittels der Reduktion der Virusbeladung nach einer Belastungsinfektion untersucht.

### **5.1 Produktion und *in vitro* Analyse der hergestellten Virus-ähnlichen Partikel**

Die Analyse der Funktionalität der Oberflächenproteine auf den erstmalig hergestellten VLPs ist von entscheidender Bedeutung für die Immunogenität der VLPs. Aus diesem Grunde wurden die viralen Antigene RSV-F, -G und IVA-HA genauer analysiert. Die für die Immunisierung verwendeten VLPs wurden daher nach der Herstellung mittels proteinbiochemischer Methoden untersucht.

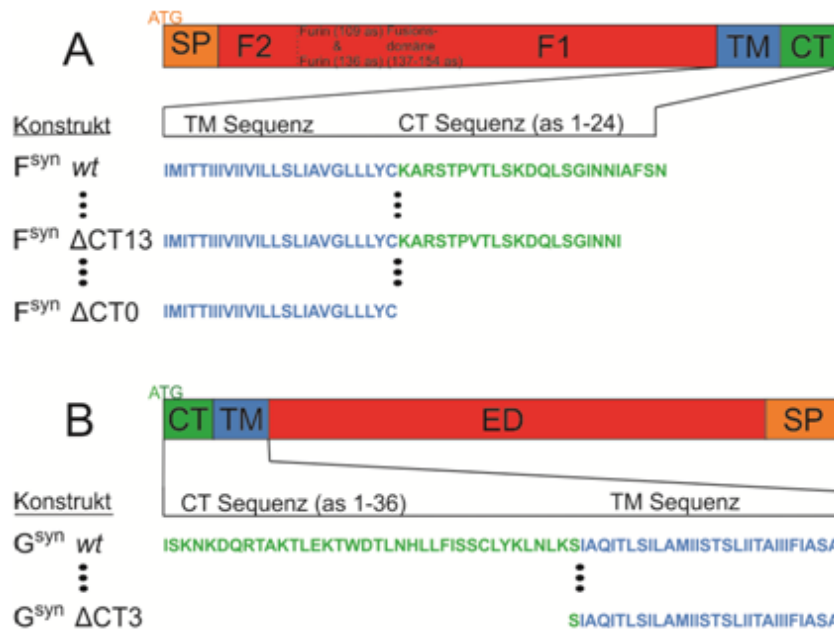
#### **5.1.1 Charakterisierung der Funktionalität von RSV-F, RSV-G und IVA-HA auf viralen Partikeln**

Die funktionale native Konformation der viralen Antigene auf den VLPs ist essentiell für die Wirksamkeit der Partikel. Die natürliche Konformation der viralen Proteine RSV-F, RSV-G und IVA-HA wurde mit Hilfe von lentiviralen Partikeln untersucht. Die lentiviralen Partikel wurden mit verschiedenen Kombinationen der Oberflächenproteine pseudotypisiert und ihre Fähigkeit der Transduktion von Zielzellen in Zellkultur überprüft.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Pseudotypisierung von lentiviralen HIV Partikeln mit RSV-Oberflächenproteinen.** Plasmide werden in die Zellen transfiziert und nach 36-48 h die Überstände filtriert und auf Zielzellen gegeben. Nach 72 h nach Transduktion kann der Titer anhand der grün fluoreszierenden Zellen ausgewertet werden. Genauer Ablauf siehe Methoden 4.2.1.3.

Unter Pseudotypisierung versteht man den Austausch von viralen Hüllproteinen bei der Erzeugung von viralen Vektorpartikeln. In diesem Fall wurde der auf HIV-1 basierende lentivirale Vektor HIV-CSCG verwendet, welcher das Reportergen des Grün fluoreszierenden Proteins (GFP) enthält und selbst inaktivierend über die verwendeten LTR (*long terminal repeats*) ist. Nach der Infektion der Zielzellen wird das Reportergen exprimiert und kann im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Bei der Pseudotypisierung des verwendeten lentiviralen Vektors mit den codonoptimierten Sequenzen für die Oberflächenproteine RSV-F und RSV-G konnten keine Infektionen in den Zielzellen nachgewiesen werden. In einer Publikation konnte bereits gezeigt werden, dass bei einem anderen Paramyxovirus, dem Masernvirus eine Pseudotypisierung gelang, nachdem die cytoplasmatische Domäne (*cytoplasmic tail*, CT) der Oberflächenproteine verkürzt wurde [111]. Dieser Ansatz erschien auf das RSV übertragbar und wurde daher weiter verfolgt.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der Deletionskonstrukte RSV-F und RSV-G.** Es wurden sukzessive Deletionskonstrukte hergestellt, bei denen jeweils eine bis drei Aminosäuren fortlaufend in der Cytoplasmatischen Domäne (CT) fehlen. Die wichtigsten Konstrukte wurden mit ihrer Aminosäuresequenz dargestellt. Eine vereinfachte Darstellung des Signalpeptides (SP), der Ektodomäne (ED), Transmembrandomäne (TM) ist farblich markiert.

Die Klonierung erfolgte durch überlappende PCR und die erhaltenen Deletionskonstrukte für RSV-F und RSV-G enthielten sukzessive Verkürzungen in den cytoplasmatischen Domänen. Ein Einblick in die erstellten Verkürzungsvarianten (Deletionskonstrukte) zeigt Abbildung 7. Die Klonierung der meisten Konstrukte war bereits im Vorfeld dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe erfolgt. Die Expression wurde anschließend mittels Western-Blots und die Sequenz mittels Sequenzierung für jedes Konstrukt überprüft. Daraufhin wurden die Deletionskonstrukte im Infektionsversuch mittels pseudotypisierter lentiviraler Vektoren analysiert. Ein schematischer Ablauf eines Infektionsassays ist in Abbildung 6 zu finden. Für die Produktion der pseudotypisierten lentiviralen Partikel dienten HEK293T Zellen, diese wurden mit den entsprechenden Plasmidkombinationen transfiziert und die Überstände mit den hergestellten Vektor-Partikeln 48 h nach Transfektion auf die Zielzellen gegeben. Die Infektionsereignisse konnten dann 72 h später mittels Fluoreszenzmikroskop über GFP nachgewiesen werden. Die Deletionskonstrukte konnten in den Infektionsversuchen nur in wenigen Kombinationen Transduktionstiter erzielen. Eine Ausschnittsübersicht ist in Tabelle 1 gezeigt.

**Tabelle 1: Transduktionsfähigkeit pseudotypisierter lentiviraler Partikel.** Lentivirale Partikel auf Grundlage des HIV 1-Vektors HIV-CSCG mit den HIV-1 Proteinen Rev, Tat, Gag und Pol wurden mit den RSV Proteinen F, G, F $\Delta$  (verschiedene), G $\Delta$  (verschiedene) pseudotypisiert. Die Titer einer Auswahl an Deletionskonstruktombinationen nach der Transduktion von HEK 293A Zellen wurde ermittelt und in der Tabelle angegeben. GFU/ml: grün fluoreszierende Einheiten (*green fluoreszenz units*) n=3-5.

Deletionskonstrukt/	G <sup>syn</sup>	G <sup>syn</sup> $\Delta$ CT2	G <sup>syn</sup> $\Delta$ CT3	G <sup>syn</sup> $\Delta$ CT4
<b>Titer (GFU/ml)</b>				
F <sup>syn</sup>	< 5	< 5	< 5	< 5
F <sup>syn</sup> $\Delta$ CT0	< 5	< 5	< 5	< 5
F <sup>syn</sup> $\Delta$ CT1	< 5	< 5	< 5	< 5
F <sup>syn</sup> $\Delta$ CT2	< 5	< 5	< 5	< 5
F <sup>syn</sup> $\Delta$ CT3	< 5	< 5	< 5	< 5
F <sup>syn</sup> $\Delta$ CT4	< 5	< 5	< 5	< 5
F <sup>syn</sup> $\Delta$ CT5	< 5	< 5	< 5	< 5
F <sup>syn</sup> $\Delta$ CT6	< 5	< 5	< 5	< 5
F <sup>syn</sup> $\Delta$ CT7	< 5	< 5	< 5	< 5
F <sup>syn</sup> $\Delta$ CT8	< 5	< 5	< 5	< 5
F <sup>syn</sup> $\Delta$ CT9	< 5	< 5	< 5	< 5
F <sup>syn</sup> $\Delta$ CT10	10 <sup>3</sup>	< 5	< 5	< 5
F <sup>syn</sup> $\Delta$ CT11	15	< 5	< 5	< 5
F <sup>syn</sup> $\Delta$ CT12	15	< 5	15	< 5
F <sup>syn</sup> $\Delta$ CT13	< 5	< 5	5x10 <sup>3</sup>	< 5
F <sup>syn</sup> $\Delta$ CT14	< 5	30	< 5	20

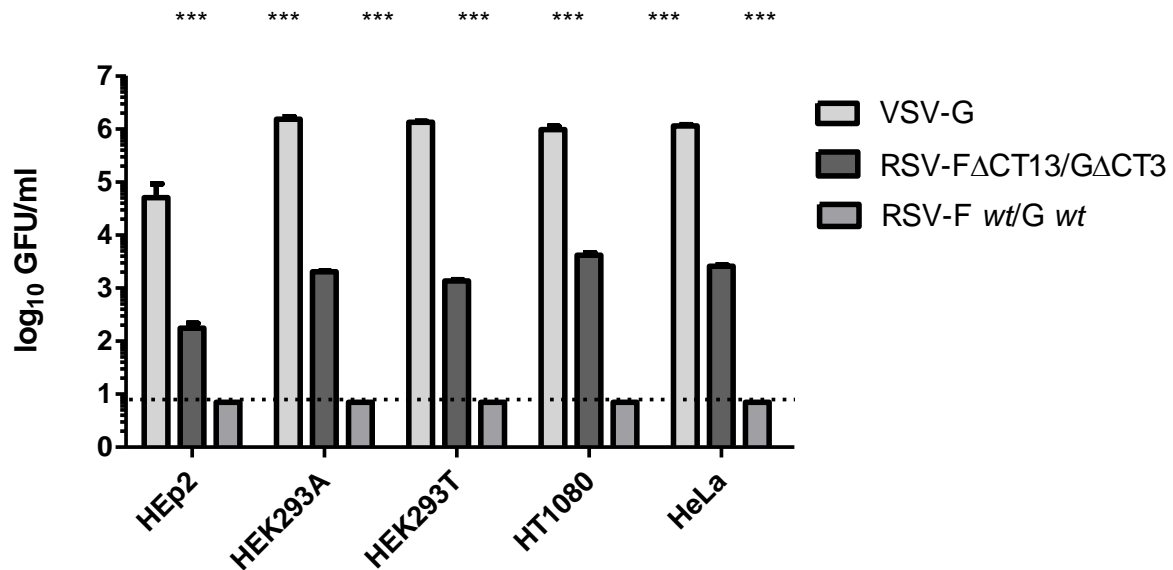
Die meisten Konstrukte und Kombinationen führten wie die Volllänge Varianten von RSV-F und RSV-G zu keinem messbaren Transduktionstiter oberhalb der Nachweisgrenze. Als Kontrolle wurde in jedem Infektionsversuch der lentivirale Vektor mit dem Oberflächenprotein G des Vesikulären Stomatitis Virus pseudotypisiert. Die reproduzierbar höchsten Titer konnte die Kombination RSV-F<sup>syn</sup> $\Delta$ CD13 und RSV-G<sup>syn</sup> $\Delta$ CD3 mit einem Titer von durchschnittlich 5x 10<sup>3</sup> GFU/ml im Überstand erzielen. Die Aufkonzentrierung mittels Zentrifugation der erhaltenen Überstände ist mit einem Faktor von rund 20 möglich gewesen.

In der Tabelle 2 sind die jeweiligen HIV-Gag-Protein Mengen und ihre erhaltenen Titer für eine Hochgeschwindigkeitszentrifugation und für eine Niedriggeschwindigkeitszentrifugation angegeben.

**Tabelle 2: HIV-Gag Konzentration im Vergleich zum Transduktionstiter von pseudotypisierter lentiviraler Partikel.** Die mit F $\Delta$  (RSV-F<sup>syn</sup> $\Delta$ CD13) und G $\Delta$  (RSV-G<sup>syn</sup> $\Delta$ CD3) pseudotypisierten lentiviralen Partikeln wurden mittels Gag-spezifischem ELISA und Transduktionseffizienz von HEK293A Zellen charakterisiert. Des Weiteren wurden die Partikel mittels verschiedener Zentrifugationsgeschwindigkeiten aufkonzentriert und die Protein/Titer Ergebnisse verglichen. GFU/ml: grün fluoreszierende Einheiten (*green fluoreszenz units*). Gezeigt ist 1 repräsentatives Experiment aus 3 unabhängigen Experimenten.

Konzentrierungsmethode	HIV-Gag	Titer
<b>Zentrifugation</b>		
	<b><math>\mu\text{g/ml}</math></b>	<b>GFU/ml</b>
<b>Keine</b>	<b>0,41</b>	<b><math>5 \times 10^3</math></b>
<b>Hohe Geschwindigkeit</b>	<b>1,97</b>	<b><math>2 \times 10^4</math></b>
<b>Niedrige Geschwindigkeit</b>	<b>1,79</b>	<b><math>8 \times 10^4</math></b>

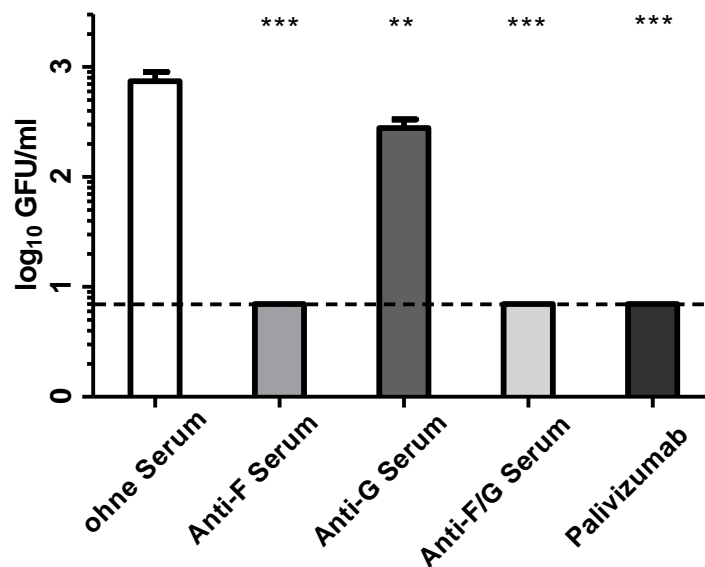
Die Transduktionseffizienz ist bei vielen pseudotypisierten lentiviralen Vektoren von der Zielzelle abhängig. Um die gefundene Kombination von Deletionskonstrukten RSV-F<sup>syn</sup> $\Delta$ CD13 und RSV-G<sup>syn</sup> $\Delta$ CD3 auf ihre Spezifität zu untersuchen, wurden verschiedene Zelllinien zur Transduktion untersucht und die Effizienz ausgewertet. In der Abbildung 8 wird deutlich, dass die Kontrolle mit VSV-G pseudotypisierten Vektoren in allen getesteten Zelllinien höhere Transduktionstiter aufweist. Die beste Effizienz für die Kombination RSV-F<sup>syn</sup> $\Delta$ CD13 und RSV-G<sup>syn</sup> $\Delta$ CD3 der Deletionskonstrukte wurde in der Zelllinie HT1080 gemessen.



**Abbildung 8: Transduktionsfähigkeit pseudotypisierter lentiviraler Partikel von verschiedenen Zelllinien.** Lentivirale Partikel auf Grundlage des HIV 1-Vektors HIV-CSCG mit den HIV-1 Proteinen Rev, Tat, Gag und Pol wurden mit den RSV Proteinen F, G, F $\Delta$  (RSV-F<sup>syn</sup> $\Delta$ CD13), G $\Delta$  (RSV-G<sup>syn</sup> $\Delta$ CD3) pseudotypisiert. Die Titer der Transduktion in verschiedenen Zelllinien wurde ermittelt. Als Transduktionskontrolle dienten Partikel mit dem Oberflächenprotein des Vesicular Stomatitis Virus (VSV-G). Die Beschriftung gibt die jeweilige Zelllinie an. Die gestrichelte Linie stellt das Detektionslimit der Messung dar, welches 25 transduzierte Zellen pro ml beträgt. GFU/ml: grün fluoreszierende Einheiten (*green fluorescence units*). Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. \*\*\*= $p < 0.05$  One-Way-ANOVA mit Tukey-Posttest bei  $n=3$ .

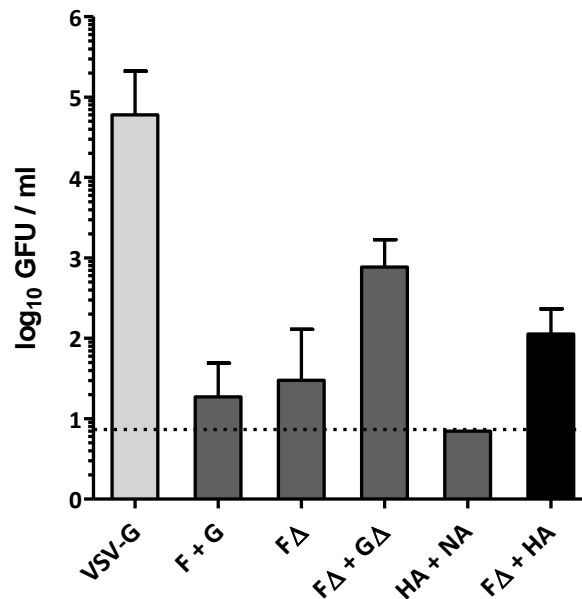
Ein weiterer Aspekt für die Funktionalität der Oberflächenproteine auf den lentiviralen Partikeln ist die Konformation der immundominanten Epitope des Proteins. Aus diesem Grund wurde getestet, ob mit Mausseren, welche nachweislich hohe Mengen an neutralisierenden Antikörper gegen das RSV-F Protein enthalten, die Infektion komplett inhibiert werden konnte. Man erkennt in Abbildung 9 deutlich, dass die Infektion der pseudotypisierten lentiviralen Vektoren mit dem Anti-F-Serumpool (Verdünnung 1 zu 100) vollständig inhibiert wurde.

Der monoklonale Antikörper Palivizumab (1  $\mu$ g/ml) ist auch gegen ein immundominantes und konserviertes Epitop im F-Protein gerichtet und konnte ebenfalls zu einer kompletten Inhibition der Transduktion führen. Das verwendete Anti-G Serum (Verdünnung 1 zu 100) konnte nur zu ca. 30% die Transduktionseffizienz herabsetzen und zeigte somit deutlich die Bedeutung von neutralisierenden Antikörpern gegen das RSV-F. Neutralisierende Antikörper können aber auch gegen das RSV-G-Protein gerichtet sein, scheinen aber nicht komplett die Infektion von pseudotypisierten Vektoren zu inhibieren (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Inhibition pseudotypisierter lentiviraler Partikel.** Lentivirale Partikel wurden mit den RSV Proteinen F $\Delta$  (RSV-F<sup>syn</sup> $\Delta$ CD13) und G $\Delta$  (RSV-G<sup>syn</sup> $\Delta$ CD3) pseudotypisiert. Die Titer der Transduktion in HEK 293A Zellen wurde nach Inkubation der lentiviralen Partikeln mit Seren oder monoklonalem Anti-F-Antikörper (Palivizumab) ermittelt. Die Beschriftung gibt die jeweil eingesetzten Seren in der Verdünnung 1:100 bzw. den hochgradig F-Protein neutralisierenden Antikörper Palivizumab 1  $\mu$ g/ml an. Die gestrichelte Linie stellt das Detektionslimit der Messung dar. GFU/ml: grün fluoreszierende Einheiten (*green fluorescence units*). Es ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. \*\*\*= $p < 0.05$  bzw. \*\*= $p < 0.1$  One-Way-ANOVA mit Tukey-Posttest  $n=3$ .

Im weiteren Verlauf wurden Kombinationen zwischen RSV und IVA Oberflächenproteinen für eine Pseudotypisierung von lentiviralen Vektoren untersucht. Einen messbaren Titer konnten hierbei bereits die bekannte Kombination RSV-F<sup>syn</sup> $\Delta$ CD13 und RSV-G<sup>syn</sup> $\Delta$ CD3 und auch bei RSV-F<sup>syn</sup> $\Delta$ CD13 und Influenza HA im Vergleich zu der VSV-G Kontrolle erzielt werden (Abbildung 10). Die Volllängevarianten IVA-HA und IVA-NA konnten wie auch RSV-F und RSV-G keinen detektierbaren Transduktionstiter in HEK293A Zellen erreichen. Mit Hilfe der Pseudotypisierung von lentiviralen Partikeln konnte die Funktionalität der verwendeten Oberflächenproteine von RSV und IVA untersucht werden. Es kann hierbei nicht ausgeschlossen werden, dass das IVA-HA in diesem Experiment lediglich die Adhäsion der Bindung an die Zielzelle bewirkt. Die Überstände wurden nicht mit Trypsin behandelt, um eine Konformationsänderung zu erzielen [112]. Eine Expression wurde für das verwendete Influenza HA Plasmid bereits in anderen Arbeiten in der Abteilung von Herrn Prof. Tenbusch gezeigt [70].



**Abbildung 10: Transduktionsfähigkeit pseudotypisierter lentiviraler Partikel.** Lentivirale Partikel wurden mit den RSV Proteinen F, G, FΔ (RSV-F<sup>syn</sup>ΔCD13), GΔ (RSV-G<sup>syn</sup>ΔCD3) und den Influenza Proteinen HA und NA pseudotypisiert. Die Titer der Transduktion in HEK 293A Zellen wurde mindestens in Triplikaten ermittelt und bei Erreichen eines detektierbaren Titers in weiteren Transfektionen und Transduktionen erneut überprüft. Als Kontrolle dienten Partikel mit dem G-Oberflächenprotein des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G). Die Beschriftung gibt die jeweiligen Oberflächenproteine der untersuchten Partikel an. Die gestrichelte Linie stellt das Detektionslimit der Messung dar, welches 25 transduzierte Zellen pro ml beträgt. GFU/ml: grün fluoreszierende Einheiten (*green fluorescence units*). Es ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. VSV-G: n=3, F + G: n=3, FΔ: n=3, FΔ + GΔ: n=5, HA + NA: n=3, FΔ + HA: n=5.

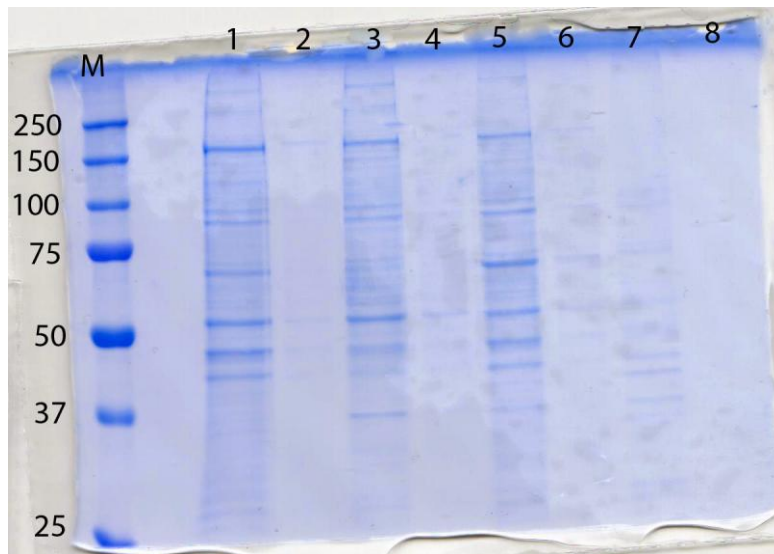
### 5.1.2 Produktion und Analyse der VLPs

Zur Vakzineentwicklung konnten bisher keine Virus-ähnlichen Partikel basierend auf dem Matrixprotein von RSV und den Oberflächenproteinen von RSV bzw. RSV und Influenza A hergestellt werden. Erstmals im Rahmen dieser Dissertation konnten mit Hilfe von kodon-optimierten und nachweislich stark exprimierenden Plasmiden verschiedene Kombinationen von Oberflächenproteinen auf VLPs basierend auf RSV-M erhalten werden.

Die VLPs wurden unter anderem mit Hilfe eines Proteingels und anschließender Coomassie-Färbung näher analysiert. In Abbildung 11 ist klar erkennbar, dass drei verschiedene VLP Präparationen nach Ultrazentrifugation (1;3;5 unverdünnt, 2;4;6 1:10 verdünnt) die RSV typische Proteinbanden bei ca. 150 kDa (F-Protein nicht reduzierend), ca. 90 kDa (G-Protein nicht reduzierend) zeigen und sogar noch schwach erkennbar ist eine Bande bei ca. 26 kDa (M-His-Protein nicht reduzierend). Die Spur 8 ist ohne Probe versehen worden. Die positive Kontrolle einer aufkonzentrierten RSV-A2 Probe ist hier mit einer Verdünnung von 1 zu 10 ebenfalls noch schwach erkennbar in Spur 7.



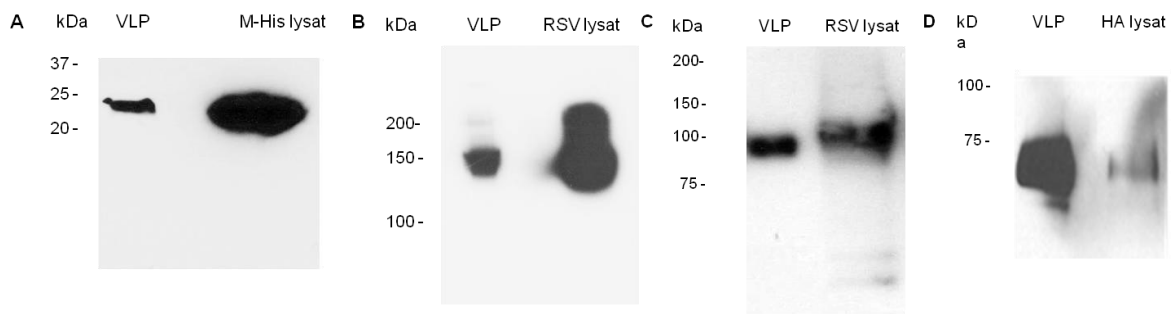
Es ist zudem eine Leiter mit vielen zellulären Proteinen nach der Färbung erkennbar, welche durch die Produktion der VLPs in einer Zelllinie zu erwarten sind.



**Abbildung 11: Protein Charakterisierung der VLP Vakzine mittels Coomassie-Färbung.**

Nach der Ultrazentrifugation wurden die VLP Präparationen lysiert und gleiche Proteinmengen mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurde eine Coomassie Färbung durchgeführt. Spur 1,3,5 enthält unverdünnte VLPs aus drei unterschiedlichen Präparationen. Die Spur 2,4,6 ist jeweils eine 1 zu 10 Verdünnung der VLPs aus 1,3 und 5. In Spur 7 ist RSV-A2 2 µg Gesamtprotein und 0,2 µg (Spur 8) aufgetragen. Die Proteingröße ist in kDa mittels Vergleich zu einem gefärbten Proteinstandard bestimmt worden.

Für VLPs mit RSV-F und RSV-G wurden die entsprechenden Plasmide in einem 1:1 Verhältnis eingesetzt. Allerdings musste für VLPs mit RSV-F und IVA-HA auf der Oberfläche das Verhältnis der zur Transfektion eingesetzten Plasmide variiert werden. Bei dem gezeigten Versuch wurden hierbei abschließend 10-fach mehr IVA-HA im Verhältnis zum RSV-F verwendet (RSV-M<sub>HIS</sub> (20 µg), IVA-HA (18 µg) und RSV-FACT3 (2 µg)).



**Abbildung 12: Protein Charakterisierung der VLP Vakzine mittels Western-Blot Analyse.**

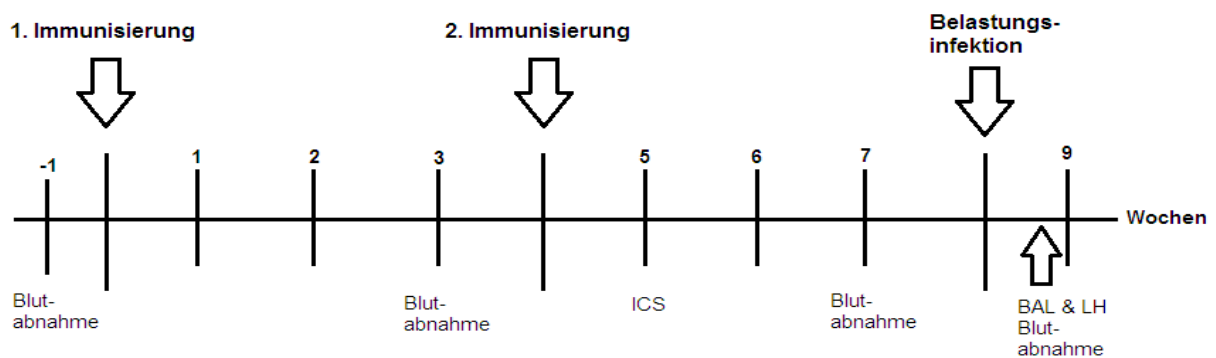
Nach der Ultrazentrifugation wurden die VLP Präparationen lysiert und gleiche Proteinmengen mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach einem Transfer auf Nitrozellulose konnten die Proteine mittels monoklonaler Antikörper detektiert werden. (A) His-Blot für RSV-M-His, (B) RSV-F-Blot, (C) RSV-G-Blot und (D) IVA-HA-Blot. Die Proteingröße ist in kDa mittels Vergleich zu einem gefärbten Proteinstandard bestimmt worden und angegeben.

In Abbildung 12 wurden die hergestellten VLPs mittels Western-Blot-Analyse auf ihren viralen Proteingehalt (RSV-M, RSV-F, RSV-G und IVA-HA) untersucht. Deutlich erkennbar ist dass alle Proteine in den exemplarisch gezeigten Western-Blot Analysen mittels spezifischer monoklonaler Antikörper detektiert werden konnten. Die jeweilige Kontrolle ist ebenfalls markiert und das Molekulargewicht in Kilodalton (kDa) mittels definiertem gefärbtem Proteinstandard ermittelt worden. In Abbildung 12 A ist bei ca. 26 kDa das RSV-M Protein mit His-Tag mittels His-Antikörper detektiert worden. In 12 B bei ca. 150 kDa das RSV-F mit einem monoklonalen Anti-F Antikörper und in 12 C bei ca. 90 kDa das RSV-G mit einem monoklonalen Anti-G Antikörper detektiert. In Abbildung 12 D wurde mit ca. 70 kDa das IVA-HA mit einem monoklonalen Anti-HA Antikörper nachgewiesen. Die Proteingrößen der Proteine in den VLPs entsprechen den Kontrollen und stimmen mit den publizierten Proteingrößen überein. Es wurde für jede der für Immunisierungen verwendeten VLP-Präparationen jeweils eine Protein-biochemische Analyse für die verwendeten Proteine durchgeführt, dessen Quantifizierung erfolgt für RSV-F mittels spezifischen RSV-F ELISA und zudem wurde eine Gesamtproteinbestimmung mittels Bradford-Test durchgeführt. Der Gesamtproteingehalt variierte von 300 µg/ml bis ca. 450 mg/ml bei einem RSV-F Gehalt von rund 60 mg/ml bis ca. 110 µg/ml je nach Präparation somit 20-25 % des Gesamtproteingehaltes.

Der Endotoxingehalt wurde mit Hilfe eines kommerziellen Endotoxin Detektions Kit (LAL) bestimmt und lag in allen verwendete Präparationen unterhalb der Vorgaben von 0,1 EU/Tier für die Immunisierung im Maustiermodell. Der Endotoxingehalt variierte kaum zwischen den verwendeten Präparationen von 0,02 bis 0,06 EU/Tier/Dosis.

## 5.2 Immunogenitätsanalyse *in vivo* der hergestellten Virus-ähnlichen Partikel im Maustiermodell

Die in 5.1 proteinbiochemisch und funktional (*in vitro*) charakterisierten VLPs wurden ebenfalls auf ihre immunogenen Eigenschaften als Vakzine im Maustiermodell analysiert. Hierzu wurde sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort in Mäusen untersucht und die Protektivität der Immunisierung mittels intranasaler Belastungsinfektion überprüft. Alle Immunisierungen wurden mit 6-8 Wochen alten weiblichen BALB/c-Mäusen durchgeführt. Sofern nicht anders beschrieben wurden jeweils zwei Immunisierungen intramuskulär (i.m.) bzw. sub cutan (s.c.) in einem Abstand von 4 Wochen vorgenommen (*Prime* und *Boost*-Impfung). Eine Belastungsinfektion erfolgte mit RSV bzw. IVA 4 Wochen nach der letzten Immunisierung intra nasal (i.n.)(siehe Abbildung 13). Bei Veränderungen des Immunisierungsablaufes ist dieses bei der jeweiligen Immunisierungsstrategie angegeben. Die Gruppengröße variierte von 5 bis 10 Tiere und die Tiere wurden in einzel-belüfteten Käfigen unter S2-Bedingungen gehalten.



**Abbildung 13: Schematischer Immunisierungsverlauf.**

Zu Beginn wurde den Mäusen 1 Woche vor der ersten Immunisierung Blut abgenommen. Die erste Immunisierung erfolgt in der Woche 0. Nach 3 Wochen wurde den Mäusen erneut Blut entnommen zur Bestimmung von humoralen Immunantworten nach einer Immunisierung. Die zweite Impfung erfolgt 4 Wochen nach der ersten. Nach einer weiteren Woche wurde bei einer Gruppe von Tieren eine intrazelluläre Zytokinfärbung (ICS *intracellulare cytokin staining*) von Milzlymphozyten durchgeführt. Die übrigen Tiere wurden erneut nach 3 Wochen Blut entnommen und 4 Wochen nach der zweiten Immunisierung erfolgte die Belastungsinfektion durch intranasale Applikation von RSV bzw. IVA. Die Sektion der Tiere mit Entnahme von Blut, Spülung der Lunge (Brochioalveolavage; BAL) und Lungenhomogenat erfolgte 5 (RSV) bzw. 6 Tage (IVA) nach Infektion.

### 5.2.1 Immunisierung von RSV-M basierten VLPs mit RSV-F und RSV-G

Die hergestellten VLPs mit Deletionskonstrukten für RSV-F und RSV-G auf der Oberfläche wurden in einer *Prime-Boost* Immunisierung auf ihre humorale Immunantwort im Vergleich zu exosomalen Partikeln, HIV-Gag mit Ovalbumin (Ova) als unspezifisches Antigen, HIV-Gag-Partikeln mit den verkürzten RSV-Oberflächenproteinen und zu VLPs mit Volllängeproteinen auf der Oberfläche untersucht. In Tabelle 3 sind die einzelnen Immunisierungsgruppen und die eingesetzten Proteinmengen angegeben.

Tabelle 3: Immunisierungsschema für zweimalige Immunisierung mit VLPs.

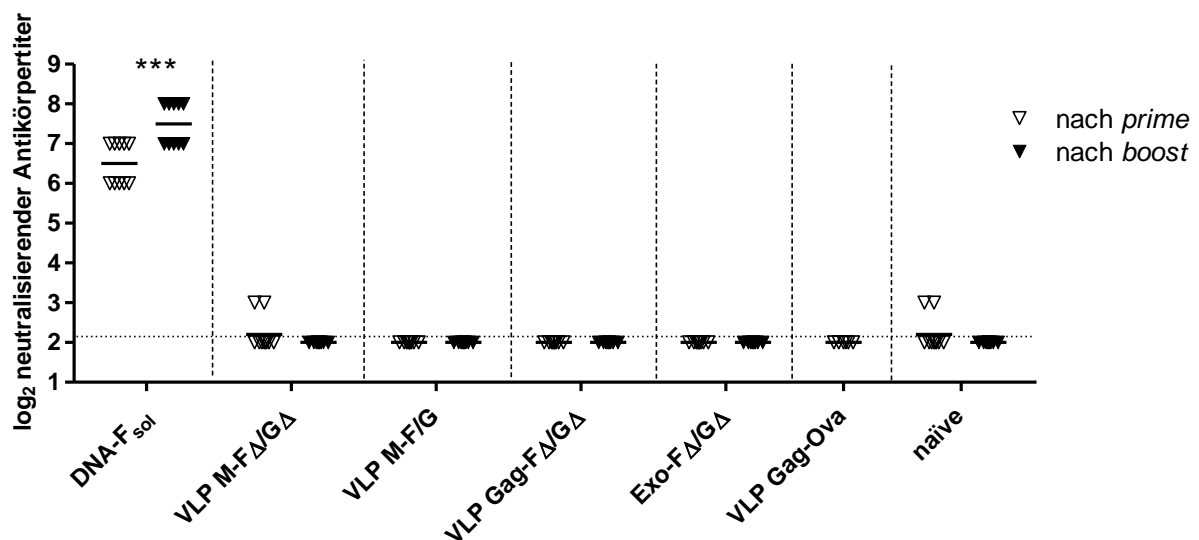
Dargestellt ist die Immunisierungsstrategie für die jeweiligen Gruppen mit n=6. Es wurden 20 µg DNA und mittels EP/i.m.=Elektroporation *intramuskulär* in den rechten und linken *Musculus quadriceps femoris* an beiden Oberschenkeln mit max. 40 µl Gesamtvolumen appliziert, 1 µg F-Protein bzw. 1 µg Ovalbumin in Form von VLPs wurden s.c.=*subcutan*, unter die Haut mit maximal 50 µl Gesamtvolumen je Immunisierung appliziert. Die i.n.=*intranasale* Gabe des Virus erfolgt in 50 µl NaCl-Lösung. IU= *infectious unit*.

Gruppe	1.Immunisierung	2.Immunisierung	Belastungsinfektion
naive	unvakziniert	unvakziniert	10 <sup>6</sup> IU RSV A2 i.n.
DNA-F <sub>sol</sub>	DNA-F <sub>sol</sub> EP/i.m.	DNA-F <sub>sol</sub> EP/i.m.	10 <sup>6</sup> IU RSV A2 i.n.
VLP M-FΔ/GΔ	M-FΔ/GΔ-VLP s.c.	M-FΔ/GΔ-VLP s.c.	10 <sup>6</sup> IU RSV A2 i.n.
VLP M-F/G	M-F/G-VLP s.c.	M-F/G-VLP s.c.	10 <sup>6</sup> IU RSV A2 i.n.
VLP Gag-FΔ/GΔ	Gag-FΔ/GΔ-VLP s.c.	Gag-FΔ/GΔ-VLP s.c.	10 <sup>6</sup> IU RSV A2 i.n.
Exo FΔ/GΔ	FΔ/GΔ-Exosomen s.c.	FΔ/GΔ-Exosomen s.c.	10 <sup>6</sup> IU RSV A2 i.n.
VLP Gag-Ova	unvakziniert	Gag-Ova-VLP s.c.	10 <sup>6</sup> IU RSV A2 i.n.

Die Applikation der Partikel erfolgte zweimalig im Abstand von vier Wochen, jeweils nach drei Wochen wurde Blut entnommen und ein Neutralisationstest durchgeführt. In dieser Immunisierungsstudie sollen die unterschiedlichen Partikelpräparationen verglichen werden. Zum einen wurden die neuartigen RSV-M-VLPs mit etablierten HIV-Gag-Partikeln verglichen, als auch Exosomen ohne Matrixprotein auf ihre Wirksamkeit untersucht. Als Kontrollimmunisierung wird die bereits publizierte [61] zweimalige Applikation von Plasmid-DNA, welche für eine lösliche Form des RSV-F kodiert, verwendet.

Es ist deutlich erkennbar (Abbildung 14), dass lediglich die bereits gut etablierte Immunisierung mit RSV-F exprimierender Plasmid-DNA zu einer hohen Anzahl neutralisierender Antikörper im Serum der Mäuse führt. Das ist sowohl nach der Erstimmunisierung (*Prime*) als auch nach der zweiten Immunisierung (*Boost*) erkennbar. Die  $IC_{50}$  (*Inhibitory concentration of 50 % virus infection reduction*) liegt hierbei bei  $2^7-2^8$ . Alle übrigen getesteten Gruppen konnten keine oder nur sehr geringe detektierbare neutralisierende Antikörper entwickeln.

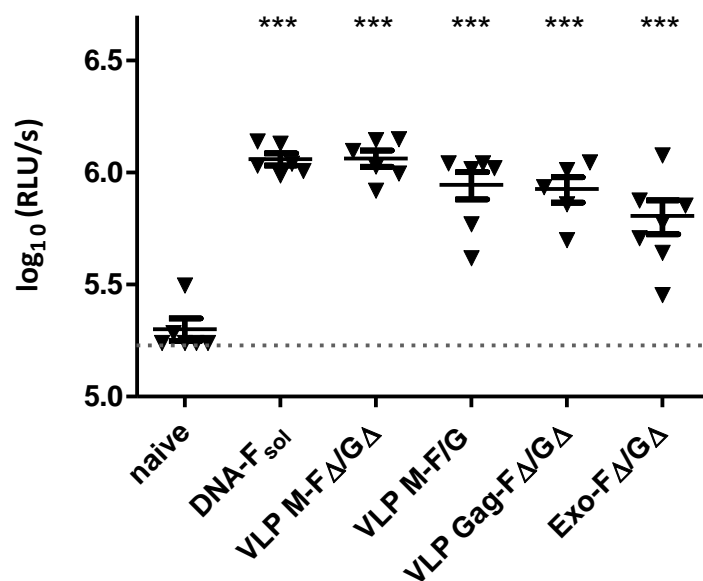
Auch die Menge und das Verhältnis von bindenden IgG1 und IgG2a war in allen Gruppen vergleichbar (Daten siehe Anhang Abbildung 34). Das Verhältnis zwischen IgG1 und IgG2a war in allen vakzinieren Gruppen ausgeglichen mit einem Faktor um 1. Die bindenden IgG1 und IgG2a Antikörper wurden für eine Gesamtviruspräparation aus einer Zellkultur bestimmt. Hieraus ergibt sich die Problematik, dass auch Antikörperantworten auf zelluläre Bestandteile oder Mediumbestandteile detektiert werden. Diese haben im Neutralisationstest kaum Einfluss (siehe Gruppe VLP Gag-Ova) und somit wurde im weiteren Verlauf die humorale Immunantwort vorwiegend mittels Neutralisationstest bestimmt.



**Abbildung 14: RSV spezifische neutralisierende Antikörper mittels Neutralisationstest.** Das isolierte Serum wurde mittels Neutralisationstest und der Ermittlung der Inhibitionskonzentration von 50 % ( $IC_{50}$ ) analysiert. Es ist die jeweilige Verdünnung des Serums angegeben, bei der noch max. 50 % der Infektionsereignisse durch das verwendete rgRSV sichtbar waren. Die entsprechende Vakzinierung ist jeweils angegeben. Hierbei ist eine *Prime-Boost* Immunisierung im Abstand von 4 Wochen durchgeführt worden. Die gestrichelte Linie stellt das Detektionslimit der Messung dar, welches die geringste eingesetzte Verdünnung darstellt. Gezeit ist jedes einzelne Tier jeder Gruppe und die dazugehörigen Mittelwerte angegeben. \*\*\*= $p < 0.001$  paired T-Test im Vergleich zum Serum nach Erstimmunisierung.  $n=6$ .

Vier Wochen nach der zweiten Immunisierung mit den verschiedenen Partikeln wurde eine Belastungsinfektion mit RSV durchgeführt. Fünf Tagen nach der RSV-Infektion wurden die Mäuse euthanasiert und die benötigten Proben entnommen. Am Tag der Infektion und den darauf folgenden Tagen nach der Infektion wurde das Gewicht und der Gesundheitszustand der Mäuse täglich kontrolliert und es zeigten sich hierbei keine signifikanten Unterschiede zwischen den analysierten Gruppen und der Kontrollgruppe.

Die mukosalen Antikörper in der BAL wurden für den Subtyp IgA gegen RSV bestimmt. Es ist deutlich erkennbar, dass alle immunisierten Gruppen eine deutliche Induktion von IgA in der BAL aufweisen. Die Unterschiede zur unvakzinierten Gruppe sind signifikant. Bei den Unterschieden zwischen den verschiedenen Vakzinen ist jedoch lediglich ein Trend zu erkennen. VLPs M-F $\Delta$ /G $\Delta$  haben eine vergleichbar hohe Induktion von IgA Antikörpern in der BAL wie die zweimalig mit DNA F<sub>sol</sub> immunisierten Mäuse. Alle weiteren vakzinierten Tieren zeigten geringfügig weniger RSV-spezifische IgA Antikörper mittels ELISA.

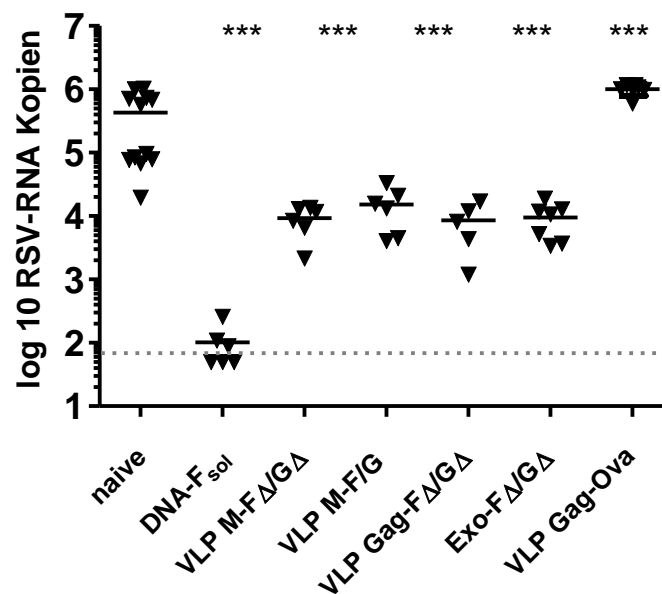


**Abbildung 15: IgA Antikörper auf RSV-Viruspräparation mittels ELISA.**

Die isolierte BAL nach der Belastungsinfektion wurde mittels RSV-spezifischem IgA ELISA untersucht. Es wurden mittels Lumineszenz RLU/s (Relative Lichteinheiten/s) gemessen. Die entsprechende Vakzinierung ist jeweils angegeben. Hierbei ist eine *Prime-Boost* Immunisierung im Abstand von 4 Wochen durchgeführt worden. Die gestrichelte Linie stellt das Detektionslimit der Messung dar. Es ist der Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. \*\*\*= $p < 0.05$  One-Way-ANOVA mit Tukey-Posttest im Vergleich zur unvakzinierten Kontrollgruppe.  $n=6$ .

Die RSV-Viruslast in der bronchioalveolären Flüssigkeit (BAL) und im Lungenhomogenat wurde ebenfalls analysiert.

Die Viruslast in der BAL war im Vergleich zu den Lungenhomogenaten ca. 5-10fach geringer. Die Unterschiede von BAL und Lungenhomogenat zwischen den immunisierten und der nicht vakzinierten Gruppe waren identisch. Man erkennt deutlich, dass die Gruppe mit DNA F<sub>sol</sub> immunisierten Tieren eine Reduktion der Viruslast bis nahe dem Detektionslimit zeigt. Die Reduktion der RSV-RNA Kopien betrug ca. 10-20 fach im Mittel bei den mit unterschiedlichen Partikeln immunisierten Tieren. Die unvakzinierte Kontrollgruppe ist aus zwei unabhängigen Immunisierungen kombiniert, daraus ergibt sich eine Gruppe von 6 Tieren, welche eine ca. 10-fache höhere Virusbelastung zeigen, ebenfalls wie die VLP Gag-Ova-Gruppe (gleiches Experiment). In diesen zwei Gruppen von 6 Tieren wurde eine andere Viruspräparation verwendet und eine höhere Virusbelastung im Lungenhomogenat der Tiere nachgewiesen. Die Gruppe VLP Gag-Ova dient zur Verdeutlichung, dass es kaum Einfluss auf die Analyse der neutralisierenden Antikörper mittels Neutralisationstest und die Viruslast durch die Antikörperantworten auf zelluläre Bestandteile der Präparationen gibt. Zwischen den verschiedenen Partikelvakzinen gab es keine signifikanten Unterschiede in der Virusbelastung von Lunge (Abbildung 16) und BAL (Anhang Abbildung 42).



**Abbildung 16: RSV-Viruslast mittels RSV-spezifischer q-RT-PCR nach Belastungsinfektion.**

Die isolierte RNA aus dem Lungenhomogenat der Mäuse wurde mittels RT-PCR analysiert. Die entsprechende Vakzinierung ist jeweils angegeben. Hierbei ist eine *Prime-Boost*-Immunisierung im Abstand von 4 Wochen durchgeführt worden. Die gestrichelte Linie stellt das Detektionslimit der Messung dar, welches 50 Kopien beträgt. Die unvakzinierte Kontrollgruppe ist aus zwei unabhängigen Immunisierungen, welche eine ca. 10-fache höhere Virusbelastung zeigt, ebenfalls wie die VLP Gag-Ova-Gruppe. In diesen zwei Gruppen wurde eine andere Viruspräparation verwendet. Es sind die Einzelisolate und die Mittelwerte gezeigt. \*\*\*= $p < 0.05$  One-Way-ANOVA mit Tukey-Posttest im Vergleich zur unvakzinierten Kontrollgruppe.  $n=6$ .

Mit Hilfe der *Spearman*-Korrelation konnte keine direkte Korrelation der erhaltenen Ergebnisse zur Virusbeladung in der Lunge und der BAL in Beziehung zu den gemessenen Titern an neutralisierenden Antikörpern in den Seren gezeigt werden. Es konnte ein Trend berechnet werden, dass bindende IgA-Antikörper einen Effekt auf die Virusbeladung der BAL, aber kaum auf die Lunge erzeugen.

Zur weiterführenden Charakterisierung der eingesetzten VLPs im Maustiermodell wurde im Folgenden ein Vergleich zu mit Formalin-inaktivierten RSV (FI-RSV) Viruspartikeln durchgeführt. Vergleichbare inaktivierte Viruspartikel wurden auch im Jahre 1967 für die klinische Studie in Kleinkindern verwendet und zeigten hier einen deutlich verstärkten Krankheitsverlauf, nach einer nachfolgenden natürlichen RSV-Infektion.

### **5.2.2 Charakterisierung der Immunantwort von VLPs im Vergleich zu inaktiviertem RSV**

Der Vergleich der funktionalen VLPs mit inaktivierten Viruspartikeln ist von entscheidender Bedeutung. Eine Impfung mit FI-RSV zeigte wie bereits erläutert bei einer klinischen Studie in vakzinierten Kleinkindern einen verstärkten Krankheitsverlauf bei folgender natürlicher RSV Infektion. Eine Reihe von Faktoren, die für den erschwerten Krankheitsverlauf ursächlich sind, wurden in weiteren Forschungsarbeiten herausgearbeitet. Unter anderem führte eine dominierende  $T_H2$ -Antwort mit einer unzureichenden B-Zellreifung zu den pathologischen Symptomen bei den vakzinierten Kindern [112]. Die hergestellten VLPs sollen keine Erhöhung der Pathogenität der RSV Infektion vermitteln. Des Weiteren sind Adjuvantien (hier: Aluminiumhydroxid; Alum) weiterhin mit ihren potenziellen Risiken in Kombination mit VLPs zu untersuchen.



**Tabelle 4: Immunisierungsschema für Immunisierung mit VLPs.**

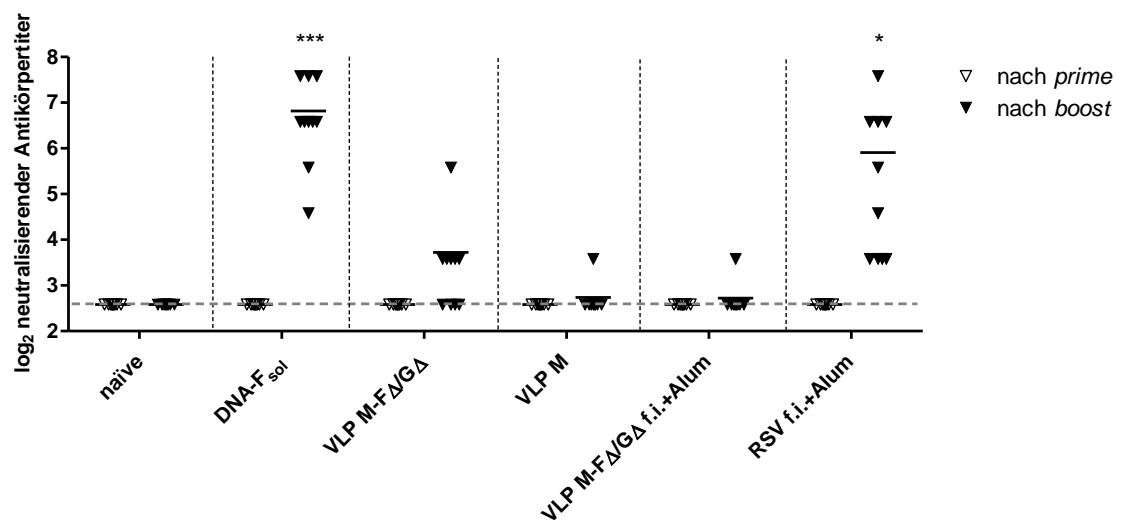
Dargestellt ist die Immunisierungsstrategie für die jeweiligen Gruppen mit n=6. Es wurden 20 µg DNA per EP/i.m.=Elektroporation *intramuskulär* in den rechten und linken *Musculus quadriceps femoris* an beiden Oberschenkeln mit max. 40 µl Gesamtvolumen appliziert, Es wurde 1 µg F-Protein in der VLP-Gruppe verwendet und 2µg Gesamtprotein (ca. 500 ng F-Protein) in den f.i. Gruppen i.n.=*intranasale* Gabe des Virus in 50 µl NaCl-Lösung. IU= *infectious unit*.

Gruppe	1.Immunisierung	2.Immunisierung	Belastungs- infektion
naive	unvakziniert	unvakziniert	10 <sup>6</sup> IU RSV i.n.
DNA-F <sub>sol</sub>	DNA-F <sub>sol</sub> EP/i.m.	DNA-F <sub>sol</sub> EP/i.m.	10 <sup>6</sup> IU RSV i.n.
VLP M-FΔ/GΔ	M-FΔ/GΔ-VLP i.m.	M-FΔ/GΔ-VLP i.m.	10 <sup>6</sup> IU RSV i.n.
VLP M	M-VLP i.m.	M-VLP i.m.	10 <sup>6</sup> IU RSV i.n.
VLP M- FΔ/GΔ f.i. + Alum	VLP M- FΔ/GΔ f.i. + Alum i.m.	VLP M- FΔ/GΔ f.i. + Alum i.m.	10 <sup>6</sup> IU RSV i.n.
RSV A2 f.i. + Alum	RSV A2 f.i. + Alum i.m.	RSV A2 f.i. + Alum i.m.	10 <sup>6</sup> IU RSV i.n.

Tabelle 5 zeigt das verwendete Immunisierungsschema. Bei der Herstellung von FI-RSV-Viruspartikel und Formalin inkubierten VLPs wurde das Verfahren aus der Literatur verwendet [113] und die Proteinkonzentration mittels Bradford bestimmt. Der Zusatz des Adjuvans Aluminiumhydroxid (Alum) erfolgte ebenfalls laut Protokoll im Verhältnis zur eingesetzten Proteinmenge. Die verwendeten VLPs wurden in der zweimaligen Immunisierung auch ohne Adjuvants eingesetzt. Die neutralisierenden Antikörper wurden nach der ersten und zweiten Immunisierung bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass nach der zweiten Immunisierung sowohl bei der DNA F<sub>sol</sub>-Gruppe als auch bei den mit inaktiviertem RSV geimpften Tieren eine deutliche Immunantwort mit neutralisierenden Antikörpern im Serum erzielt wurde.

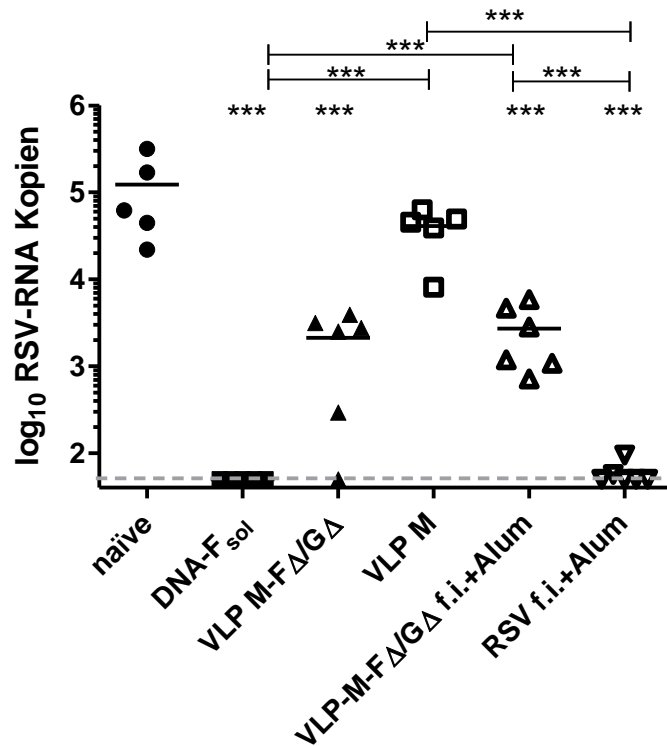
Die verwendeten VLPs zeigen in Kombination mit Formalin und Alum als Adjuvans keine signifikanten neutralisierenden Antikörper. Eine leichte Reaktion konnte mit VLPs ohne Zusatz erzeugt werden. Die neutralisierenden Antikörper weisen einen mäßigen Titer auf und sind in 6 von 10 Tieren detektierbar. Für die Gruppe, welche M-Partikel ohne Oberflächenproteine erhalten hat, ist keine Steigerung der neutralisierenden Antikörper nach der Erst-oder Zweitimmunisierung sichtbar. Dieses zeigt erneut, dass die neutralisierenden Antikörper vorwiegend gegen die Hauptantigene RSV-F und RSV-G gerichtet sind und im Neutralisationstest die induzierten Antikörper gegen zelluläre Bestandteile keinen messbaren Einfluss haben.



**Abbildung 17: RSV spezifische neutralisierende Antikörper mittels Neutralisationstest.** Das isolierte Serum wurde mittels Neutralisationstest und der Ermittlung der Inhibitionskonzentration von 50 % (IC<sub>50</sub>) analysiert. Es ist die jeweilige Verdünnung des Serums angegeben, bei der noch max. 50 % der Infektionsereignisse durch das verwendete rgRSV sichtbar waren. Die entsprechende Vakzinierung ist jeweils angegeben (f.i.= Formalin inaktiviert/inkubiert, Alum=Aluminiumhydroxid). Hierbei ist eine zweimalige Immunisierung im Abstand von 4 Wochen durchgeführt worden. Die gestrichelte Linie stellt das Detektionslimit der Messung dar, welches die geringste eingesetzte Verdünnung darstellt. Es ist der Mittelwert angegeben. Paired T-Test im Vergleich zum entsprechenden *Prime*-Serum \*\*\*= $p < 0.001$ , \*= $p < 0.05$ . n=10.

Fünf Tage nach der *intra nasalen* Belastungsinfektion mit RSV wurden sowohl in dem Lungenhomogenat als auch in der BAL die RSV-RNA Kopienzahl mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Die Viruslast im Lungenhomogenat konnte in allen vakzinierten Gruppen signifikant zur naiven Kontrollgruppe gesenkt werden. Es ist eine ca. 100-fache Reduktion der Viruslast bei den verabreichten VLPs erzielt worden. Hierbei gibt es keinen erkennbaren Unterschied, ob diese zuvor mit Formalin inkubiert und mit Aluminiumhydroxid versetzt wurden.

Eine Reduktion der Viruslast bis zum Detektionslimit ist bei der DNA  $F_{sol}$  und bei inaktiviertem RSV f.i.+Alum sichtbar (Abbildung 18). Die VLPs ohne Oberflächenproteine vermittelten keine signifikante Reduktion der Viruslast in den vakzinierten Tieren.

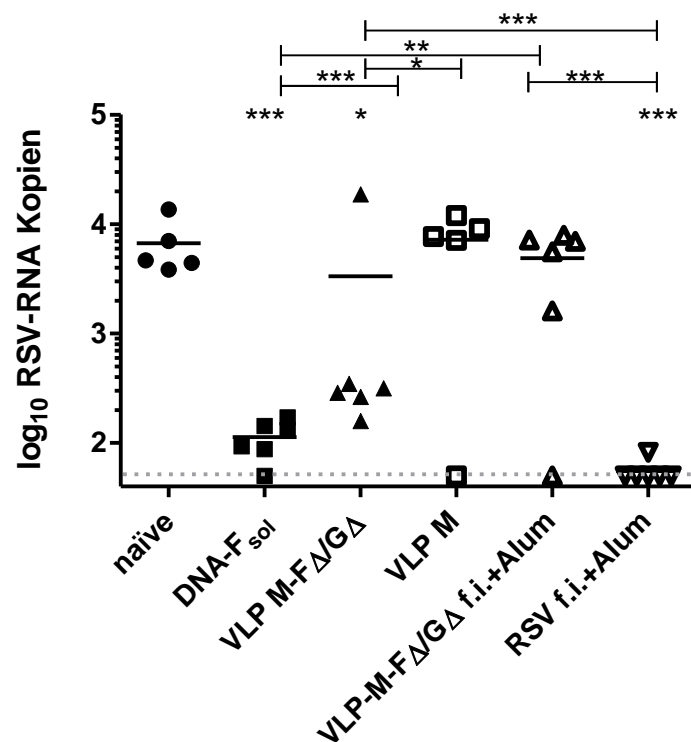


**Abbildung 18: RSV-Viruslast mittels RSV-spezifischer q-RT-PCR nach Belastungsinfektion.** Die isolierte RNA aus dem Lungenhomogenat wurde mittels q-RT-PCR über SybrGreen® und einem RNA Standard quantifiziert. Die entsprechende Vakzinierung ist jeweils angegeben (f.i.= Fomalin inaktiviert/inkubiert, Alum=Aluminiumhydroxid). Hierbei ist eine *Prime-Boost* Immunisierung im Abstand von 4 Wochen durchgeführt worden. Die gestrichelte Linie stellt das Detektionslimit der Messung dar, welches 50 Kopien beträgt. Es ist der Mittelwert angegeben. \*\*\*= $p < 0.05$  One-Way-ANOVA mit Tukey-Posttest im Vergleich zur unvakzinierten naiven Kontrollgruppe und den jeweils markierten.  $n=6$ , naive Gruppe  $n=5$ .

Die Kopienzahlen in der BAL zeigen ebenfalls eine Reduktion der Viruslast in diesen beiden Gruppe bis nahe dem Detektionslimit. Im Unterschied zu den RNA-Kopien im Lungenhomogenat sind in der BAL deutliche Unterschiede zwischen den VLP-Präparationen zu erkennen. Die signifikante Reduktion der Viruslast durch unbehandelte VLPs im Vergleich zu der VLP f.i.+Alum Gruppe wurde klar herausgestellt. In diesen beiden Gruppen gibt es je ein Tier, das in der BAL eine zu den anderen Tieren der Gruppe unterschiedliche RSV-RNA Kopienzahl besitzt und kann somit als Ausreißer eingestuft werden. Der Vergleich von VLPs mit inaktiviertem RSV zeigt deutlich, dass die VLPs kaum Schutz induzieren.

Es gab keine Unterschiede im Gewichtsverlauf (Daten nicht gezeigt) oder eine erhöhte Viruslast in der BAL oder dem Lungenhomogenat. Mit Hilfe der *Spearman*-Korrelation konnte keine eindeutige Korrelation der erhaltenen Ergebnisse für die formalin inaktivierten RSV-Viruspartikel bei der Virusbeladung in der Lunge und der BAL in Beziehung zu den gemessenen Titern an neutralisierenden Antikörpern in den Seren gezeigt werden.

Im Folgenden sollte die Immunantwort der VLPs mittels Erstimmunisierung mit rekombinantem RSV-F-Protein weiter gesteigert werden und eine zelluläre Immunantwort induziert werden.



**Abbildung 19: RSV-Viruslast mittels RSV-spezifischer q-RT-PCR nach Belastungsinfektion.** Die isolierte RNA aus der BAL wurde mittels q-RT-PCR über SybrGreen<sup>®</sup> und einem RNA Standard quantifiziert. Die entsprechende Vakzinierung ist jeweils angegeben (f.i.= Fomalin inaktiviert/inkubiert, Alum=Aluminiumhydroxid). Hierbei ist eine *Prime-Boost* Immunisierung im Abstand von 4 Wochen durchgeführt worden. Die gestrichelte Linie stellt das Detektionslimit der Messung dar, welches 50 Kopien beträgt. Es ist der Mittelwert angegeben. \*\*\*= $p < 0.05$  One-Way-ANOVA mit Tukey-Posttest im Vergleich zur unvakziniserten naiven Kontrollgruppe und den jeweils markierten.  $n=6$ , naive Gruppe  $n=5$ .

### 5.2.3 Immunisierung von VLPs nach Erstimmunisierung mit rekombinantem RSV-F-Protein

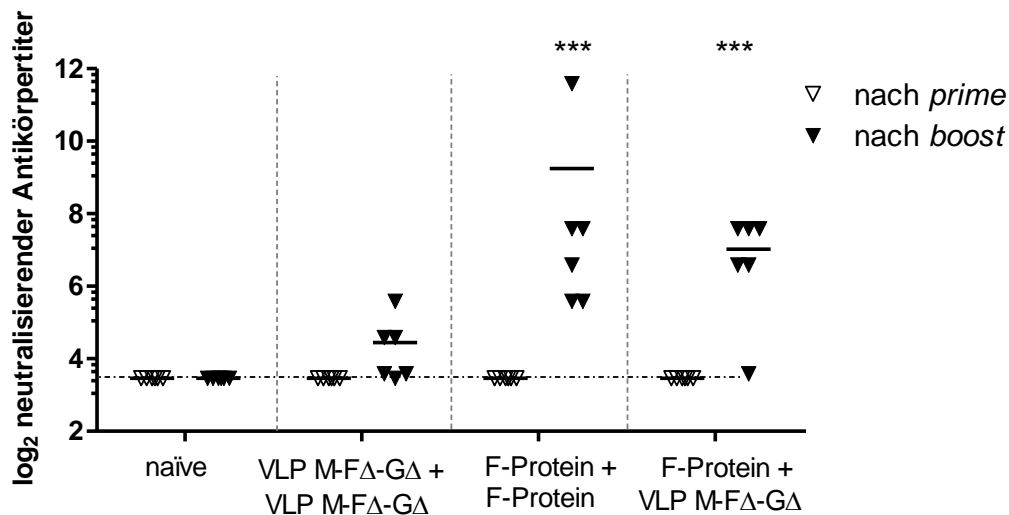
Es wurde eine *Prime-Boost* Immunisierung, bei der mit F-Protein, welches mit Aluminiumhydroxid versetzt wurde, die erste Immunisierung durchgeführt. Es wurde wie bei den vorherigen Immunisierungen im vier Wochen Abstand immunisiert und anschließend die RSV Belastungsinfektion durchgeführt. Das Immunisierungsschema ist in Tabelle 5 dargestellt.

**Tabelle 5: Immunisierungsschema für *Prime-Boost* Vakzinierung mit VLPs nach RSV-F Protein Immunisierung.**

Dargestellt ist die Immunisierungsstrategie für die jeweiligen Gruppen mit n=6. Es wurde in Protein-VLP 1 µg F-Protein+Alum und 1 µg F-Protein als VLP bzw. 5 µg F-Protein+Alum und 1 µg F-Protein+Alum oder nur 1 µg F-Protein als VLPs in max. 50 µl Gesamtvolumen *intramuskulär* (i.m.) appliziert, Es wurde 1 µg F-Protein in der VLP-Gruppe verwendet. i.n.=*intranasale* Gabe des Virus in 50 µl NaCl-Lösung. IU= *infectious unit*.

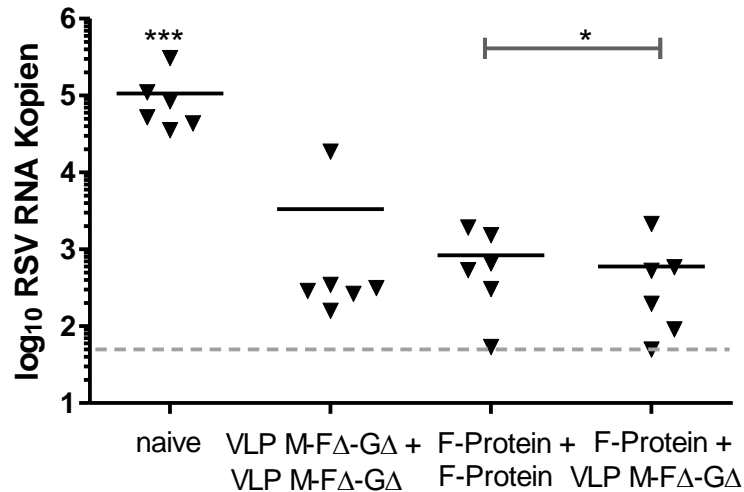
Gruppe	1.Immunisierung	2.Immunisierung	Belastungs- infektion
naive	unvakziniert	unvakziniert	10 <sup>6</sup> IU RSV i.n.
VLP M-FΔ/GΔ+ VLP M-FΔ/GΔ	VLP M-FΔ/GΔ i.m.	VLP M-FΔ/GΔ i.m.	10 <sup>6</sup> IU RSV i.n.
F-Protein+ F- Protein	F-Protein + Alum i.m.	F-Protein + Alum i.m.	10 <sup>6</sup> IU RSV i.n.
F-Protein+ VLP M-FΔ/GΔ	F-Protein + Alum i.m.	VLP M-FΔ/GΔ i.m.	10 <sup>6</sup> IU RSV i.n.

Der Titer an neutralisierenden Antikörpern als ein Parameter der humoralen Immunantwort wurde im Serum mittels Neutralisationstest unter Verwendung des grün fluoreszierenden RSV (rgRSV) durchgeführt. Es wurden nach der Erstimmunisierung in keiner Gruppe neutralisierende Antikörper detektiert.



**Abbildung 20: RSV spezifische neutralisierende Antikörper mittels Neutralisationstest.** Das isolierte Serum wurde mittels Neutralisationstest und der Ermittlung der Inhibitionskonzentration von 50 % ( $IC_{50}$ ) analysiert. Es ist die jeweilige Verdünnung des Serums angegeben, bei der noch max. 50 % der Infektionsereignisse durch das verwendete rgRSV detektiert wurden. Die entsprechende Vakzinierung ist jeweils angegeben. Hierbei ist eine *Prime-Boost* Immunisierung im Abstand von 4 Wochen durchgeführt worden. Die gestrichelte Linie stellt das Detektionslimit der Messung dar, welches die geringste eingesetzte Verdünnung darstellt. Es ist der Mittelwert angegeben. \*\*\*= $p < 0.001$  Paired T-Test im Vergleich zum Serum nach Erstimmunisierung.  $n=6$ .

Die signifikante Steigerung des Antikörpertiters drei Wochen nach durchgeführter Zweitimmunisierung wurde sowohl durch die erneute Gabe von F-Protein mit Aluminiumhydroxid, als auch durch die Impfung mit VLPs ohne Adjuvans ausgelöst. Die verabreichte Menge an F-Protein war 5-fach höher, bezogen auf den F-Protein Gehalt der VLPs. Durch die Erstimmunisierung mit F-Protein und der Verstärkung durch die VLPs wurde im Vergleich zur zweimaligen VLP Impfung eine deutliche Steigerung des Titers neutralisierender Antikörper ausgelöst (siehe Abbildung 20).

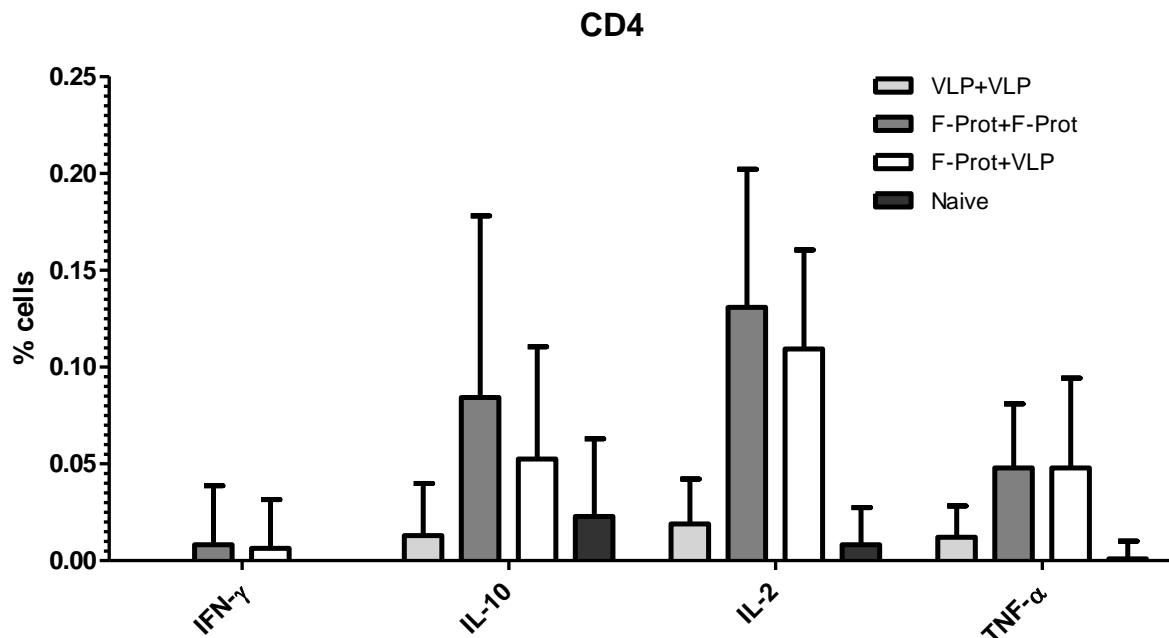


**Abbildung 21: RSV-RNA Kopienzahl mittels RSV-spezifischer q-RT-PCR nach 1. Boost Immunisierung.** Die isolierte RNA aus dem Lungenhomogenat wurde mittels q-RT-PCR über SybrGreen® und einem RNA Standard quantifiziert. Die entsprechende Vakzinierung ist jeweils angegeben. Hierbei ist eine *Prime-Boost* Immunisierung im Abstand von 4 Wochen durchgeführt worden. Die gestrichelte Linie stellt das Detektionslimit der Messung dar, welches 50 Kopien beträgt. Es ist der Mittelwert angegeben. \*\*\*= $p < 0.05$  One-Way-ANOVA mit Turkey-Posttest im Vergleich zu allen Gruppen.  $n=6$ .

In Abbildung 21 wird deutlich, dass die Viruslast im Lungenhomogenat aller immunisierter Mäuse reduziert wurde. Des Weiteren wurde eine signifikante Reduktion der RNA Kopien durch eine Zweitimmunisierung mit VLPs im Vergleich zu einer zweimaligen F-Protein Impfung erzielt. Die Kopienzahl der Gruppe F-Protein + VLP M-FΔ-GΔ war nah am Detektionslimit und somit 10-fach geringer als in der zweimalig mit rekombinantem RSV-F Protein immunisierter Gruppe. Die zweimalige Vakzinierung mit VLPs zeigte eine geringe Reduktion zur unvakzinierter Kontrollgruppe. Ein vergleichbares Verhältnis wurde auch in der BAL festgestellt.

Es gab keine Unterschiede im Gewichtsverlauf (Daten nicht gezeigt). Für die Immunisierungsstrategie mit zweimaliger VLP-Impfung und F-Protein-VLP-Immunisierung wurden auch im Vergleich zur zweimaligen F-Protein-Impfung die zellulären Immunantworten der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen untersucht. Mit Hilfe von spezifischen RSV-F-Peptiden wurden die Splenozyten der immunisierten Tiere nach der zweiten Impfung restimuliert und mittels intrazellulärer Zytokinfärbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern im FACS analysiert. In Abbildung 20 ist klar ersichtlich, dass es zu einer Steigerung der IL-10, IL-2 und TNF-α exprimierenden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen nach der zweiten Impfung kommt. Die Expression von Zytokinen durch CD4<sup>+</sup>-Zellen in der Milz der Mäuse zeigt, dass eine Protein-VLP Impfung einen positiven Effekt auf die virus-spezifische zelluläre Immunantwort auslöst.

Die F-Peptid stimmulierten Kontrolltiere zeigen keine Erhöhung an Zytokin-exprimierenden CD4<sup>+</sup>-Zellen. Die jeweilige unstimulierte Kontrolle der einzelnen Proben der Tiere ist vor der Auswertung abgezogen worden, so das lediglich die Differenz in der Abbildung dargestellt ist.

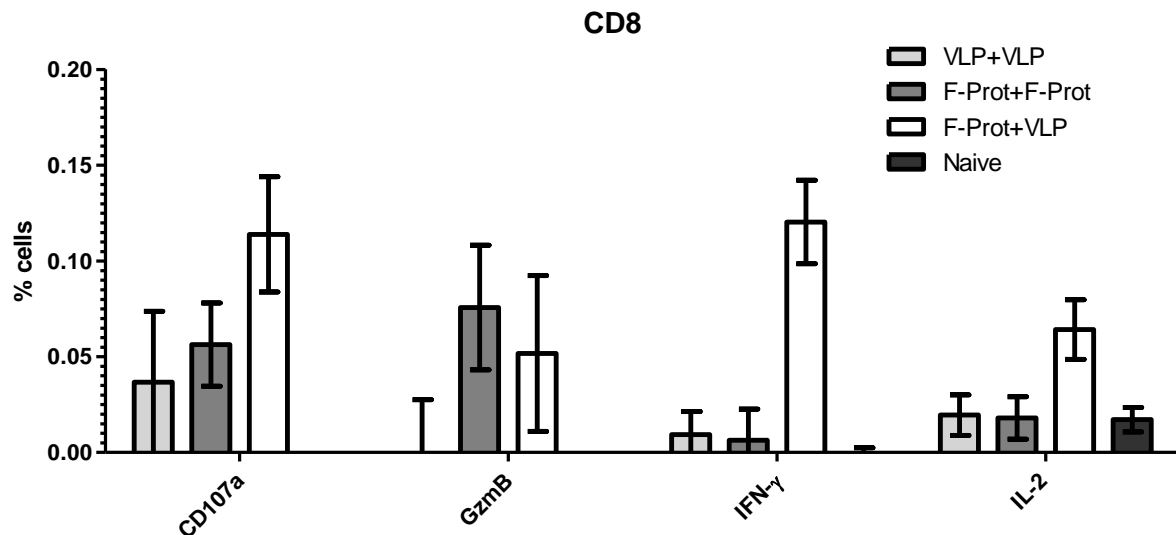


**Abbildung 22: Zytokinexpression von CD4<sup>+</sup>-Zellen aus der Milz mittels FACS Analyse 7 Tage nach zweiter Immunisierung.** Die isolierten Splenozyten wurden F-Peptiden stimuliert und mittels intrazellulärer Zytokinfärbung mit Fluoreszenz markierten Antikörpern gefärbt und mittels FACS analysiert. Dargestellt sind die Prozent CD4<sup>+</sup>- Splenozyten die das jeweilige Zytokin nach Peptidstimulation (6 h) exprimieren. Unstimulierte Proben wurden von den spezifisch stimulierten Proben abgezogen. n=4

Ebenfalls wurde in der *Prime-Boost* Gruppe von F-Protein-VLP die deutlichste Erhöhung an Zytokin exprimierenden CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ausgelöst. Hierbei wurde die Expression des Degranulierungsmarker CD107a, als auch der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-2 und Granzym B durch die CD8<sup>+</sup>-Zellen nach der erfolgten spezifischen RSV-F-Peptid Restimulation erhöht. Hierbei ist eine deutliche Verstärkung im Vergleich zur zweimaligen Vakzinierung mit rekombinantem RSV-F-Protein erkennbar, bei der eine 5-fach höhere Dosierung verwendet wurde.

Die humoralen und zellulären Immunantworten der Protein-VLP Vakzinierung zeigen deutlich, dass mit Hilfe der Erstimpfung eine gute zelluläre Immunantwort ausgelöst wird, welche im weiteren Verlauf einen positiven Effekt auf die humorale Immunantwort nach der zweiten Impfung ausübt.





**Abbildung 23: Zytokinstatus von CD8<sup>+</sup>-Zellen aus der Milz nach F-Peptidstimulation und Analyse mittels FACS 7 Tage nach zweiter Immunisierung.** Die isolierten Splenozyten sind mit RSV-F-Peptiden restimuliert und es ist anschließend mittels intrazellulärer Zytokinfärbung mit Fluoreszenz markierten Antikörpern gefärbt und mittels FACS analysiert worden. Dargestellt sind die Prozent der CD8<sup>+</sup>- Splenozyten die das entsprechende Zytokin nach Peptidstimulation (6 h) mit RSV-F-Peptiden exprimieren. n=4.

Mittels *Spearman*-Korrelation konnte keine direkte Korrelation der erhaltenen Werte zur Virusbelastung in der Lunge und der BAL in Beziehung zu den gemessenen Titern an neutralisierenden Antikörpern in den Seren gezeigt werden. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass die RNA Kopien in der Lunge und der BAL nahezu vollständig mit einander korrelieren.

Im Weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde eine weitere Variation der Erstimmunisierung in Kombination mit den hergestellten VLPs untersucht, welche eine deutliche zelluläre Immunantwort auslöst. Hierfür wurde die bereits in der Arbeitsgruppe charakterisierte DNA-Impfung von codon-optimierter Plasmid-DNA ausgewählt.

### 5.2.3 Boost-Immunisierung von VLPs nach Erstimmunisierung mit DNA

Es zeigte sich in der vorangegangenen Immunisierungsstudie, dass eine deutliche Verbesserung der humoralen Immunantwort im Bereich der neutralisierenden Antikörper durch eine Erstimmunisierung mit RSV-F Protein induziert werden konnte. Somit wurde weiterhin die Steigerung der Immunogenität der verwendeten VLPs nach einer Erstimmunisierung mit DNA untersucht.

Die DNA, welche mittels Elektroporation in die Muskelzellen eingeschleust wurde, führt zu einer Expression des auf dem Plasmid kodierten Proteins direkt durch die Muskelzellen. Somit wird das Protein über einen langanhaltenden Zeitraum gebildet und löst eine deutliche spezifische Immunreaktion auf das gebildete Protein aus. Um diese Möglichkeit der Modulation der Immunantwort der VLPs weiter zu untersuchen, wurden hierzu in der folgenden Vakzinierungsstudie verschiedene Kombinationen an Plasmid-DNA verwendet. Diese kodieren für die RSV Proteine F ( $F_{sol}$ ) und G ( $G_{sol}$ ) jeweils als lösliche Form und Matrix (M) und werden somit nach der Elektroporation in die Zielzellen direkt exprimiert.

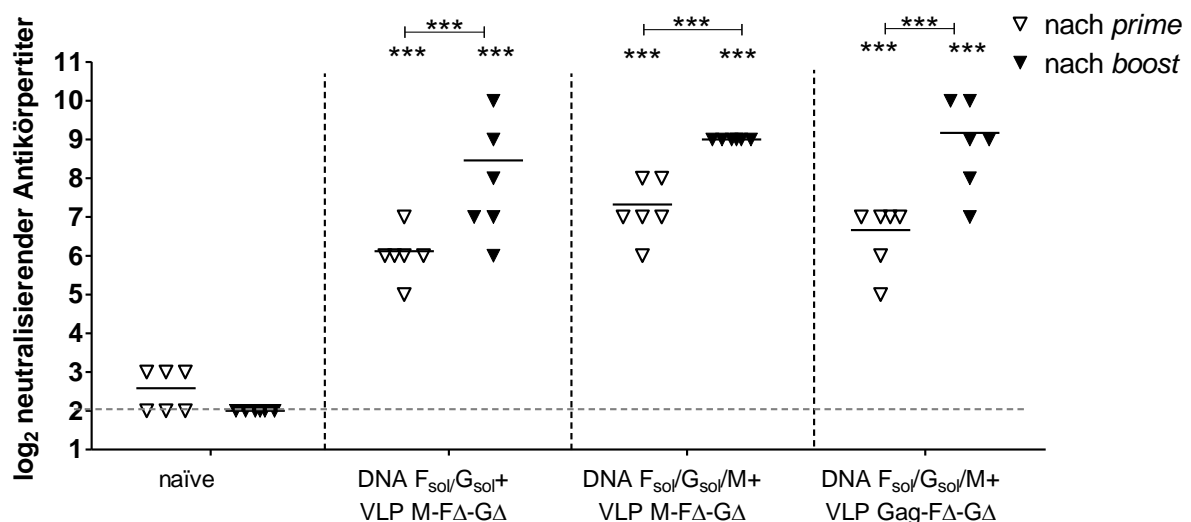
Das Immunisierungsschema wurde in Tabelle 6 aufgeführt. Die *Prime-Boost* Immunisierung mit DNA und VLP sollte eine Verbesserung, sowohl der humoralen, als auch der zellulären Immunantwort zeigen, da eine DNA Immunisierung ebenfalls eine zelluläre Antwort induzieren kann.

**Tabelle 6: Immunisierungsschema für *Prime-Boost* Vakzinierung mit VLPs nach DNA Immunisierung.** Dargestellt ist die Immunierungsstrategie für die jeweiligen Gruppen mit n=6. Es wurden insgesamt 20 µg DNA per EP/i.m.=Elektroporation *intramuskulär* in den rechten und linken *Musculus quadriceps femoris* an beiden Oberschenkeln mit max. 40 µl Gesamtvolumen appliziert, Es wurde 1 µg F-Protein in der VLP-Gruppe verwendet. i.n.=*intranasale* Gabe des Virus in 50 µl NaCl-Lösung. IU= *infectious unit*.

Gruppe	1.Immunisierung	2.Immunisierung	Belastungs- infektion
naive	unvakziniert	unvakziniert	$10^6$ IU RSV i.n.
DNA- $F_{sol}/G_{sol}$ + VLP M-F $\Delta$ /G $\Delta$	DNA- $F_{sol}$ + DNA- $G_{sol}$ EP/i.m.	M-F $\Delta$ /G $\Delta$ -VLP i.m.	$10^6$ IU RSV i.n.
DNA- $F_{sol}/G_{sol}/M$ + VLP M-F $\Delta$ /G $\Delta$	DNA- $F_{sol}$ + DNA- $G_{sol}$ EP/i.m.	M-F $\Delta$ /G $\Delta$ -VLP i.m.	$10^6$ IU RSV i.n.
DNA- $F_{sol}/G_{sol}/M$ + VLP Gag-F $\Delta$ /G $\Delta$	DNA- $F_{sol}$ + DNA- $G_{sol}$ + DNA-M EP/i.m.	Gag-F $\Delta$ /G $\Delta$ -VLP i.m.	$10^6$ IU RSV i.n.

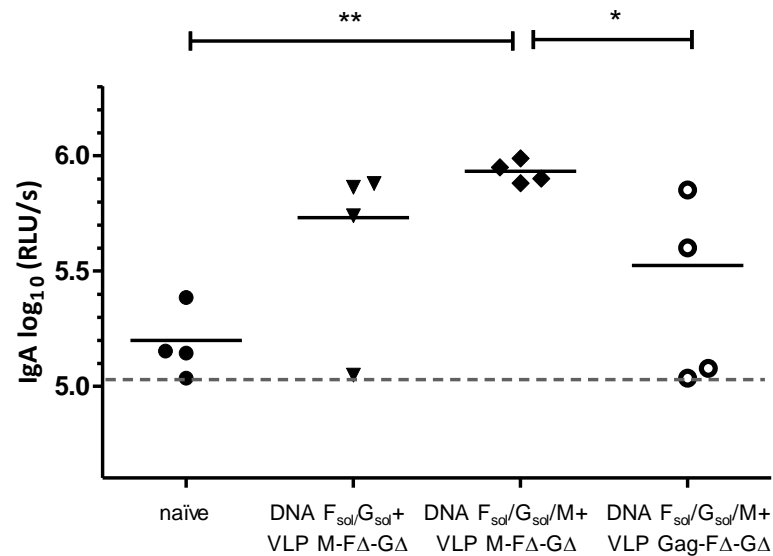
Den Tieren wurde 3 Wochen nach der Immunisierung jeweils Blut abgenommen und ein Neutralisationstest zur Bestimmung des neutralisierenden Antikörpertiters durchgeführt.

In Abbildung 24 wird deutlich, dass alle verwendeten DNA Erstimmunisierungsvarianten zu einer deutlichen Induktion von neutralisierenden Antikörpern im Verdünnungsbereich um ca.  $2^6$ - $2^7$  der  $IC_{50}$  (*Inhibitory concentration of 50 % virus infection reduction*) liegen, des Weiteren führte die VLP Boost-Immunsierung zu einer erneuten Steigerung der humoralen Immunantwort im Bereich der neutralisierenden Antikörper gegen RSV. Hierbei wurde jeweils eine statistische Signifikanz zu den Seren nach Erstimmunisierung erzielt. Es gab keine deutlichen Unterschiede zwischen den verwendeten HIV-Gag-Partikeln mit RSV-F $\Delta$  und RSV-G $\Delta$  auf der Oberfläche im Vergleich zu RSV-M basierten Partikeln.



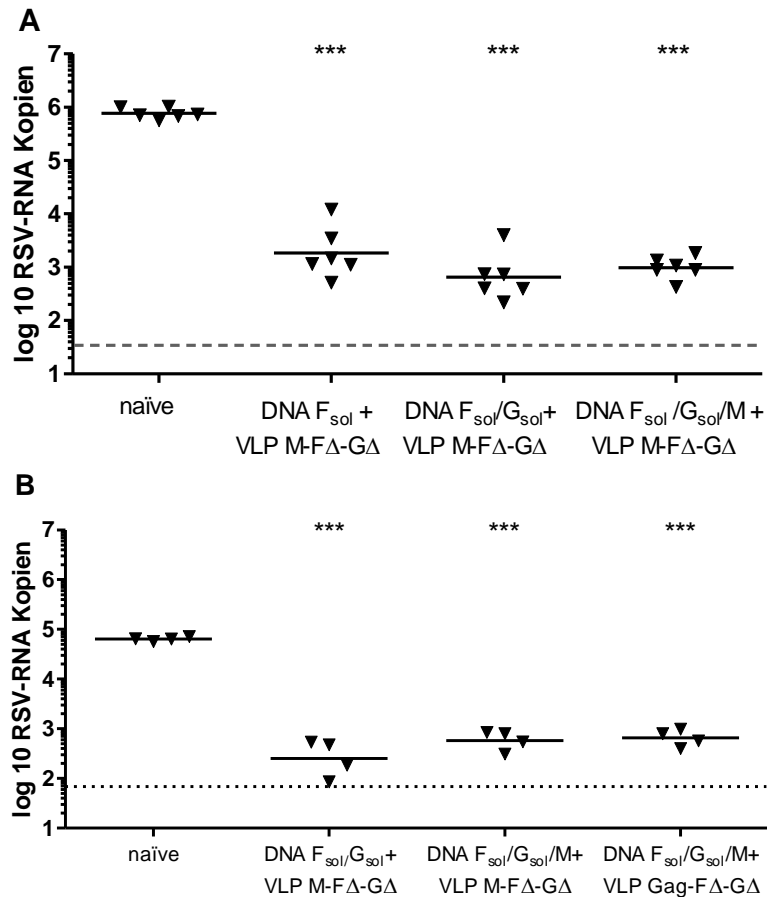
**Abbildung 24: RSV spezifische neutralisierende Antikörper mittels Neutralisationstest.** Das isolierte Serum wurde mittels Neutralisationstest und der Ermittlung der Inhibitionskonzentration von 50 % ( $IC_{50}$ ) analysiert. Es ist die jeweilige Verdünnung des Serums angegeben, bei der noch max. 50 % der Infektionsereignisse durch das verwendete rgRSV sichtbar waren. Die entsprechende Vakzinierung ist jeweils angegeben. Hierbei ist eine *Prime-Boost* Immunisierung im Abstand von 4 Wochen durchgeführt worden. Die gestrichelte Linie stellt das Detektionslimit der Messung dar, welches die geringste eingesetzte Verdünnung darstellt. Es ist der Mittelwert angegeben. \*\*\*= $p < 0.001$  One-Way-ANOVA im Vergleich zum Serum nach Erstimmunisierung und zwischen den Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe.  $n=6$ .

Nach der erfolgten Belastungsinfektion wurde ebenfalls in der BAL die RSV spezifischen mukosalen Antikörpern (IgA) bestimmt. In Abbildung 25 ist gezeigt, dass die verwendeten RSV-M Partikel im Vergleich zu den HIV-Gag Partikeln mit identischem F-Proteingehalt in der Impfung zu einer Erhöhung des IgA Titers in der BAL der infizierten Mäuse führten. Im Vergleich zur unvakzinierten Kontrollgruppe zeigen alle immunisierten Gruppen eine Steigerung der RSV spezifischen IgA Antikörper. Die höchste mukosale IgA Antwort wurde in der Gruppe DNA F<sub>sol</sub>-G<sub>sol</sub>-M + VLP M-F $\Delta$ -G $\Delta$  erzielt.



**Abbildung 25: RSV spezifische IgA Antikörper mittels ELISA.** Die isolierte BAL nach der Belastungsinfektion wurde mittels RSV-spezifischem IgA ELISA untersucht. Es wurden mittels Lumineszenz RLU/s (Relative Lichteinheiten/s) gemessen. Die entsprechende Vakzinierung ist jeweils angegeben. Hierbei ist eine *Prime-Boost* Immunisierung im Abstand von 4 Wochen durchgeführt worden. Die gestrichelte Linie stellt das Detektionslimit der Messung dar. Es ist der Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. \*\*= $p < 0.01$  bzw. \*= $p < 0.05$  One-Way-ANOVA mit Tukey-Posttest im Vergleich zu allen Gruppen.  $n=4$ .

Auch in der ermittelten Viruslast der Lunge zeigten alle immunisierten Mäuse in zwei unabhängig von einander mit zeitlichem Versatz durchgeführten Immunisierungen eine deutliche Reduktion der RSV-RNA-Kopien. Es ist in beiden Immunisierungen eine signifikante Reduktion der Viruslast detektiert und in den Gruppen DNA F<sub>sol</sub>-G<sub>sol</sub>-M + VLP M-FΔ-GΔ und DNA F<sub>sol</sub>-G<sub>sol</sub> + VLP M-FΔ-GΔ eine Reduktion bis zum 1125-fachen berechnet worden. Im Vergleich zu den HIV Gag-Partikeln wurde keine signifikante Verbesserung durch die RSV-M Partikel erzielt.



**Abbildung 26: RNA Viruslast mittels spezifischer q-RT-PCR nach Immunisierung.** Die isolierte RNA aus dem Lungenhomogenat wurde mittels q-RT-PCR über SybrGreen® und einem RSV- bzw. IVA-RNA Standard quantifiziert. Die entsprechende Vakzinierung ist jeweils angegeben. Hierbei ist eine *Prime-Boost* Immunisierung im Abstand von 4 Wochen durchgeführt worden. Die gestrichelte Linie stellt das Detektionslimit der Messung dar, welches 50 Kopien beträgt. Gezeigt sind zwei zeitlich versetzt durchgeführte unabhängige Immunisierungen (A und B). Es ist der Mittelwert angegeben. \*\*\*= $p < 0.001$  One-Way-ANOVA mit Tukey-Posttest im Vergleich zu allen Gruppen. A:  $n=6$  und B:  $n=4$ .

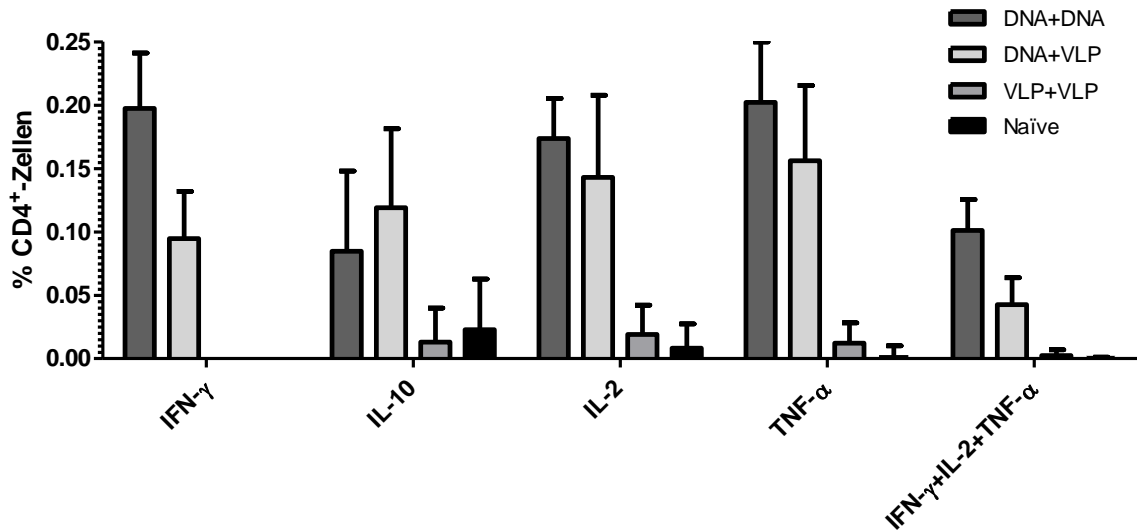
Ein Vergleich der etablierten zweimaligen Immunisierung mit DNA wurde im Vergleich zur *Prime-Boost* Impfung nur mit VLPs und DNA-VLP für die Analyse der zellulären Immunantwort durchgeführt. Hierbei erfolgte eine intrazelluläre Zytokinfärbung von Splenozyten 7 Tage nach der zweiten Immunisierung. Mit Hilfe der intrazellulären Zytokinfärbung wurden weitere Daten zur vakzinierungs-vermittelten zellulären Immunantwort generiert und miteinander verglichen.

Im Rahmen dieser intrazellulären Zytokinfärbung konnten mit Hilfe eines RSV spezifischen CD4-F-Peptid-Pools die Splenozyten restimuliert werden und einige wichtige Zytokine mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten Antikörpern bestimmt werden.

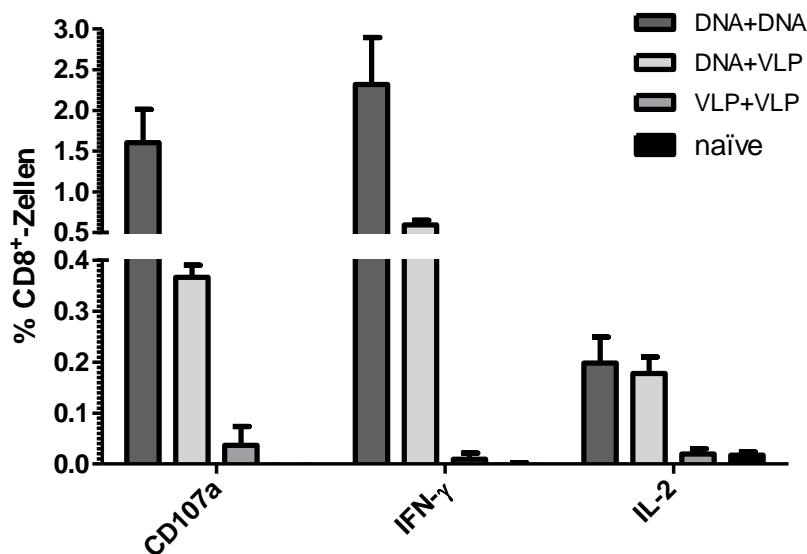
Hierbei wurden in der zweimaligen Immunisierung mit DNA-F<sub>sol</sub> eine hohe Anzahl an Interferon- $\gamma$ , Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  und Interleukin-2 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ - und IL-2) positiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen detektiert (siehe Abbildung 27). Für die *Prime-Boost* Immunisierung nur mit VLPs konnten kaum Zytokine gemessen werden, die Immunisierung DNA-VLP zeigte einen intermediären Prozentsatz an Zytokinen. IL-10 positive Zellen wurde ebenfalls nur zwischen 0,1-0,13 % aller gemessenen Zellen in den Immunisierungen mit DNA detektiert.

In Abbildung 28 wurde eine Auswahl der gemessenen Parameter der gefärbten und mit spezifischem CD8-F-Peptid-Pool stimulierten Splenozyten graphisch dargestellt. Der Degranulierungsmarker CD107a ist ein funktionaler Marker für die Degranulierung nach einer erfolgten Stimulation von zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-Zellen und ebenfalls für funktionale NK-Zellen. Die CD8<sup>+</sup>-Splenozyten exprimierten eine hohe Menge von CD107a in der Gruppe der DNA-DNA immunisierten Tiere, die Immunisierung mit VLP-VLP führte zu keiner signifikanten Erhöhung von CD107a. Die Immunisierung mit DNA-F<sub>sol</sub> und VLP M-F $\Delta$ -G $\Delta$  zeigte eine ca. 4-fach geringere Menge an CD107a positiven CD8<sup>+</sup>-Zellen.

Die Ausschüttung von Zytokinen zeigte sich hier für Interferon- $\gamma$  in deutlicher Menge bei den DNA-DNA immunisierten Tieren, die Gruppe DNA-VLP zeigte ca. 4-fach weniger IFN- $\gamma$  und in der Immunisierungsgruppe mit zweimaliger VLP-Impfung war kaum IFN- $\gamma$  nachweisbar. In geringerem Maße konnte auch durch Stimulation mit RSV-F Peptiden die ausgelöste Expression an IL-2 insbesondere in den isolierten Splenozyten der Gruppen DNA-DNA und DNA-VLP detektiert werden. Auch für IL-2 konnten in der Gruppe VLP-VLP keine T-Zellen mit zytotoxischem Potential analysiert werden, die das Interleukin ausschütteten. Die unvakzinierten Kontrolltiere zeigten keine unspezifische Stimulation durch die verwendeten RSV-F-Peptide. Die unstimulierten Daten der Splenozyten wurden bei der Auswertung der Daten von den stimulierten Proben abgezogen und die Differenz in der Abbildung 27 bzw. 28 dargestellt. Es wurde mittels DNA Impfung eine starke anti-virale zelluläre Immunantwort induziert. Eine zweimalige VLP-Impfung konnte im Gegensatz zur DNA-Impfung keine virus-spezifische zellulären Immunantworten induzieren.



**Abbildung 27: Zytokinexpression von CD4<sup>+</sup>-Zellen aus der Milz nach spezifischer Peptid-Stimulation mittels intrazellulärer Zytokinfärbung und FACS Analyse 7 Tage nach zweiter Immunisierung.** Die isolierten Splenozyten wurden mittels RSV-F spezifischen Peptiden restimuliert und mittels intrazellulärer Zytokinfärbung mit Fluoreszenz markierten Antikörpern gefärbt und analysiert (FACS). Dargestellt sind die Prozent CD4<sup>+</sup>- Splenozyten, welche die dargestellten Zytokine exprimieren, nach Peptidstimulation (6 h) mit RSV-F-Peptiden. n=4.



**Abbildung 28: Zytokinexpression von CD8<sup>+</sup>-Zellen aus der Milz nach spezifischer Peptid-Stimulation mittels intrazellulärer Zytokinfärbung und FACS Analyse 7 Tage nach zweiter Immunisierung.** Die isolierten Splenozyten wurden mittels RSV-F spezifischen Peptiden restimuliert und mittels intrazellulärer Zytokinfärbung mit fluorszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und analysiert (FACS). Dargestellt sind die Prozent CD8<sup>+</sup>- Splenozyten, welche die dargestellten Zytokine exprimieren, nach Peptidstimulation (6 h) mit RSV-F-Peptiden. n=4.

## 5.2.4 Kombinatorische Immunisierung von VLPs gegen RSV und IVA

Die *Prime-Boost* Vakzinierung bestehend aus DNA Erstimmunisierung und einer zweiten Impfung mit VLPs zeigte eine starke humorale Immunantwort mit deutlicher Steigerung des Titers an neutralisierenden Antikörpern gegen RSV durch die VLP Immunisierung. Die zelluläre Immunantwort war in der DNA-VLP Immunisierung geringer, als durch eine zweimalige Applikation von DNA, welche das lösliche RSV-F<sub>sol</sub> exprimiert (siehe Abbildung 27/28). Jedoch war sie deutlich erhöht im Vergleich zur *Prime-Boost* VLP Immunisierung und lag somit im mittleren Bereich der zellulären Immunantwort zwischen den beiden Impfungen DNA-DNA bzw. VLP-VLP. Die Kombination aus DNA und VLP zeigte die stärkste Reduktion der Viruslast in der Lunge der infizierten Tiere und wies eine gute zelluläre und humorale Immunantwort auf (Abbildung 27/28 bzw. 24/25). Sie wurde somit im Folgenden für die kombinatorische Immunisierung gegen zwei Respirationsviren, RSV und IVA, als Vakzinestrategie verwendet. Es konnte innerhalb der Abteilung bereits in einer kombinierten DNA-Impfung gezeigt werden, dass es zu einer Reduktion der Viruslast sowohl für IVA als auch RSV kommt [114].

Für die Analyse der Immunantwort einer DNA-VLP und VLP-VLP Immunisierung als kombinatorische Vakzine gegen RSV und IVA wurden BALB/c-Mäuse wie in Abbildung 13 immunisiert. Die Tiere wurden in 5 Gruppen unterteilt, diese sind in Tabelle 7 aufgeführt. Jeweils 5 (naive Kontrolltiere) bzw. 6 (vakzinierte) Tiere wurden 4 Wochen nach der zweiten Immunisierung mit RSV oder IVA PR8 infiziert. Nach 5 Tagen (RSV) bzw. 6 Tagen (IVA) wurden die Tiere euthanasiert, die BAL entnommen und ein Lungenhomogenat zur Analyse der Viruslast hergestellt.

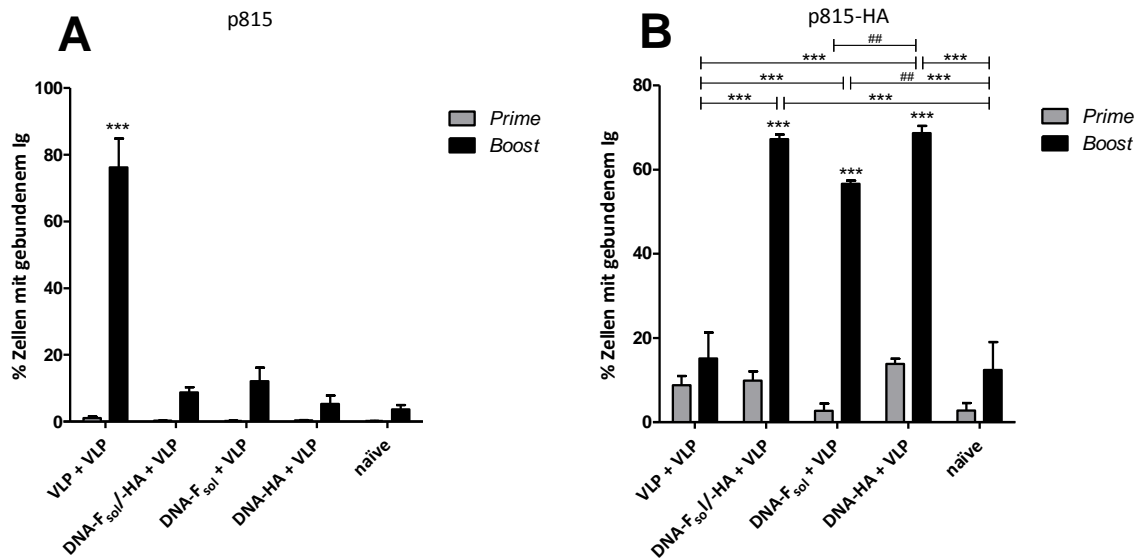
In den 3 Wochen nach Erst- bzw. Zweitimmunisierung erhaltenen Seren wurde die Spezifität der Antikörper gegen die Hauptantigene RSV-F und IVA-HA überprüft. Hierzu wurde die Bindung der Antikörper an eine mit RSV-F bzw. IVA-HA stabil transduzierte murine Zelllinie (p815) mittels Durchflusszytometrie und einem sekundären fluoreszenz markierten Ig-Antikörper bestimmt.



**Tabelle 7: Immunisierungsschema für *Prime-Boost* Vakzinierung mit VLPs nach DNA Immunisierung gegen IVA und RSV.** Dargestellt ist die Immunisierungsstrategie für die jeweiligen Gruppen mit n=6. Es wurden insgesamt 20 µg DNA per EP/i.m.=Elektroporation *intramuskulär* in den rechten und linken *Musculus quadriceps femoris* an beiden Oberschenkeln mit max. 40 µl Gesamtvolumen appliziert, Es wurde 40 ng F-Protein in den VLP-Gruppe verwendet in 1 µg Gesamtprotein. 50 µl Volumen wurde s.c.=*subcutan* injiziert i.n.=*intranasale* Gabe des Virus in 50 µl NaCl-Lösung. IU= *infectious unit*.

Gruppe	1.Immunisierung	2.Immunisierung	Belastungsinfektion
naive	unvakziniert	unvakziniert	10 <sup>6</sup> IU RSV A2 i.n.
naive	unvakziniert	unvakziniert	250 PFU IVA PR8 i.n.
VLP + VLP	RSV M-FΔ/HA-VLP s.c.	RSV M-FΔ/HA-VLP s.c.	10 <sup>6</sup> IU RSV A2 i.n.
VLP + VLP	RSV M-FΔ/HA-VLP s.c.	RSV M-FΔ/HA-VLP s.c.	250 PFU IVA PR8 i.n.
DNA-F <sub>sol</sub> /-HA + VLP	DNA-F <sub>sol</sub> +DNA-HA EP/i.m	RSV M-FΔ/HA-VLP s.c.	10 <sup>6</sup> IU RSV A2 i.n.
DNA-F <sub>sol</sub> /-HA + VLP	DNA-F <sub>sol</sub> +DNA-HA EP/i.m	RSV M-FΔ/HA-VLP s.c.	250 PFU IVA PR8 i.n.
DNA-F <sub>sol</sub> + VLP	DNA-F <sub>sol</sub> EP/i.m	RSV M-FΔ/HA-VLP s.c.	10 <sup>6</sup> IU RSV A2 i.n.
DNA-F <sub>sol</sub> + VLP	DNA-F <sub>sol</sub> EP/i.m	RSV M-FΔ/HA-VLP s.c.	250 PFU IVA PR8 i.n.
DNA-HA + VLP	DNA-HA EP/i.m	RSV M-FΔ/HA-VLP s.c.	10 <sup>6</sup> IU RSV A2 i.n.

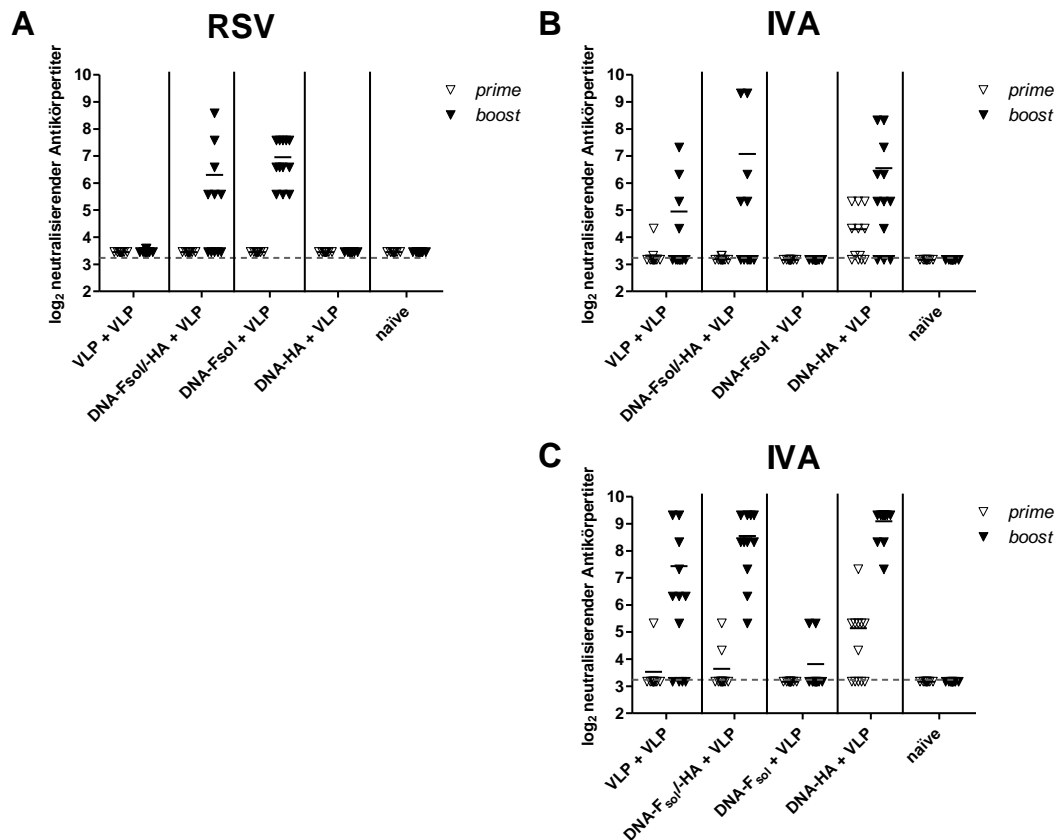
Ein hohes Maß an HA-spezifischer Antikörperantwort konnte mit bis zu 70% der gemessenen Zellen, welche Immunglobuline gebunden hatten, für die DNA-VLP Gruppen erzielt werden. Bereits nach der Erstimmunisierung konnte in Gruppen mit DNA-HA *Prime* eine leichte Steigerung der Antikörperbindung an die HA exprimierenden Zellen im Vergleich zur unvakzinierten Gruppe erzielt werden. Die deutlichere Steigerung erfolgte signifikant nach der Zweitimmunisierung mit VLPs. In Abbildung 29 A ist ebenfalls zu erkennen, dass nach einer zweimaligen VLP Applikation ein hohes Maß an Antikörpern gegen zelluläre Proteine und Mediumkomponenten induziert wird. Die Ergebnisse in Abbildung 29 B stellen die Anzahl der Zellen mit gebundenem Ig in Prozent dar, nach Abzug der Werte für gebundenes Ig an die Kontrollzellen ohne Antigen. Zur Analyse wurden stabil transduzierte Mauszellen p815, die die entsprechenden Oberflächenproteine auf der Zelloberfläche tragen, mit untransduzierten Zellen verglichen.



**Abbildung 29: Spezifität der Serum-Antikörper mittels FACS-basiertem Antikörperbindungstest.** Die Spezifität der Serum-Antikörper für IVA-HA wurde über die Bindung zu mit HA stabil transduzierten Zellen (p815-HA Abbildung 29 B) und zu Kontrollzellen (p815 Abbildung 29 A) untersucht. Es wurden sowohl Seren nach erster (Prime) als auch zweiter (Boost) Immunisierung untersucht. Gezeigt sind die Mittelwerte der Gruppen mit Standardabweichung abzüglich der %Zellen mit gebundenem Ig an p815-Kontrollzellen. Signifikanzen wurden untersucht mit  $###/***=p < 0.001$  bzw.  $##/**=p < 0.01$  ( $\#$  = Primeseren  $*$  = Boostseren, One-Way Anova, Naive: n=5 Immunisierte Gruppen: n=6).

Lediglich in der VLP Gruppe konnte kaum Steigerung durch die zweite Applikation der VLPs erzielt werden und diese lagen nur geringfügig über den unvakzinierten Kontrolltieren. Es wurden auch RSV-F spezifische Antikörper analysiert, jedoch ergab sich hier eine kaum messbare Steigerung der Antikörperantworten nach der Immunisierung (Daten nicht gezeigt).

Des Weiteren wurden die erhaltenen Seren auf virus-neutralisierende Antikörper untersucht. Da der Effekt von unspezifischen Antikörpern gegen zelluläre Proteine und Mediumbestandteile im durchgeführten Neutralisationstest kaum Einfluss nimmt (s.o.). Dieser wurde sowohl für RSV mit Komplement-inaktivierten Seren, als auch für IVA mit und ohne Komplement-Inaktivierung durchgeführt.

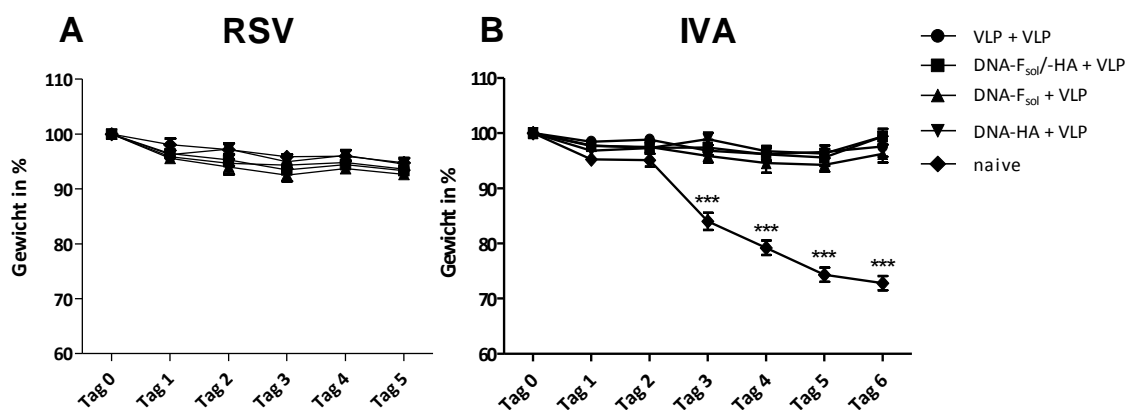


**Abbildung 30: Influenza und RSV spezifische neutralisierende Antikörper mittels Neutralisationstest.** Das isolierte Serum wurde mittels Neutralisationstest durch die Ermittlung der Inhibitionskonzentration von 50 % ( $IC_{50}$ ) für RSV und für IVA ist die höchste Serumverdünnung angegeben, bei der keine Infektionsereignisse beobachtet werden konnten. Es ist bei RSV die jeweilige Verdünnung des Serums angegeben, bei der noch max. 50 % der Infektionsereignisse durch das verwendete rg-RSV sichtbar waren. Die entsprechende Vakzinierung ist jeweils angegeben. Hierbei ist eine *Prime-Boost* Immunisierung im Abstand von 4 Wochen durchgeführt worden. A: RSV-neutralisierende Antikörper in Komplement-inaktivierten Seren. B: Influenza-neutralisierende Antikörper in Komplement-inaktivierten Seren. C: Influenza-neutralisierende Antikörper in unbehandelten Seren. Die gestrichelte Linie stellt das Detektionslimit der Messung dar, welches die geringste eingesetzte Verdünnung darstellt. Es ist der  $\log_2$  transformierte Mittelwert angegeben. \*\*\*= $p < 0.001$  bzw. \*\*= $p < 0.01$  T-Test im Vergleich zum Serum nach Erstimmunisierung. Naive:  $n=5$  immunisierte Gruppen:  $n=6$ .

Es konnten RSV-neutralisierende Antikörper (Abbildung 30 A) nur in den beiden Gruppen mit DNA  $F_{sol}$  als Erstimmunisierung nach der VLP Applikation detektiert werden. In allen verbleibenden Gruppen konnten keine neutralisierende Antikörper gegen RSV gemessen werden. Hierbei zeigte sich des Weiteren, dass in der Gruppe mit DNA  $F_{sol}/HA$ -VLP lediglich 6 von 12 Tieren einen messbaren neutralisierende Antikörpertiter besaßen. Im Gegensatz dazu hatten alle Tiere nach der DNA  $F_{sol}$ -VLP Immunisierung neutralisierende Antikörper gegen RSV. Die Unterschiede zu den Erstimmunisierungsseren waren für diese Gruppen signifikant.

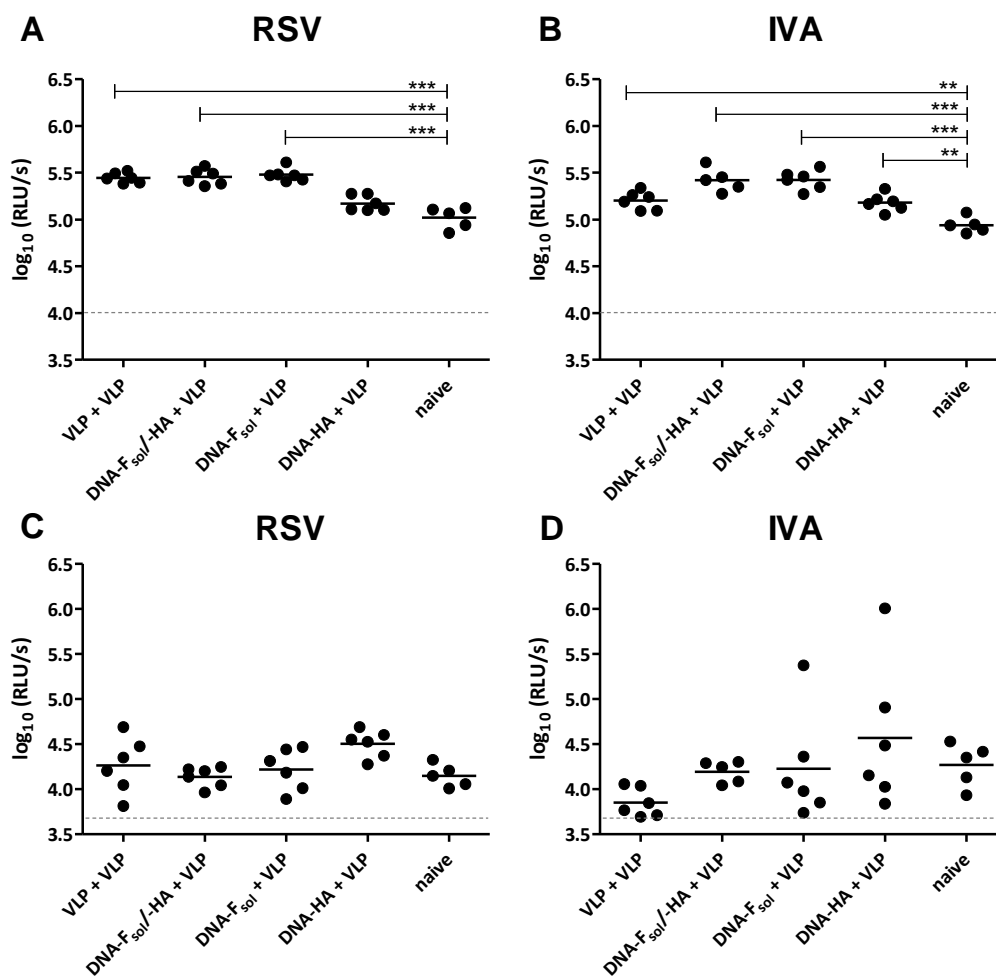
Die komplement-inaktivierten Seren in Abbildung 30 B zeigen eine deutliche Erhöhung der neutralisierenden Antikörper in den Gruppen mit DNA-HA in der Erstimmunisierung mit anschließender VLP Applikation und bei 4 von 12 Mäusen in der VLP-Immunsierung. Es wird hierbei ebenfalls der Einfluss des Komplements auf die Virusbekämpfung für Influenza A untersucht und zeigt einen positiven Effekt auf die Inhibition der Virusinfektion im Neutralisationstest. Die deutlichste neutralisierende Antikörperantwort ist in der Gruppe DNA-HA+VLP zu detektieren (9/12 Tieren). Für die unbehandelten Seren (Abbildung 30 C) sind ähnliche Unterschiede zwischen den Vakzinierungsgruppen, wie bei den inaktivierten Seren, zu erkennen. Die Titer der neutralisierenden Antikörper liegen allerdings höher und es zeigte sich in 8 von 12 Tieren in der VLP Immunisierung einen deutliche Steigerung der Antikörperantwort nach der zweiten Impfung mit VLPs. Für die beiden Gruppen mit DNA-HA wurden in allen Tieren neutralisierende Antikörper detektiert. In der Gruppe DNA-HA+VLP zeigten sich in allen Mäusen hohe Titer an IVA neutralisierenden Antikörpern. Mit einer deutlichen *Boost*-Reaktion auf die VLPs. Die Gruppe DNA-F<sub>sol</sub>-VLP konnte auch nach der VLP Impfung kaum neutralisierende Antikörper gegen IVA induzieren (2/12 Tieren).

Eine virale Infektion mit IVA führt im Mausmodell zur Verschlechterung des Gesundheitszustandes, welche am deutlichsten durch einen Gewichtsverlust in Folge der Belastungsinfektion erkennbar wird. Das Gewicht wurde täglich bestimmt und in Abbildung 31 der Mittelwert der jeweiligen Gruppe als Gewichtsverlauf aufgetragen.



**Abbildung 31: Gewichtsverlauf der Mäuse nach intranasaler Belastungsinfektion.** Das Gewicht der Mäuse wurde täglich ab dem Tag der entsprechenden Belastungsinfektion (A: RSV, B: IVA) dokumentiert. Aufgetragen sind die prozentualen Mittelwerte aller Mäuse der jeweiligen Gruppe mit Standardfehler. Die jeweilige Vakzinierung der Gruppe ist angegeben. \*\*\*= $p < 0.001$  One-Way ANOVA Signifikanz von einer Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen des gleichen Tages. Naive: n=5 immunisierte Gruppen n=6.

Die mit RSV infizierten Mäuse (Abbildung 31 A) zeigten keine signifikante Veränderung des Gewichtes im Verlauf des Beobachtungszeitraums von 5 Tagen. Für Influenza A wiesen alle immunisierten Tiere keine signifikanten Veränderungen des Gewichtes oder andere sichtbare klinische Zeichen einer starken viralen Infektion auf. Das Gewicht der unvakzinierten Mäuse begann am Tag 2 nach der Belastungsinfektion deutlich zu sinken. Ab dem dritten Tag nach der Infektion war das Gewicht im Vergleich zu den vakzinierten Mäusen signifikant reduziert und nahm stetig bis zum Tag 6 ab. Am letzten Tag des Beobachtungszeitraums war der Gewichtsverlust so hoch, dass die Tiere aufgrund der Abbruchkriterien euthanasiert werden mussten.



**Abbildung 32: RSV und IVA spezifische IgA Antikörper mittels ELISA.** Die isolierte BAL nach der Belastungsinfektion ( A: RSV infiziert mit anti-RSV-IgA B: Influenza A infiziert mit anti-RSV-IgA C: RSV infiziert mit anti-IVA-IgA D: Influenza A infiziert mit anti-IVA-IgA) wurde mittels RSV- und IVA.-spezifischem IgA ELISA untersucht. Es wurden mittels Lumineszenz RLU/s (Relative Lichteinheiten/s) gemessen. Die entsprechende Vakzinierung ist jeweils angegeben. Hierbei ist eine c Immunisierung im Abstand von 4 Wochen durchgeführt worden. Die gestrichelte Linie stellt das Detektionslimit der Messung dar. Es ist der Mittelwert angegeben. \*\*\*= $p < 0,001$  bzw. \*\*= $p < 0,01$  im Vergleich zur unvakzinierten Gruppe mittels One-Way ANOVA. Naive:  $n=5$  und vakzinierte Gruppen:  $n=6$ .

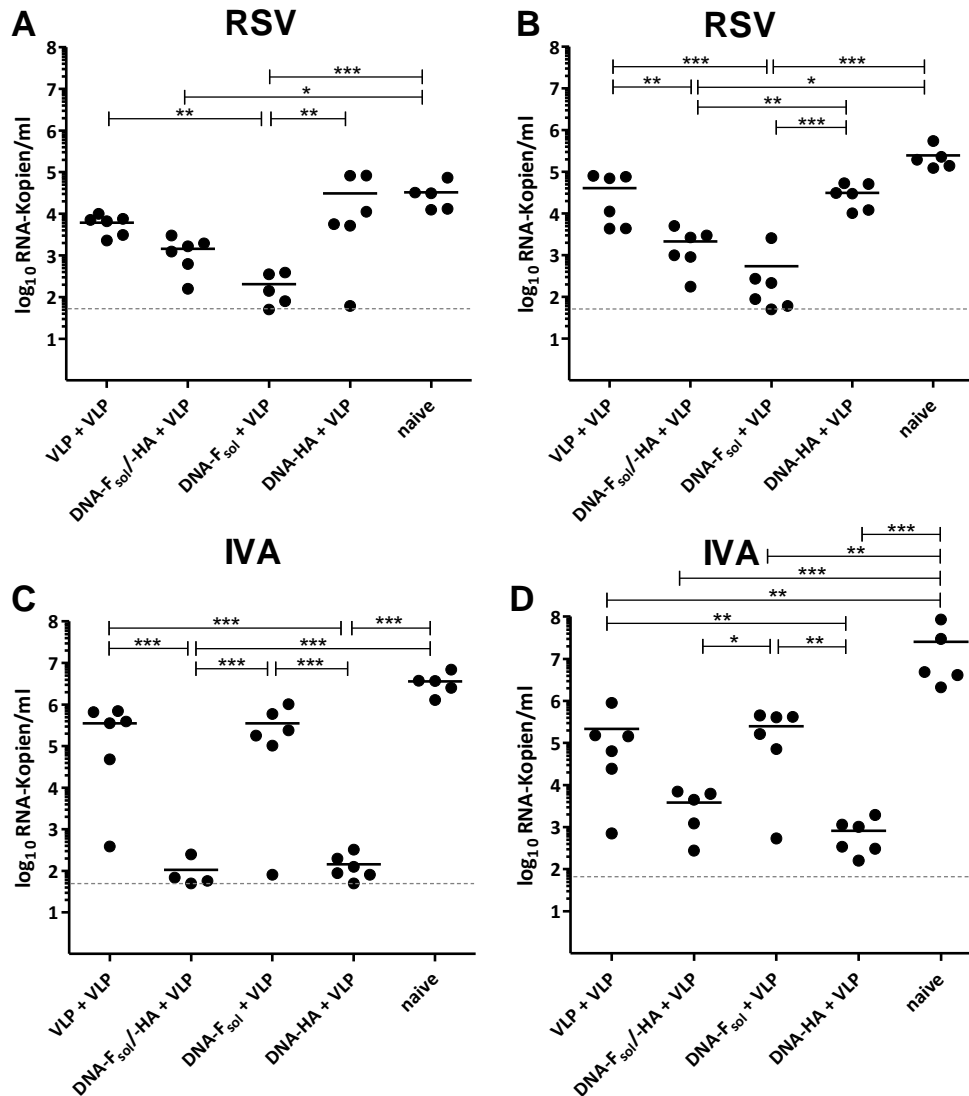
Dies fiel mit dem Tag der Analyse zusammen. Die erhaltenen Proben des Lungenhomogenats und der BAL wurden wie bereits beschrieben entnommen und analysiert.

Es wurden virus-spezifische IgA Antworten in der BAL der Mäuse bestimmt. In Abbildung 32 erkennt man deutlich eine Erhöhung der RSV-spezifischen IgA Titer der vakzinierten Gruppen im Vergleich zur nicht immunisierten Gruppe. Die Unterschiede waren, bis auf in der Gruppe DNA-HA+VLP, wenn die Tiere mit RSV infiziert worden waren, signifikant höher im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die durchgeführte Belastungsinfektion mit RSV im Vergleich zu IVA zeigte nur in der Gruppe VLP+VLP eine weitere Steigerung der IgA Antwort (Vergleiche Abbildung 32 A und B). Für Influenza gab es keine statistisch signifikanten Differenzen zwischen den immunisierten Tieren und den Kontrolltieren nach der Belastungsinfektion mit RSV oder IVA.

Die Viruslast wurde nach der Belastungsinfektion in den verschiedenen Gruppen in der BAL und dem Lungenhomogenat untersucht. Die Detektion erfolgte wie beschrieben mittels q-RT-PCR mit virusspezifischen *Primern*. In Abbildung 33 wird deutlich, dass die Viruslast in allen immunisierten Gruppen, sowohl für RSV als auch für IVA, im Vergleich zur unvakzinierten Gruppe geringer ist. Eine Ausnahme zeigte sich in der BAL in der Gruppe DNA-HA+VLP, hier gab es keine Reduktion der Viruslast für RSV. Es war allerdings eine 10-fache Reduktion in der Lunge gemessen worden. Dort wurden in nicht vakzinierten Tieren höhere RSV-RNA-Kopien gemessen, als in der BAL derselben Tiere. Hierbei ist die Probengenerierung zu beachten. Für RSV wurde in zwei Gruppen in der BAL und Lunge eine signifikante Reduktion festgestellt. Diese beiden Gruppen wurden jeweils mit DNA-F<sub>sol</sub> als Erstimmunisierung geimpft. In der Kombinationsimpfung DNA-F<sub>sol</sub>/-HA+VLP wurde die Viruslast um den Faktor 25 (BAL) und 200 (Lunge) und in der Gruppe DNA-F<sub>sol</sub>+VLP um den Faktor 600 (BAL) und 200 (Lunge) verringert.

Die IVA Viruslast in der Lunge war in den immunisierten Gruppen reduziert im Vergleich zur unvakzinierten Gruppe. In der BAL wurde lediglich eine deutliche Reduktion in den Gruppen mit DNA-HA Erstimmunisierung erzielt. In den Gruppen VLP-VLP und DNA-F<sub>sol</sub>+VLP wurde die Viruslast in der Lunge um den Faktor 80 gesenkt. Die Kombinationsgruppe DNA-F<sub>sol</sub>/-HA+VLP zeigte eine Verringerung der Viruslast in der Lunge um den Faktor 4.000 und in der BAL mit Faktor 31.000. Die stärkste Virusreduktion nach der Belastungsinfektion wurde in der Gruppe DNA-HA+VLP erzielt (Lunge Faktor 12.000 und BAL Faktor 31.000). Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren ebenfalls deutlich. So war die DNA-F<sub>sol</sub> immunisierte Gruppe in der RSV Viruslast signifikant geringer im Vergleich zu VLP-VLP oder

DNA-HA+VLP. Bei einer IVA Belastungsinfektion zeigte sich die Reduktion vorrangig nach einer erfolgten DNA-HA Erstimmunisierung im Vergleich zu den anderen immunisierten Gruppen.



**Abbildung 33: RNA Kopienzahl mittels spezifischer q-RT-PCR nach Immunisierung.** Die isolierte RNA aus dem Lungenhomogenat und der BAL wurde mit einem RSV- bzw. IVA-RNA Standard quantifiziert. A: BAL der RSV infizierten Tiere, B: Lunge der RSV infizierten Tiere, C: BAL der Influenza A infizierten Tiere und D: Lunge der Influenza A infizierten Tiere. Die entsprechende Vakzinierung ist jeweils angegeben. Hierbei ist eine *Prime-Boost* Immunisierung im Abstand von 4 Wochen durchgeführt worden. Die gestrichelte Linie stellt das Detektionslimit der Messung dar, welches 50 Kopien beträgt. Es ist der Mittelwert angegeben. \*\*\*= $p < 0.001$  \*\*= $p < 0.01$  \*= $p < 0.05$  One-Way-ANOVA mit Tukey-Posttest im Vergleich zu allen Gruppen. Naive Gruppe  $n=5$  und vakzinierter Gruppen  $n=6$ .

In dieser Immunisierung konnte mit Hilfe der *Spearman*-Korrelation ein Trend bei Influenza und RSV für die Korrelation der erhaltenen Ergebnisse zur Virusbeladung in der Lunge und BAL in Beziehung zu den gemessenen Titern an neutralisierenden Antikörpern gezeigt werden. Es konnte ein deutlicher Trend berechnet werden, dass die neutralisierenden Antikörper gegen RSV auf die Virusbeladung (RSV) der BAL und der Lunge einen Effekt ausüben. Je mehr neutralisierenden Antikörper detektiert werden konnten, desto deutlich war die Reduktion der Virusbeladung nach der Belastungsinfektion. Allerdings war die Korrelation ( $R^2$ -Wert) nicht aussagekräftig genug, als das nicht weitere Faktoren für die Reduktion der Virusbeladung einen Beitrag leisten würden. Zu den weiteren Faktoren zählen unter anderem die zelluläre Immunantwort, als auch die bindenden Antikörper. Es konnten keine Korrelationen der Antikörperantworten gegen RSV bzw. IVA auf die jeweilig andere Virusbeladung in der Lunge oder der BAL gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit RSV-M VLPs erstmalig erfolgreich eine neue Vakzinplattform generiert und untersucht werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die VLPs reproduzierbar in größeren Mengen hergestellt werden konnten. Diese Plattform eignet sich nachweislich auch zur Immunisierung gegen mehrerer Pathogene, wie hier gezeigt gegen RSV und IVA.

Die Immunogenität ist geringer als die bisher etablierte DNA Elektroporation. Allerdings eignet sich die VLP Vakzine für eine nicht invasive *Boost*-Applikation *intra muskulär* oder *sub cutan* und zeigte eine starke Induktion von neutralisierenden Antikörpern nach einer DNA-Erstimpfung oder einem RSV-F-Protein *Prime*, die vergleichbar war mit der reinen DNA-Elektroporation. Die gezeigten Immunisierungen verdeutlichen das Potential der RSV-VLPs als Vakzine gegen Viren des Respirationstraktes.



### 6. Diskussion

RSV und Influenza sind weltweit zwei der häufigsten Ursachen für Erkrankungen des Respirationstraktes. Insbesondere in Entwicklungsländern sind die durch Virusinfektionen ausgelösten Erkrankungen für Neugeborene, kleine Kinder, immungeschwächte Personen und Menschen über 65 Jahren [116] von einem großem Gesundheitsrisiko begleitet. Bis heute ist trotz intensiver Forschung kein geeigneter Impfstoff gegen RSV entwickelt worden. Lediglich ein monoklonaler Antikörper ist als präventive Maßnahme als passive Impfung für Hochrisiko-Patienten gegen RSV verfügbar [83]. Für Influenza ist ein Impfstoff verfügbar, der allerdings jährlich angepasst werden muss [93]. Die Bekämpfung von RSV- und IVA-Infektionen ist mit Hilfe von langanhaltenden, protektiven und insbesondere sicheren Vakzinen von entscheidender Bedeutung. Die Entwicklung einer Kombinationsimpfung gegen RSV und IVA zugleich stellt weiterhin einen erhöhten Anspruch an die Forschung für einen Kombinationsimpfstoff dar. Vorangegangene Studien in verschiedenen Tiermodellen, als auch Ergebnisse aus klinischen Studien bei Influenza zeigten, dass eine schützende Vakzine insbesondere starke neutralisierende Antikörper induzierte und zusätzlich eine zelluläre Immunantwort auslöste [68, 90]. Dabei ist insbesondere die Kombination aus Induktion von neutralisierenden Antikörpern, als auch einer zellulären Immunantwort eine herausfordernde Aufgabe bei der Etablierung einer (Kombinations-) Vakzine gegen Viren des Respirationstraktes.

Für die Impfstoffentwicklung wurden virus-ähnliche Partikel bereits in vielen Infektionsmodellen verwendet. Vorteilhaft ist die repetitive Anordnung der Hauptantigene auf einem in der Größe dem Virus sehr ähnlichen Partikel [89, 100-106]. Ausserdem werden VLPs von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen und die Peptide mittels MHC II-Molekülen präsentiert [89]. Sie sind nicht replikationsfähig und lösen somit keine Infektion aus. VLPs sind protein-basierte Impfstoffe, welche bereits für HPV und HBV als lizenzierter Impfstoff im Menschen verwendet werden [101].

Im Rahmen dieser Dissertation wurden erstmalig VLPs auf Basis von RSV-M hergestellt und die Funktionalität der Oberflächenproteine in *in vitro* Experimenten untersucht.

In vielversprechenden Vakzinierungsstrategien mit virus-ähnlichen Partikeln wurde die Protektion gegen die Belastungsinfektion mit RSV und anschließend als Kombinationsimpfung gegen RSV oder IVA überprüft.

Die hergestellten VLPs wurden auf ihre immunogenen Eigenschaften im Bereich der neutralisierenden Antikörper, bindenden Antikörper und der Reduktion der Viruslast nach einer Belastungsinfektion genauer untersucht. Eine Kontrolle des Gewichtsverlaufes stellte ein geeignetes Kriterium dar, um den Gesundheitszustand der Tiere nach der Infektion zu analysieren.

### **6.1 Produktion und in vitro Analyse der hergestellten virus-ähnlichen Partikel**

Die Untersuchung der Funktionalität der Oberflächenproteine auf den virus-ähnlichen Partikeln ist von entscheidender Bedeutung für die Wirksamkeit der VLPs. Aus diesem Grund wurden die viralen Antigene RSV-F, -G und IVA-HA unter 5.1 *in vitro* analysiert.

Die funktionale native Konformation der viralen Antigene auf den VLPs ist essentiell für die Immunogenität der Partikel. Die natürliche Konformation der viralen Proteine RSV-F, RSV-G bzw. IVA-HA wurde mit Hilfe von lentiviralen Partikeln untersucht. Die lentiviralen Partikel wurden mit verschiedenen Kombinationen der Oberflächenproteine pseudotypisiert und ihre Fähigkeit der Transduktion von Zielzellen in Zellkultur überprüft.

Bei der Pseudotypisierung des verwendeten lentiviralen Vektors mit den Oberflächenproteinen RSV-F und RSV-G konnten keine Infektionen in den Zielzellen nachgewiesen werden. Eine Codonoptimierung führte unter anderem durch die Erhöhung des GC-Gehaltes in der Sequenz des Plasmides zu einer deutlichen Steigerung der Expressionsrate im Vergleich zur Wildtypsequenz der Oberflächenproteinen von RSV [69]. Bei dem nahverwandten Masernvirus konnte zudem durch die Verkürzung der cytoplasmatischen Domäne (CT, *cytoplasmic tail*) der Oberflächenproteine ein lentiviraler Transduktionstiter erreicht werden [103]. Dieser Ansatz wurde in dieser Arbeit auch für RSV verfolgt und zeigte deutlich, dass die Deletion der CT von beiden Oberflächenproteinen notwendig ist (Tabelle 1), um einen reproduzierbaren Transduktionstiter zu erzielen. Eine mögliche Erklärung könnte mit der Funktion der cytoplasmatischen Domäne der Oberflächenproteine im Zusammenhang stehen. Die CT ist bei Transmembranproteinen für die Interaktion mit Zellsignalen verantwortlich und nimmt unter anderem Einfluss auf die Kompartimentalisierung der Proteine in der Zellmembran. Die Veränderung der CT kann dadurch zu einer erhöhten Einlagerung der Oberflächenproteine in die Zellmembran führen und eine verstärkte Abschnürung von Partikel herbeiführen [103,111].

Hier wurden die letzten 4 Aminosäuren bei RSV-F ( $F_{\text{syn}}\Delta\text{CT13}$ ) und die letzten 13 Aminosäuren bei RSV-G ( $G_{\text{syn}}\Delta\text{CT3}$ ) durch Klonierung die cytoplasmatische Domäne verkürzt. Weiterführende Charakterisierungen in Expression und Fusionseigenschaften wurden im Rahmen einer Masterarbeit durchgeführt [99]. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Verkürzungsmutanten und der volllänge Konstrukte in ihren fusogenen Eigenschaften festgestellt werden. Es gab einige weitere Kombinationen die minimale Transduktionstiter erzielen konnte, die höchsten Titer erreichen allerdings die Kombination  $F_{\text{syn}}\Delta\text{CT13}$  und  $G_{\text{syn}}\Delta\text{CT3}$ . Es war nicht möglich eine Transduktion nur mit einem der Oberflächenproteine zu vermitteln, die Kombination aus RSV-F- und RSV-G-Variante war notwendig. Des Weiteren war es möglich mittels Ultrazentrifugation die Partikel aufzukonzentrieren. Es wurden zudem unterschiedliche Zellen exemplarisch transduziert und auch hierbei konnten die Partikel zu Transduktionseignissen führen. Diese lagen allerdings jeweils deutlich unter der Kontrolle mit VSV-G pseudotypisierten Vektoren. Eine weitere Steigerung der Transduktionstiter kann durch die Veränderung der Verhältnisse der Oberflächenproteine zu einander als auch durch die Veränderung der eingesetzten DNA Mengen bei der Transfektion erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Da der Fokus dieser Arbeit jedoch auf der Entwicklung einer VLP Vakzine mit funktionalen Oberflächenproteinen lag, wurde von weiteren Versuchen abgesehen. Es konnte klar gezeigt werden, dass die verwendeten verkürzten Oberflächenproteine eine Transduktion vermitteln können und somit funktional sind.

Im weiteren Verlauf konnte gezeigt werden, dass eine Pseudotypisierung von lentiviralen Partikeln mit RSV- $F_{\text{syn}}\Delta\text{CT13}$  und IVA-HA möglich ist (Abbildung 10). Dabei wurden verschiedene Kombinationen von Oberflächenproteinen von RSV (RSV-F und RSV-G) und IVA (IVA-HA und IVA-NA) untersucht, allerdings zeigte nur eine Kombination von RSV- $F_{\text{syn}}\Delta\text{CT13}$  und IVA-HA einen detektierbaren Transduktionstiter in den Zielzellen. In diesen Experimenten [112] wurden für IVA-HA und -NA keine Verkürzungsmutanten, wie für RSV-F und -G hergestellt. Das Verkürzen der cytoplasmatischen Domäne von IVA-HA und/oder IVA-NA kann zudem die Transduktionstiter bei der Pseudotypisierung beeinflussen. Dies stellt eine naheliegende Möglichkeit zur Steigerung der Titer dar. Es kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass IVA-HA auf den lentiviralen Partikeln keine Fusion bewirken kann, sondern lediglich das Anlagern der Partikel an die Zielzelle vermittelt. Im Rahmen der Masterarbeit wurden verschiedenste Kombinationen der Oberflächenproteine von IVA und RSV mit einander verglichen [112].

Für die hier verwendeten Oberflächenproteine RSV- F<sub>syn</sub>ΔCT13 und IVA-HA konnte mittels lentiviraler Pseudotypisierung in dieser Dissertation gezeigt werden, dass sie in der verwendeten Kombination funktional sind und somit die native Konformation der Proteine auf der Oberfläche der lentiviralen Partikel ist. Es können bisher keine Rückschlüsse auf Grundlage dieser Ergebnisse geschlossen werden, dass alle Oberflächenproteine in der funktionalen Form der Proteinfaltung vorliegen. Jedoch legen die Ergebnisse nahe, dass zumindest ein Teil der Oberflächenproteine in der richtigen und funktionalen Faltung vorliegen. Es kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, dass auf den Partikel ein Gemisch aus fehlgefalteten und korrekt gefalteten Proteinen vorliegt. Auch ist hierbei die Konformation nicht festzustellen, da das RSV-F in zwei unterschiedlichen Konformationen (Prä- und Postfusionskonformation) vorliegen kann [113].

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Oberflächenproteine zumindest zum Teil in den natürlichen antigenen Eigenschaften vorliegen (Abbildung 7ff). Die Expression der korrekten Proteine wurde zudem mittels Wester-Blot-Analysen überprüft (Abbildung 12). Die Funktionalität und natürliche Konformation der Oberflächenproteine RSV-F und IVA-HA ist für die Immunogenität bei einer Vakzinierung von entscheidender Bedeutung. Die durch die Immunisierung induzierten Antikörper können gegen die native Konformation und immunodominanten Epitope in den Oberflächenproteinen ausdifferenziert werden. Eine gute Protektion mit Antikörpern gegen die Hauptantigene ist für den Erfolg der Impfung von entscheidender Bedeutung.

Interessant ist die Beobachtung, dass selbst bei Immunisierung von nicht korrekt gefalteten RSV-F Proteinen eine schützende Immunantwort, sowohl in der Maus, als auch in Rhesusaffen Experimenten induziert wurden. Andere Ergebnisse lassen vermuten, dass die Präfusionsvariante von RSV-F eine deutlich bessere neutralisierende Antikörperantwort induziert [113]. Es sind lediglich keine weiterführende Untersuchungen ausser in der Maus direkt im Vergleich nach Immunisierung von RSV-F als Post- oder Prä-Fusionsvariante durchgeführt worden [61, 69]. Ein Vergleich einer nachgewiesenen Prä- bzw. Postfusionsvariante auf den lentiviralen Partikeln könnte weitere Erkenntnisse zur Funktionalität der verschiedenen Formen des RSV-F Proteins erzielen.

## 6.2 Vakzineentwicklung gegen das Respiratorische Syncytial Virus

### 6.2.1 Herstellung von virus-ähnlichen Partikeln auf Basis von RSV-M

Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe von codon-optimierten Expressionsplasmiden für RSV-Matrix und die verkürzten Varianten der Oberflächenproteine RSV-F und RSV-G es erstmalig gelungen ist, virus-ähnliche Partikel auf der Grundlage von RSV Proteinen zu generieren (Abbildung 12). Bisher konnten keine detektierbaren Mengen an RSV basierten VLPs hergestellt werden. Publiziert wurde bisher lediglich der Versuch mittels RSV-M RSV- VLPs herzustellen. Dieser Versuch zeigte keine detektierbaren Proteine [114]. In aktuellen Publikationen konnten VLPs generiert werden, wobei die Oberflächenproteine mit Teilen von *New-Castle-Disease Virus* Proteinen fusioniert wurden [107] oder durch rekombinant hergestellte Sendai Viren [121], die die RSV-Oberflächenproteine codieren und auf ihrer Oberfläche tragen. Hier kommt jedoch die Problematik zum Tragen, dass eine Immunreaktion auch gegen die RSV-fremden Proteinbestandteile der verwendeten Viren ausgelöst wird. Im Fall des im Menschen normalerweise apathogenen *New-Castle-Disease Virus* können dadurch bisher unbekannte Nebenwirkungen auftreten. Eine natürliche Infektion kann beim Menschen mit dem *New-Castle-Disease Virus* vorkommen, dass ist jedoch sehr selten. Die in dieser Arbeit hergestellten VLPs basieren ausschließlich auf RSV-Proteinen und reduzieren somit die möglichen Nebenwirkungen durch Verwendung von irrelevanten Proteinen oder Proteinbestandteilen nach Immunisierung als Impfstoffkandidat.

Eine Problematik bei der Produktion von VLPs liegt in dem Vorhandensein von zellulären Komponenten aus der Produktionszelllinie. Bei den in dieser Arbeit entwickelten VLPs wurde eine humane Nierenepithelzelllinie (HEK293T) verwendet. Aufgrund der Produktion in der Zelllinie werden natürlicherweise auch Zellmembranbestandteile bei der Partikelabschnürrung mit in die VLPs eingebaut oder liegen als zusätzliche Bestandteile im Überstand der Zellkulturen vor. Zudem kann es auch nach der Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation durch ein Succrose-Kissen zu Kontaminationen mit Mediumbestandteilen, wie z.B. fetales Kälberserum (FKS), kommen. Die zellulären Bestandteile, als auch FKS können nur sehr aufwendig von der VLP-Präparation getrennt werden. Bei der anschließenden Immunisierung der Tiere lösen diese Bestandteile zusätzlich eine Immunreaktion aus, welche nicht spezifisch gegen die virale Infektion wirkt.

Durch komplexere Aufreinigungen oder die Umstellung auf ein zellfreies System könnten diese Kreuzreaktivität nach der Immunisierung weiter vermindert werden, was im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war.

Die Immunreaktion auf das verwendete FKS kann durch die Verwendung von FKS-freiem Medium für die Zelllinienkultivierung ebenfalls minimiert werden.

Dieser Punkt der Reduktion der zellulären Bestandteile ist von entscheidender Bedeutung für die Etablierung einer Partikel basierten RSV-Vakzine im Menschen, da die Reinheit der VLP Vakzine ein wichtiges Kriterium für die weitere Zulassung ist. Verunreinigungen in Vakzinpräparaten haben schon mehrfach zu einem unvorhersehbarem Risiko für Patienten geführt und können weiterhin ein Problem für die Sicherheit der Präparate im Menschen darstellen. Daher ist es unumgänglich eine hochreine VLP-Vakzine für die weitere Entwicklung zu generieren.

In den protein-biochemischen Analysen sind die drei verwendeten Proteine mit Hilfe einer SDS-Page mit anschließendem Western-Blot (Abbildung 12) analysiert worden. Zur Quantifizierung des Proteingehaltes wurde ein Bradford-Test und ein RSV-F-spezifischer ELISA durchgeführt. Es wurde zudem versucht mittels Co-Immunpräzipitation festzustellen, ob die Oberflächenproteine tatsächlich auf einem RSV-M-Partikel lokalisiert sind. Leider scheiterte der Nachweis und es zeigte sich kein eindeutiges Ergebnis, vermutlich aufgrund zu schwach affiner Antikörper gegen das RSV-F und gegen das IVA-HA (Daten nicht gezeigt). Es ist somit davon auszugehen, dass in den Präparationen ein Gemisch von VLPs mit unterschiedlichem Gehalt von Oberflächenproteinen und/oder Exosomen mit Oberflächenproteinen vorhanden ist. Wie bereits in 6.1 erläutert wurde, konnte eine zumindest teilweise bestehende native Konformation der verwendeten Deletionskonstrukte von RSV-F und RSV-G gezeigt werden. Ein Großteil der verwendeten Oberflächenproteine insbesondere RSV-F könnte wie beschrieben eine Fehlfaltung aufweisen. Zudem sind für RSV-F zwei Konformationen bekannt (Prä- und Postfusionsvariante) [113], welche beide unterschiedliche Antikörperantworten induzieren. Innerhalb dieser Arbeit wurde nicht analysiert in welcher Konformation oder ob das RSV-F Protein gegebenenfalls in Fehlfaltung auf der Oberfläche der VLPs vorliegt.

Die hergestellten VLPs wurden in ihrer jeweiligen Präparation auf ihren Endotoxingehalt überprüft. Das ist von entscheidender Bedeutung, da Endotoxin einen ausgesprochenen adjuvantierenden Einfluss auf die Immunisierung hat. Dieser lag in allen Präparationen deutlich unterhalb der akzeptierten Menge für Impfstoffe in der Maus von 0,1 EU pro Applikation. Die VLPs wurden zudem nach der Aufreinigung auf ihren Gesamtproteingehalt und den spezifischen RSV-F-Proteingehalt untersucht, wodurch jeweils in jeder Immunisierung eine identisches Äquivalent an RSV-F-Protein appliziert werden konnte.

Dadurch können unterschiedliche Immunisierungsexperimente direkt miteinander verglichen werden und dieses ist für eine aussagekräftige Schlussfolgerung aus den Experimenten essentiell.

### 6.2.2 VLP Impfung im Mausmodell

Ein Impfstoff gegen RSV muss vor allem auch dahingehend getestet werden, dass nach Impfung und nachfolgender Infektion mit RSV kein erschwerter Krankheitsverlauf induziert wird. In einer klinischen Studie im Jahre 1967 zeigte eine Immunisierung mit Formalin-inaktivierten Viruspartikeln, die zur Impfung in Kleinkindern verwendet wurden, eine Immunantwort, die keinen Schutz gegen die natürlichen RSV-Infektion induzierte. Sondern die nachfolgende natürliche RSV-Infektion induzierte eine sehr starke Erkrankung in den Geimpften Kindern. Tragischerweise sind zwei Kinder der vakzinierten Gruppe an der RSV-Infektion gestorben. Die Immunisierung hatte einen ungewollten verschlimmernden Effekt auf die sonst in gesunden Kindern meist harmlos verlaufenden Virusinfektion [44, 45].

Der Aspekt der Sicherheit des Vakzinekandidaten ist von entscheidender Bedeutung, somit ist im Rahmen dieser Arbeit bei jeder Immunisierung auf das Gewicht und den augenscheinlichen Gesundheitszustand der Versuchstiere besonderes geachtet worden, um den Krankheitszustand der Tiere zu erfassen und eventuelle Abbruchkriterien bei den Tierversuchen einzuhalten. Innerhalb dieser Arbeit konnte in keiner der durchgeführten Immunisierungen und der nachfolgenden Infektion mit RSV eine sichtbare Veränderung des Gesundheitszustandes der Versuchstiere bemerkt werden. Einzig die Kontrolltiere in der Kombinationsimpfung mit anschließender Influenza-Infektion zeigten einen deutlichen Gewichtsverlust. Im Hinblick auf den Gesundheitszustand nach der RSV-Belastungsinfektion gab es keine erkennbaren Unterschiede zwischen den verschiedenen *Prime-Boost* Immunisierungen. Zudem wurden ergänzende Versuche mit RSV präexponierten Tieren durchgeführt und auch diese zeigten keine feststellbaren Veränderungen des Gesundheitszustandes (Daten nicht gezeigt). Es kann also im Maustiermodell von VLP-Vakzinkandidaten ausgegangen werden, die keinen negativen Einfluss auf eine folgende RSV-Infektion besitzen. Im Rahmen dieser Dissertation wurde RSV-A2 für die Belastungsinfektion verwendet. Der RSV-A-Stamm war in 7 von 9 aufeinanderfolgenden epidemischen RSV-Saisons in Deutschland verantwortlich [5] und ist somit der am häufigsten auftretende Stamm.

Des Weiteren fand RSV-A2 in den meisten aktuell vorliegenden Veröffentlichungen Anwendung und stellt somit aktuell den geeignetsten Virusstamm für eine Belastungsinfektion in BALB/c Mäusen dar. Diese Mäuse sind für die RSV-Infektion als Tiermodell etabliert und zeigen im Vergleich zu vielen anderen Mäusestämmen eine aussagekräftige Immunreaktion, bei einem in der Regel apathogenen Krankheitsverlauf nach einer *intra nasalen* Belastungsinfektion [115].

Neutralisierende Antikörper, meistens Immunglobuline der Klasse A und G [90], weisen eine hohe Affinität zum gebundenen Antigen (hier: meist RSV-F Protein) auf, so dass die Viruspartikel keine Infektion von Zielzellen vermitteln können. Die hohe Affinität der durch die Vakzinkandidaten induzierten Antikörper ist von entscheidender Bedeutung. Ein schwerwiegender verschlimmelter Krankheitsverlauf von RSV kann durch eine geringe Affinität der induzierten Antikörper ausgelöst werden [44, 45a/b]. Schwach affine Antikörper können auf eine RSV-Infektion verstärkend einwirken, da sie das Eindringen in die Zielzelle im Organismus unterstützen können. Die Makrophagen und/oder dendritische Zellen phagozytieren den Virus-Antikörperkomplex, um das Viruspartikel abzubauen. Bei schwach affinen Antikörper besteht die Möglichkeit, dass die Antikörper sich bei der Phagozytose vom Viruspartikel lösen und dadurch eine erleichterte Infektion innerhalb des Endosoms in den Zellen ausgelöst werden kann. Es kann somit keine vollständige Opsonisierung der Antigene des Virus mit stark-bindenden Antikörpern stattfinden. Eine verstärkte Infektion durch schwach affine Antikörper ist bei dem Dengue-Virus beschrieben, wo es durch unterschiedliche Stämme und der Übertragung von schwach affinen Antikörpern von der Mutter auf den Säugling zu einem verstärkten Krankheitsverlauf kommt [116].

Im Rahmen der VLP-Immunisierung (Abschnitt 5.2.1) zeigte keine der verwendeten Partikelvakzine eine Induktion von neutralisierenden Antikörpern nach der Erst- oder Zweitimmunisierung. Lediglich die ebenfalls durchgeführte zweimalige DNA-Immunisierung mit einem codon-optimierten löslichen RSV-F-Plasmid zeigte nach der Applikation mittels Elektroporation einen deutlichen Anstieg an neutralisierenden Antikörpern im Serum der Mäuse. Die DNA-Immunisierung mit löslichen RSV-F-Protein wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe als protektive Immunisierung gegen die RSV Belastungsinfektion genauer charakterisiert [61, 62] und dient somit im Rahmen dieser Dissertation als Kontrollimmunisierung. Deutlich erkennbar war in der zweimaligen VLP-Immunisierung, dass es zu einer ca. 10-fachen Reduktion der RSV-RNA in der Lunge der Mäuse nach der Belastungsinfektion kam. Es kam zu keinem signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Partikelimmunisierungen.



Auch die verwendeten exosomalen Partikel und auch die HIV-Gag-Ova unspezifischen Kontrollpartikel zeigten eine leichte Reduktion der Virusbeladung.

Die Partikelpräparationen stammen aus einer Zelllinie in Zellkulturmedium und somit können sie Bestandteile der Produktionszelllinie als auch des verwendeten FKS-haltigen Mediums in der Präparation enthalten. Gegen diese zellulären und mediumbasierten Bestandteile wurde in den Mäusen eine Immunantwort ausgelöst und somit sind Antikörper gegen die weiteren Bestandteile der Präparationen nicht auszuschließen. Der verwendete RSV-A2 Stamm wurde ebenfalls in Zellkultur produziert und kann somit auch nach der Aufreinigung durch ein Succrosekissen identischen Bestandteile enthalten. Es ist daher nicht auszuschließen, dass es auch induzierte Antikörper gegen FKS und/oder zelluläre Bestandteile gibt und diese somit im RSV-ELISA zu falsch positiven oder zu hohen Resultaten führen.

Die DNA-Gruppe zeigte eine Reduktion der Virusbeladung nach RSV-Belastungsinfektion bis zum Detektionslimit der verwendeten RSV-spezifischen RT-PCR. Dazu wurde das Expressionskonstrukt für die lösliche Variante des RSV-F Proteins verwendet, da bereits gezeigt wurde, dass die Immunisierung mit dieser Variante zu einer höheren Immunantwort führt im Vergleich zu der Variante, die das membranständige RSV-F Protein exprimiert [61]. Die mäßige humorale Immunantwort und die damit unter anderem verbundene schwache Reduktion der Viruslast nach VLP Immunisierung machte es notwendig, die Immunisierungsstrategie zur Steigerung der Immunogenität der VLPs zu verändern (siehe 6.2.4).

### **6.2.3 Vakzinierungsvergleich von formalin-behandelten VLPs und RSV-Viruspartikeln**

Von entscheidender Bedeutung war es zuvor jedoch den Effekt einer Formalinbehandlung und Applikation der VLPs mit Aluminiumhydroxid im Vergleich zu identisch behandelten RSV-Viruspartikel zu untersuchen. Im Jahre 1967 wurde in einer klinischen Studie an Kleinkindern deutlich, wie verheerend ein FI-RSV-Vakzinkandidat wirken kann. In dieser klinischen Studie wurde den Kindern ein Formalin-inaktivierter RSV-A-Stamm mit Aluminiumhydroxid als Adjuvans versetzt *intra muskulär* appliziert. Nach der folgenden natürlichen RSV-Infektion zeigte sich ein normaler Krankheitsverlauf in der Placebogruppe. Allerdings war es notwendig rund 80 % der Impflinge mit dem Impfstoffkandidaten FI-RSV+Alum nach einer natürlichen Infektion mit RSV stationär im Krankenhaus aufzunehmen und intensiv zu behandeln.

Es kam zu einem deutlich erschwerten Krankheitsverlauf nach der RSV Infektion. Es starben sogar zwei der geimpften Kinder in Folge der anschließenden natürlichen RSV-Infektion.

In der Immunisierung in dieser Arbeit wurde mit unbehandelten VLPs, formalin-behandelten VLPs und formalin-inaktiviertem RS-Virus, jeweils zweimalig *intra muskulär* appliziert, miteinander verglichen. Bei genauerer Betrachtung der induzierten neutralisierenden Antikörper war festzustellen, dass lediglich die unbehandelten VLPs nach der zweiten Applikation eine leichte Induktion an neutralisierenden Antikörpern erzielten. Im Gegensatz dazu zeigten die Formalin inkubierten VLPs nahezu keine detektierbaren Antikörper mit virusneutralisierenden Eigenschaften. Die Vergleichbarkeit zur für die klinischen Studie hergestellten inaktivierten RSV-Partikel zeigten im Maustiermodell eine starke Induktion an neutralisierenden Antikörpern nach der *Boost*-Impfung (Abbildung 17). Dies spiegelte sich auch in der Virusbeladung der Mäuse nach der Belastungsinfektion wieder. Sowohl mit den unbehandelten VLPs und als auch nach Inkubation mit Formalin+Aluminiumhydroxid wurde eine ca. 100-fache Reduktion der Virusbeladung erzielt. Im Vergleich hierzu ist in den Mäusen, welche zweimalig mit Formalin-inaktiviertem RSV geimpft wurden, waren weder in der BAL noch in der Lunge RSV-RNA-Kopien detektierbar (Abbildung 19). Weitere Anzeichen eines erschwerten Krankheitsverlaufs waren damals eine starke Neutrophilie und Eosinophilie in den Immunzellen der BAL der Lunge [117]. Der Einfluss der Eosinophilie nach RSV-Infektion wird innerhalb der Forscher, die sich mit RSV-Vakzinentwicklung beschäftigen, stark diskutiert [117, 44, 45]. Eine Reihe von Daten sprechen für eine Eosinophilie nach Infektion mit RSV bei FI-RSV immunisierten Tieren [117]. Jedoch weisen einige Publikationen nach, dass eine Eosinophilie nicht unbedingt ein Hinweis auf den erschwerten Krankheitsverlauf bedeuten [44, 45]. In den vorliegenden Versuchen war bei Betrachtung der Zellpopulationen aus der BAL von VLP immunisierten Mäusen keine Eosinophilie [117] zu erkennen (Anhang Abbildung 36/38 und Daten nicht gezeigt). Daher wurde im Folgenden die Immunogenität der VLPs mit Hilfe unterschiedlicher Erstimpfungen moduliert, um eine stärkere Protektion gegen RSV zu erzielen.

### 6.2.4 Boost Immunisierung von VLPs nach Erstimpfung mit rekombinantem RSV-F-Protein

In der erfolgten Immunisierungsstrategie (4.3.2) sollte mit Hilfe der Gabe von einem F-Protein mit Aluminiumhydroxid als Adjuvans eine Steigerung in der zellulären Immunantwort mit Effekt auf die humorale Immunantwort nach der zweiten Impfung mit VLPs untersucht werden. Es ist bereits seit mehr als 30 Jahren bekannt, dass spezifische CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, als auch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen einen großen Beitrag zur Viruseliminierung leisten [54,79, 80, 88]. In dieser Immunisierung wurde ein rekombinant hergestelltes RSV-F Protein mit Aluminiumadjuvans versetzt im Vergleich zur Protein-VLP Impfung analysiert.

Nach der Erstimmunisierung mit dem RSV-F-Protein konnten keine neutralisierenden Antikörper induziert werden. Erst nach der zweiten Applikation zeigten sich in beiden Gruppen deutliche Titer an neutralisierenden Antikörpern (Abbildung 18). Diese lagen im Vergleich zur reinen DNA-Impfung auf ähnlich hohem Niveau. In der Protein-VLP Impfung reichte eine 5-fach geringere Dosis an F-Protein und somit auch an Adjuvans, um mittels der VLP Gabe ähnlich hohe neutralisierende Antikörper zu induzieren. Eine Steigerung konnte im Vergleich zur zweimaligen VLP Impfung mit und ohne f.i./Alum verzeichnet werden.

Aufgrund der Daten der intrazellulären Zytokinfärbung für CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (Abbildung 20/21) wurde deutlich, dass eine induzierte zelluläre Immunantwort auf die humorale Immunantwort nach der zweiten Impfung einwirkte. Aufgrund der Erstimpfung mit F-Protein+Alum im Vergleich zur VLP-Immunisierung nach der zweiten VLP-Impfung konnte eine Erhöhung der Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen beobachtet werden (Abbildung 20/21). Die Belastungsinfektion mit RSV zeigte folgend eine deutliche signifikante Reduktion der Virusbelastung in der Gruppe F-Protein+VLP (ca. 1000-fach) im Vergleich zur zweimaligen F-Protein-Impfung. In der *Prime-Boost* F-Protein-Immunisierung konnte eine ca. 100-fache Reduktion der RSV-RNA-Kopien in dem Lungenhomogenat erreicht werden. Diese Reduktion war vergleichbar mit der VLP-Impfung ohne Adjuvanszusatz der Mäuse. Es ist deutlich erkennbar, dass eine Steigerung der zellulären Immunantwort einen positiven Effekt auf die durch VLPs vermittelte humorale Immunantwort ausübt. Es wurde bisher für RSV gezeigt, dass eine starke neutralisierende humorale Immunantwort mit einer Protektion vor einer Belastungsinfektion korreliert [61,90]. Es wurde somit mit Hilfe der Erstimpfung mit rekombinantem F-Protein und einer anschließenden VLP-Boostimpfung gezeigt, dass sowohl eine gute humorale Immunantwort mit neutralisierenden Antikörpern als auch eine Steigerung der zellulären Antworten induziert werden konnte.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollte die Erstimpfung weiterhin zu einer Modulation der Immunantwort verändert werden. Hierbei sollte vor allem eine stärkere zelluläre Immunantwort und die damit verbundene Steigerung der humoralen Antwort induziert werden. Aus früheren Ergebnissen der Abteilung ist bekannt, dass eine DNA-Impfung eine starke humorale und zelluläre Immunantwort auslösen kann [61, 68, 70]. Dieser Ansatz wurde im Folgenden mit der VLP-Impfung kombiniert, damit eine noch breitere Immunantwort erzeugt werden kann.

### **6.2.5 Immunisierung von VLPs nach DNA-Erstimmunisierung im Maustiermodell**

Im weiteren Verlauf wurde mittels DNA-Erstimmunisierung, die humorale Immunantwort durch die VLP-Zweitimpfung weiter moduliert. Die Applikation von DNA zeigte bereits in früheren Studien dieser Arbeitsgruppe bei zweimaliger Gabe mittels Elektroporation einen protektiven Schutz vor einer RSV-Belastungsinfektion [61, 70]. Sie induzierte eine gute humorale als auch zelluläre Immunantwort und reduzierte signifikant die Virusbeladung nach einer RSV-Infektion.

Die DNA-VLP Immunisierungen wurden mit verschiedenen DNA-Konstrukten, welche zum einen für das lösliche RSV-F- und RSV-G-Protein kodieren, durchgeführt. Zusätzlich wurde in einer Gruppe auch das ebenfalls codon-optimierte RSV-M-Plasmid als Kombination appliziert. Des Weiteren wurden RSV-M-basierte VLPs mit HIV-Gag-basierten VLPs verglichen. Es konnte mit Hilfe der Pseudotypisierung von lentiviralen Vektoren innerhalb dieser Arbeit gezeigt werden, dass es zu signifikanten Transduktionseignissen in den Zielzellen gekommen war, wenn die verkürzten RSV-Oberflächenproteine verwendet wurden. Dem zufolge war die Annahme der nativen Konformation der Proteine auf den HIV-Gag Partikeln begründet und sollte innerhalb einer Immunisierungsstudie weitere Erkenntnisse erbringen. Im Rahmen dieses Immunisierungsschemata der DNA-VLP-Impfung wurden weitere Kombinationen an DNA-Erstimmunisierungen getestet. Es zeigte sich allerdings, dass lediglich mit der löslichen Variante RSV-F<sub>sol</sub> eine gute humorale Immunantwort induziert wurde. In dem Ergebnissteil 5.2.3 wurde somit eine Auswahl der durchgeführten Gruppen dargestellt. Es war deutlich, dass nach einer DNA-F/G bzw. DNA-F/G/M Erstimmunisierung bereits deutliche humorale Immunantworten mit guten Titern von neutralisierenden Antikörpern induziert werden konnten. Die zweite Impfung der Mäuse mit VLPs zeigte einen weiteren signifikanten Anstieg an neutralisierenden Antikörpern im Vergleich zum Zeitpunkt nach der DNA-Erstimmunisierung (Abbildung 22).

Die Mittelwerte der Antikörpertiter waren in allen gezeigten Immunisierungsgruppen vergleichbar hoch. Die mukosalen IgA-Titer wurden auch hier bestimmt und zeigten einen signifikanten Unterschied der Gruppe DNA-F/G/M+RSV-M-VLP im Vergleich zur Gruppe DNA-F/G/M+HIV-Gag-VLP und zur naiven Kontrollgruppe (Abbildung 23). Somit können mukosale und systemische Antikörper mit dieser Impfstrategie in hohem Maße induziert werden, was sich auch in der Virusbelastung der Tiere nach der Belastungsinfektion widerspiegelt. Es kann in allen dargestellten Gruppen eine Reduktion der Viruslast um den Faktor 1000 bis an die Grenzen des Detektionslimits erzielt werden.

Die Gruppe DNA-F/G/M+RSV-M-VLP zeigte sogar eine 1125-fache Reduktion der viralen Beladung in dem erhaltenem Lungenhomogenat der infizierten Tiere im Vergleich zu nicht immunisierten und infizierten Kontrolltieren (Abbildung 24).

Im Rahmen einer weiteren unabhängig durchgeführten allerdings in der humoralen Immunantwort vergleichbaren Immunisierung wurden die zellulären Immunreaktionen genauer analysiert. Hierbei ist der Vergleich der DNA-DNA mit DNA-VLP und VLP-VLP Immunisierungen durchgeführt worden. Es wurde jeweils das Plasmid verwendet, das für das lösliche RSV-F-Protein kodiert. Mit bekannten spezifischen immunodominanten RSV-F-Peptiden für BALB/c-Mäuse wurden Splenozyten stimuliert und auf Reaktivität nach Immunisierung untersucht. Diese F-spezifischen CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mittels intrazellulärer Zytokinfärbung und FACS-Analyse charakterisiert. Diese Analysen lassen Rückschlüsse auf die zelluläre Immunantwort durch die verwendeten Vakzinkandidaten zu. Sowohl für CD4<sup>+</sup>- als auch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen konnte, wie in Abbildung 25 und 26 gezeigt, nachgewiesen werden, dass eine *Prime-Boost* VLP Impfung lediglich zu einer sehr geringen zellulären Antwort bei den getesteten Zytokinen kam. Somit muss von einer schwachen Aktivierung der CD4<sup>+</sup>- als auch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ausgegangen werden. Im Gegensatz dazu zeigt die DNA-Impfung die stärksten zellulären Immunantworten in diesem Versuch. Deutlich zu erkennen sind unter anderem CD4<sup>+</sup>-T-Zellen welche Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Interleukin-2 (IL-2) und Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) exprimieren. Diese mehrfach positiven polyfunktionalen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen deuten auf eine gereifte Aktivierung der Zellen hin mit hoher T-Zell-Affinität. Die geringe Menge an IL-10 positiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ist erwartet, da es ein anti-inflammatorisches Zytokin ist im Gegensatz zu IFN- $\gamma$ , IL-2 und TNF- $\alpha$ , welche proinflammatorisch auf den Geimpften wirken. Das beide Zytokingruppen detektiert werden können spricht für eine balancierte Immunreaktion. Im Organismus sollte es zu einer inflammatorischen Reaktion aufgrund des Eindringens des Pathogens kommen, um das Pathogen effektiv zu eliminieren. Allerdings darf diese nicht zu stark ausfallen, da ansonsten zuviel umgebendes Gewebe beschädigt werden würde.

Die Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen spielt eine entscheidende Rolle zur effektiven Bekämpfung einer viralen Infektion [40, 80]. Die DNA-VLP Impfung zeigte eine leicht erhöhte anti-inflammatorische (IL-10) Reaktion in den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen bei geringerer IFN- $\gamma$  Antwort. Der Prozentsatz an IL-2 und TNF- $\alpha$  positiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ist geringfügig niedriger im Vergleich zur DNA-Impfung. Nach der Immunisierung mit den untersuchten VLP-Impfstoffen konnte ebenfalls eine deutliche Induktion von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen erzielt werden. Eine hohe Anzahl an degranulierten (CD107a positive) und proinflammatorisch wirkenden (IFN- $\gamma$ ) cytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen konnte mit einer zweimaligen DNA-Immunisierung induziert werden.

Weiterhin wurde eine schwächere Induktion der zellulären Immunantwort durch die DNA-VLP Impfung im Vergleich zur DNA-Impfung deutlich. Es konnten weniger CD8<sup>+</sup>-T-Zellen mit Hilfe der spezifischen Peptide restimuliert werden und ein Degranulierung und Aktivierung aufweisen. Im Vergleich zur *Prime-Boost* VLP-Impfung war allerdings in beiden T-Zellsubtypen eine klare Steigerung aufgrund der DNA-Erstimmunisierung erkennbar. Es wurde bereits im RSV- und in anderen Modellen eine deutliche zelluläre und humorale Immunantwort aufgrund von DNA-Applikation mittels Elektroporation gezeigt [61, 62, 70]. Mit Hilfe der VLP-Impfung kann die mäßig invasive Applikation von codon-optimierter Plasmid-DNA auf eine einmalige Applikation reduziert werden und mit einer *intra muskulären* Applikation der VLPs kombiniert werden. Eine Elektroporation steht aktuell noch in der klinischen Entwicklung für eine Anwendung im Menschen. Die Hemmschwelle der Probanden einen elektrischen Impuls nach Einführen von Applikatornadeln ist eher groß. Es wären gering invasivere Methoden zur effektiven Applikation und Aufnahme der DNA notwendig. Aktuell gibt es Experimente zu Verfahren die ähnliche Effekte ohne elektrischen Impuls vermitteln können [118, 125].

Ein weiterer Vorteil der hier produzierten VLPs ist die schnelle Anpassbarkeit an neu auftretende veränderte Hauptantigene der Viren (insbesondere bei IVA) und die kurze Herstellungszeit. Zudem lösen die VLPs aufgrund ihrer virus-ähnlichen Form einen deutlichen Stimulus bei der Impfung auf die Immunzellen aus und es können sowohl antigensequenz-spezifische als auch antigenstruktur-spezifische Antikörper gebildet werden. Um die positiven Aspekte der VLPs weiter zu untersuchen, wurde im folgenden eine Kombinationsvakzine gegen IVA und RSV auf Basis der RSV-M-VLPs hergestellt, charakterisiert und im Maustiermodell auf ihre protektiven Eigenschaften getestet.

### 6.3 Kombinatorische Vakzineentwicklung gegen RSV und IVA

Eine Kombinationsvakzine gegen mehrere Viren wäre vorteilhaft, da sie die Gabe von Impfungen reduziert und sich möglicherweise gegenseitig verstärkt. Eine der bekanntesten Kombinationsimpfungen ist die Masern-Mumps-Röteln Impfung, die im Säuglingsalter einmalig geimpft wird und eine langanhaltende Protektion gegen alle drei Viren vermittelt. Die Kombination einer Vakzine gegen mehrere Viren des Respirationstraktes stellt eine effektive Möglichkeit dar, um die Anzahl der notwendigen Impfungen für eine hohe Impftrate in der Bevölkerung zu minimieren.

Die hier erstmalig hergestellten und charakterisierten RSV-M-VLPs stellen einen Impfstoffkandidaten dar, welcher aufgrund der schnellen Anpassbarkeit und des geringen Produktionszeitraums eine Verbesserung in der Reaktion auf Veränderungen der Viren (insbesondere bei IVA) ist.

Für die abschließende Beurteilung der RSV-VLPs als Plattform für eine Kombinationsvakzine gegen RSV und IVA wurden RSV-M-VLPs mit IVA-HA und RSV-F den Hauptantigenen von IVA bzw. RSV hergestellt. Es wurden die humoralen Immunantworten in Serum und BAL, als auch die zellulären Effekte in der BAL und dem Lungenhomogenat der Mäuse genauer charakterisiert. Im Rahmen der humoralen Immunantwort wurde auch in diesem Immunisierungsversuch die IgG-Subtypen 1 und 2a im Serum der Mäuse mittels ELISA bestimmt (Anhang Abbildung 32), hierbei ist in allen durchgeführten Immunisierung einschließlich dieser Kombinationsimpfung für RSV und IVA ein ausbalanciertes Verhältnis zwischen IgG1 und IgG2a bestimmt worden. Diese Balance war ein entscheidender Hinweis auf eine ausgeglichene  $T_H1/T_H2$ - Immunantwort.  $T_H1$ -Zellen sekretieren vorwiegend IgG2a-Antikörper, wohin gegen  $T_H2$ -Zellen überwiegend IgG1 produzieren. Eine Balance dieser beiden IgG-Subtypen ist, wie bereits erwähnt, für den Impferfolg und die Sicherheit der Vakzine von entscheidender Bedeutung, da in einigen Publikationen ein erschwerter Krankheitsverlauf von RSV mit einer dominierenden  $T_H$ -Zellantwort assoziiert ist [44,45a/b].

Die Antikörperantwort konnte in allen Impfungen deutlich im Vergleich zur naiven Kontrollgruppe gesteigert werden und eine *Boost*-Reaktion mit VLPs zeigte ebenfalls eine deutliche Immunreaktion durch einen erneuten Anstieg der bindenden Antikörper. Die Analyse der IgG-Subtypen-ELISA weist wie bereits beschrieben einen entscheidenden Nachteil auf, es werden zur Beschichtung der Platten komplette inaktivierte Viruspartikel verwendet, welche ebenfalls wie die verwendeten VLPs in Zellkultur passagiert wurden.

Durch die Anzucht in Zelllinien in der Zellkultur, die sich in einem FKS-haltigen Zellkulturmedium befinden, ist eine Aufreinigung der benötigten Viruspartikel IVA oder RSV ohne zelluläre Bestandteile nicht möglich. Somit ist es nicht auszuschließen, dass die Seren der Mäuse, welche mit VLPs immunisiert wurden eine deutliche Immunreaktion auch gegen zelluläre Bestandteile und FKS in den ELISA-Tests zeigten. Die Aufreinigung eines rekombinanten RSV-F-Proteins zeigte ebenfalls eine zu hohe unspezifische Kreuzreaktion mit Mäuseseren, so dass die ELISA-Daten lediglich ein Indiz für die Induktion von bindenden IgG1- und IgG2a-Antikörpern darstellen (Anhang Abbildung 32).

Aus diesem Grund wurde in dieser Immunisierung im Rahmen von weiteren Experimenten [112] ein FACS-basierter Antikörperbindungstest durchgeführt. Mit Hilfe des Antikörperbindungstest wurden antigenspezifische Antikörper gegen IVA-HA analysiert. Hierbei wurde eine Mauszelllinie verwendet, welche die Reaktion auf humane-zelluläre Komponenten der Vakzinpräparationen reduzierten. Es wurde eine stabil transduzierte Mauszelllinie mit dem Hauptantigenen RSV-F bzw. IVA-HA verwendet. Allerdings konnten mit Hilfe der Zelllinie p815-F<sub>syn</sub> keine klaren Ergebnisse erzielt werden.

Auch die Verwendung einer Fusionsdefekten Mutante von RSV-F führte nicht zum erhofften Erfolg, da keine signifikante Steigerung der Bindung an die Zelllinie detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Ursache für das Scheitern dieser Versuche könnte in dem Verhältnis der stabiltransduzierten Zellen zu untransduzierten Zellen liegen. Da die Zellen mehrere Passagen vor Versuchsbeginn in einem Selektionsmedium kultiviert wurden, sollte nur eine geringe Anzahl an untransduzierten Zellen zum Einsatz gekommen sein. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass es zu einer Fehlfaltung der Proteine auf den Zellen gekommen war und die gebildeten Antikörper in den Seren der Mäuse nicht an die Epitope des Proteins binden konnten. Im Gegensatz dazu konnten mit p815-HA aussagekräftige Ergebnisse für die Antikörperantwort auf das IVA Hauptantigen Hämagglutinin erhalten werden (Abbildung 27). Hier stellte sich heraus, dass die VLP-Impfung lediglich geringe Mengen an HA-spezifischen IgG-Antikörper induzierte und im Vergleich zur nicht vakzinieren Kontrollgruppe waren die Antikörpermengen nur geringfügig erhöht. Eine deutlich signifikante Induktion erzielte die DNA-Erstimpfung mit Plasmid-DNA, welche für IVA-HA kodierte, nach der anschließenden VLP-Vakzinierung mit 60-70 % Zellen mit gebundenen Immunglobulinen. Auffällig war die erhebliche Steigerung der Gruppe RSV-F<sub>sol</sub>+VLP nach der VLP-Impfung um den Faktor 20.



Diese Steigerung könnte sich mit dem Model der intrastrukturellen/intramolekularen Hilfe erklären lassen [119]. Hierbei vermittelt die Induktion von aktivierten RSV-F-spezifischen CD4<sup>+</sup>-T-Helfer-Zellen eine stimulierende Hilfsfunktion für die durch die VLP-Gabe induzierten HA-spezifischen B-Zellen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Elektroporation von RSV-F-DNA, sowohl eine CD4<sup>+</sup>- als auch eine CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Immunantwort ausgelöst wird (siehe Abbildung 35-38). Des Weiteren besitzt das F-Protein von RSV die Fähigkeit an *Toll-like* Rezeptor 4 und CD14 zu binden und somit die Immunantwort auf ein weiteres Antigen zu beeinflussen [120].

Der Gewichtsverlauf der Mäuse nach der RSV-Belastungsinfektion zeigte auch in dieser Immunisierung keine Unterschiede (Abbildung 29 A). Bei einer Influenza A-Infektion nahmen die unvakzinierten Tiere innerhalb der Versuchsdauer von 6 Tagen deutlich bis an die Grenze des zulässigen Gewichtes (Abbruchkriterien) ab. Dieses zeigte sich für die nicht geimpfte Kontrollgruppe (Abbildung 29 B), alle vakzinierten Tiere wiesen kaum Veränderung des Körpergewichtes auf. Bei den IgA-Antikörper in der BAL der Tiere stellte sich lediglich für RSV-spezifische Antikörper ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe dar. Bei den RSV-IgA-Antikörper scheint zudem die Belastungsinfektion mit RSV die IgA-Antikörper nach der zweimaligen VLP-Impfung noch einmal zu steigern.

Die neutralisierenden Antikörper aus dem Serum der Mäuse wurde ebenfalls untersucht. Hierbei konnten nur nach der VLP-Impfung RSV-spezifische neutralisierende Antikörper in den beiden Vakzinierungsgruppen mit DNA-RSV-F<sub>sol</sub> induziert werden. Jedoch ist die Menge an RSV-F auf den VLPs mit lediglich 40 ng pro Immunisierung sehr gering im Vergleich zu den vorherigen RSV-Immunisierungen (1 µg RSV-F-Protein/Tier) und könnte somit ein Grund für die schwache Induktion von RSV-spezifischen neutralisierenden Antikörpern darstellen. Für die neutralisierenden Antikörperdetektion von IVA wurden die Seren einmal komplement-inaktiviert und einmal ohne Inaktivierung verwendet. Die Unterschiede sind in beiden Analysen ähnlich, jedoch zeigte sich ein höherer Neutralisationstiter in nicht-komplement inaktivierten Seren, dies bietet ein Hinweis auf den Einfluss des Komplements auf die Neutralisation von Influenzaviruspartikeln. Auch die *Prime-Boost* VLP-Impfung induzierte neutralisierende Antikörper gegen IVA. Die höchsten Titer wurden jedoch in der DNA-IVA-HA +VLP Impfung erzielt. In den kombinatorischen DNA-Vakzinierungen mit DNA-RSV-F<sub>sol</sub> wurde nur die Gesamtmenge an DNA gleich gehalten, somit lagen die einzelnen Plasmide nur in der halben Menge vor und könnten somit eine geringere Immunreaktion vermitteln. Zusammenfassend lässt sich eine gute humorale Immunantwort insbesondere durch die DNA-VLP Impfung sowohl für RSV als auch für IVA feststellen.

Die zelluläre Zusammenstellung der Immunzellen in der BAL und der Lunge wurde ebenfalls FACS-basiert untersucht. Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede für DNA-IVA-HA geimpfte Tiere im Vergleich zu den anderen Gruppen, diese haben eine sehr geringe Anzahl an aktivierten inflammatorischen Zellen (Neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen) insbesondere in der BAL nach der Belastungsinfektion. Ein ähnliches Bild wurde auch für den Aktivierungsstatus der Immunzellen gezeigt (Anhang Abbildung 35/37). Dies kann als weiteres Indiz für eine Protektion der Tiere gedeutet werden. Für RSV war die Verteilung der Immunzellen in der Lunge zwischen den Gruppen ähnlich. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede herausgestellt werden.

Im Aktivierungsstatus der Immunzellen zeigte sich jedoch in der Lunge der Tiere ein Anstieg an aktivierten CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (CD43<sup>+</sup>- und Granzym B-Expression) in den Gruppen mit DNA-RSV-F<sub>sol</sub> (Anhang Abbildungen 35/37).

Die protektiven Effekte der Immunisierung für IVA zeigten sich deutlich in der Virusbelastung der BAL und Lunge nach der Belastungsinfektion. Hierbei war eine nahezu vollständige Reduktion in der BAL der Tiere und eine starke Reduzierung in der Lunge in den Mäusen mit DNA-IVA-HA Erstimmunisierung erzielt worden. Die übrigen immunisierten Gruppen zeigten insbesondere in der Lunge eine signifikante Reduktion der IVA-RNA-Kopienzahl in der Lunge (Abbildung 31). Für die RSV-Virusbelastung in BAL und Lunge wurde mit der DNA-RSV-F<sub>sol</sub> Impfung mit VLP die deutlichste Reduktion in BAL und Lunge bis nahe dem Detektionslimit erzielt. Statistisch signifikante Unterschiede konnten alle Vakzinierungsmodelle induzieren und somit aufgrund ihrer humoralen und zellulären Immunantwort Einfluss auf die RSV-Infektion nehmen. Die Kombination aus Plasmid-DNA, welche RSV-F und IVA-HA exprimiert, mit einem RSV-M-HA-F-VLP induziert eine gute Immunantwort gegen RSV und IVA, daraus ergibt sich, dass RSV-M-basierte VLPs eine vielversprechende Basis für Vakzinkandidaten gegen mehrere Viren des Respirationstraktes darstellen.

### 6.4 Ausblick

Auf Grundlage von RSV-M-Partikeln können schnell und effizient Partikel mit unterschiedlichen viralen Oberflächenproteinen des Respirationstraktes etabliert werden. Eine *intra muskuläre* oder *sub cutane* Applikation der Partikel zeigte in dieser Dissertationsarbeit, nach einer guten Stimulation der T-Zell-Antwort mittels Erstimmunisierung, eine aussagekräftige Steigerung der humoralen Immunantwort.

Insbesondere Virus-neutralisierende Antikörper konnten durch die RSV-VLP Impfung in den Mäusen ausgelöst werden. Es zeigte sich weiterhin nachweislich, dass es zu keinem erschweren Krankheitsverlauf bei einer späteren Belastungsinfektion mit RSV gekommen ist und somit die Partikel keine erkennbaren negativen Effekte auslösen. Die balancierte humorale Immunantwort zwischen  $T_H1$ -/und  $T_H2$ -Zellen konnte mittels ausgeglichener IgG1/IgG2a-Verhältnisse gezeigt werden..

Ebenfalls konnte mittels DNA-VLP-Impfung eine deutliche RSV-F-spezifische zelluläre Immunantwort induziert werden, welche einen weiteren entscheidenden Beitrag zur Eliminierung des Virus und somit zur Protektion des Wirtes leistete. Eine gute zelluläre und humorale Immunantwort ist wichtig für eine schnelle Elimination des Pathogens. Eine überschießende zelluläre Immunantwort kann neben der Viruseliminierung auch zu Zell- und Gewebestrukturbeschädigungen führen. Zu geringe Titer an neutralisierenden und stark aviden/affinen Antikörpern können eine unvollständige Viruseliminierung begünstigen. Es kann dadurch lediglich zu einem verzögerten Auftreten einer hohen Viruslast kommen. Eine starke humorale Immunantwort ist insbesondere bei Influenza A und dem Respiratorischen Syncytial Virus von entscheidender Bedeutung zur vollständigen Protektion durch Virusneutralisation.

Die Reduktion der unspezifischen Immunantworten auf Grund der VLP-Herstellung kann mit Hilfe der Umstellung auf ein zellfreies System oder dem Kultivieren der Zelllinien auf FKS-freiem Medium ermöglicht werden. Dadurch würden die Risiken der Vakzine weiter gesenkt. Weiterführende Analysen von Kombinationen der VLPs mit Adjuvantien oder unterschiedlichen Erstimmunisierungen können die traumatische Behandlung durch die DNA-Elektroporation unter Umständen komplett vermeiden und weitere Erkenntnisse zur Charakterisierung der RSV-M-basierten VLPs erzielen. RSV-M VLPs stellen somit einen vielversprechenden Impfstoffkandidaten als funktionale und effektive Vakzin-Plattform gegen Viren des Respirationstraktes dar.

## 7. Referenzen

- [1] **Modrow, S., Falke, D., Truyen, U. und Schätzl, H. (2010).** Molekulare Virologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [2] **Hall C. B. (2012).** The burgeoning burdon of respiratory syncytial virus among children. *Infectious Disorders Drug Targets* **12**: 92-97.
- [3] **Meissner H. C. and M. B. Rennels (2004).** Unpredictable patterns of viral respiratory disease in children. *Pediatrics* **113**: 1814-1816.
- [4a] **Falsey A. R., P. A. Hennessey, M. A. Formica, C. Cox und E. E. Walsh (2005).** Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *The New England Journal of Medicine* **352**: 1749-1759.
- [4b] **Raboni S. M., M. B. Nogueira, L. R. Tsuchiya, G. A. Takahashi, L. A. Pereira, R. Pasquini und M. M. Siqueira (2003).** Respiratory tract viral infections in bone marrow transplant patients. *Transplantation* **76**: 142-146.
- [4c] **Walsh E. E., A. R. Falsey und P. A. Hennessey (1999).** Respiratory syncytial and other virus infections in persons with chronic cardiopulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **160**: 791-795.
- [5] **World Health Organization (WHO) (2012).** Respiratory syncytial virus infections.
- [6] **Morris J. A., Blount J. R. und Savage R. E. (1956).** Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza (22538). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **92**: 544-549.
- [7] **Collins P. L. und Crowe J. E. (2007).** Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus. In *Fields Virology 5th Edition*, Knipe D. M., Howley P. M., Griffin D. E., Lamb R. A., Martin M. A., Roizman B. et al., Eds; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, pp. 1601-1646.
- [8] **Collins P. L. und Melero J. A. (2011).** Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years. *Virus Research* **162**: 80-99.
- [9] **Ghildyal R. und Meanger J. et.al (2002).** Respiratory syncytial virus matix protein associates with the nucleocapsids in infected cells. *Journal of General Virology*, **83**:753-757
- [10] **Collins P. L. und Murphy B.R. (1995).** Production of infectious human respiratory Syncytial Virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for the vaccine development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**:11563-11567.
- [11a] **Tripp R. A., Jones L., Haynes L., Zheng H., Murphy P und Anderson L. (2001).** CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G protein. *Nature Immunology* **2**: 732-738.

- [11b] Zhao X., Singh M., Malashkevich V. N. und Kim P. S. (2000). Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 14172-14177.
- [12] Bitko V., Shulyayeva O., Mazumder B., Musiyenko A., Ramaswami M., Look D. C. und Barik S. (2007). Nonstructural proteins of respiratory syncytial virus suppress premature apoptosis by an NF-kappaB-dependent, interferon-independent mechanism and facilitate virus growth. *Journal of Virology* **81**: 1786-1795.
- [13] Tayyari F., Marchant D., Moraes T. J., Duan W., Mastrangelo P. und Hegele R. G. (2011). Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. *Nature Medicine* **17**: 1132-1135.
- [14] Feldman S. A., Hendry R. M. und Beeler J. A. (1999). Identification of a linear heparin binding domain for human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G. *Journal of Virology* **73**: 6610-6617.
- [15] Verändert nach: [www.mucosis.com/syngem.php](http://www.mucosis.com/syngem.php) (Stand 01.10.14)
- [16] Chanock R., Roizman B. und Myers R. (1957). Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA) I. Isolation, properties and characterization. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **66**: 281-290.
- [17a] Munir S., Hillyer P., Le Nouen C., Buchholz U. J., Rabin R. L., Collins P. L. und Bukreyev A. (2011). Respiratory syncytial virus interferon antagonist NS1 protein suppress and skew the human T lymphocyte response. *PLoS Pathogens* **7**: e1001336.
- [17b] Anderson L. J. (2013). Respiratory syncytial virus vaccine development. *Seminars in Immunology* **25**: 160-171.
- [17c] Swedan S., Muiyenko A. und Barik S. (2009). Respiratory syncytial virus nonstructural proteins decrease levels of multiple members of the cellular interferon pathways. *Journal of Virology* **83**: 9682-9693.
- [17d] Swedan S., Andrews J., Majumdar T., Musiyenko A. und Barik S. (2011). Multiple functional domains and complexes of the two nonstructural proteins of human respiratory syncytial virus contribute to interferon suppression and cellular location. *Journal of Virology* **85**: 10090-10100.
- [17e] Kotelkin A., Belyakov I. M., Yang L., Berzovsky J. A., Collins P. L. und Bukreyev A. (2006). The NS2 protein of human respiratory syncytial virus suppresses the cytotoxic T-cell response as a consequence of suppressing the type I interferon response. *Journal of Virology* **80**: 5958-5967.
- [18] Bukreyev A., Yang L., Fricke J., Cheng L., Ward J. M., Murphy B. R. und Collins P. L. (2008). The secreted form of respiratory syncytial virus G glycoproteins helps the virus evade antibody-mediated restriction of replication by acting as an antigen decoy and through effects on Fc receptor-bearing leukocytes. *Journal of Virology* **82**: 12191-12204.
- [19] Fuentes S., Tran K. C., Luthra P., Teng M. N. und He B. (2007). Function of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein. *Journal of Virology* **81**: 8361-8366.

**[20a] Wu P. und Hartert T. V. (2011).** Evidence for a causal relationship between respiratory syncytial virus infection and asthma. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* **9**: 731-745.

**[20b] Coates H. V., Alling D. W. und Chanock R. M. (1966).** An antigenic analysis of respiratory syncytial virus isolates by a plaque reduction neutralization test. *American Journal of Epidemiology* **83**: 299-313.

**[21] World Health Organization.** Pandemic (H1N1) 2009—update 92. 2009 [zitiert am 06.10.2014]; Verfügbar unter: URL: [http://www.who.int/csr/don/2010\\_03\\_19/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2010_03_19/en/index.html).

**[22] Cox N. J. und Subbarao K. (2000).** Global epidemiology of influenza: past and present. *Annual Reviews of Medicine* **51**: 407-421.

**[23] Molinari N. A., Ortega-Sanchez I. R., Messonnier M. L., Thompson W. W., Wortley P. M., Weintraub E. und Bridges C. B. (2007).** The annual impact of seasonal influenza in the US: measuring disease burden and costs. *Vaccine* **25**: 5086–5096.

**[24] Dochez A., Mills K. und Kneeland Y. (1934-1935).** Studies of the etiology of influenza. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **30**:1017-1022.

**[25a] Smith W., Andrewes C. und Laidlaw P. (1933).** A virus obtained from influenza patients. *Lancet* **2**:66-68.

**[25b] Palese P. und Shaw M. L.:** Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe D. M. und Howley P. M., editors. *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2007. p. 1647-1690.

**[26] siehe 25a**

**[26a] Baudin F., Bach C., Cusack S., Ruigrok R. W. (1994).** Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *EMBO Journal* **13**: 3158–3165.

**[26b] Compans R. W., Content J. und Duesberg P. H. (1972).** Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus. *Journal of Virology* **10**: 795–800.

**[26c] Murti K. G., Webster R. G. und Jones I. M. (1988).** Localization of RNA polymerases on influenza viral ribonucleoproteins by immunogold labeling. *Virology* **164**: 562–566.

**[27] siehe [24], [26b] und [26c]**

**[27a] Chris Bickel,** *Science* Vol. 312, Seite 380, 21. April 2006.

**[28] Stevens J., Blixt O., Glaser L., Taubenberger J. K., Palese P., Paulson J. C., Wilson I. A. (2006).** Glycan microarray analysis of the hemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities. *Journal of Molecular Biology* **355**: 1143–1155.

**[29a] Matrosovich M., Zhou N., Kawaoka Y. und Webster R. (1999).** The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *Journal of Virology* **73**: 1146–1155.

- [29b] **Steinhauer D. A. (1999).** Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology* **258**: 1–20.
- [30] **Palese P., Tobita K., Ueda M. und Compans R. W. (1974).** Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology* **61**: 397–410.
- [31] **Chen W., Calvo P. A., Malide D., Gibbs J., Schubert U., Bacik I., Basta S., O'Neill R., Schickli J., Palese P., Henklein P., Bennink J. R. und Yewdell J. W. (2001).** A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nature Medicine* **7**: 1306–1312.
- [32] **Chen R. und Holmes E. C. (2006).** Avian influenza virus exhibits rapid evolutionary dynamics. *Molecular Biology and Evolution* **23**: 2336-2341.
- [33] **Dugan V. G., Chen R., Spiro D. J., Sengamalay N., Zaborsky J., Ghedin E., Nolting J., Swayne D. E., Runstadler J. A., Happ G. M., Senne D. A., Wang R., Slemmons R. D., Holmes E. C., und Taubenberger J. K. (2008).** The evolutionary genetics and emergence of avian influenza viruses in wild birds. *PLoS Pathogens* **4**: e1000076.
- [34] **Webster R. G., Bean W. J., Gorman O. T., Chambers T. M. und Kawaoka Y. (1992).** Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiology Reviews* **56**:152-719.
- [35] **Kim H. W., Canchola J. G., Brandt C. D., Pyles G., Chanock R. M., Jensen K. und Parrott R. H. (1969).** Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *American Journal of Epidemiology* **89**: 422–434.
- [36] **Baudin F., Bach C., Cusack S., Ruigrok R. W. (1994).** Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *EMBO Journal* **13**: 3158–3165.
- [37] siehe [36]
- [38] **Robert-Koch-Institut (2013) Empfehlung für Influenza-Impfstoff (Web-Page 15.09.14):**  
[http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2013/Ausgaben/36\\_37\\_13.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2013/Ausgaben/36_37_13.pdf?__blob=publicationFile)
- [39] **Chen R. und Holmes E. C. (2006).** Avian influenza virus exhibits rapid evolutionary dynamics. *Molecular Biology and Evolution* **23**: 2336-2341.
- [40] **Janeway G.A., Murphy, K., Travers, P. und Walport, M. (2009).** Janeway Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [41] **Abbas A.K., et al. Cellular and Molecular Immunology (2001).** Sauders W.B., 5<sup>th</sup> Edition.
- [42] **Kueng HJ, Schmetterer KG, Pickl WF. (2011).** Lipid rafts, pseudotyping, and virus-like particles: relevance of a novel, configurable, and modular antigen-presenting platform. *Int Arch Allergy Immunol.* **154**(2):89-110.

- [43] Yoo JK, Kim TS, Hufford MM, Braciale TJ. (2013). Viral infection of the lung: host response and sequelae. *J Allergy Clin Immunol.* 132(6):1263-76; Review.
- [44] Waris M. E., Tsou C., Erdman D. D., Zaki S. R. und Anderson L. J. (1996). Respiratory syncytial virus infection in BALB/c mice previously immunized with formalin-inactivated virus induces enhanced pulmonary inflammatory response with a Th2-like cytokine pattern. *Journal of Virology* 70: 2852–2860.
- [45a] Murphy B. R. und Walsh E. E. (1988). Formalin-inactivated respiratory syncytial virus vaccine induces antibodies to the fusion glycoprotein that are deficient in fusion-inhibiting activity. *Journal of Clinical Microbiology* 26: 1595-1597.
- [45b] Waris M. E., Tsou C., Erdman D. D., Day D. B. und Anderson L. J. (1997). Priming with live respiratory syncytial virus (RSV) prevents enhanced pulmonary inflammatory responses associated with formalin inactivated RSV immunization in BALB/c mice. *Journal of Virology* 71: 6935–6939.
- [45c] Delgado M. F., Coviello S., Monsalvo A. C., Melendi G. A., Hernandez J. Z., Batalle J. P., Diaz L., Trento A., Chang H.-Y., Mitzner W., Ravetch J., Melero J. A., Irusta P. M. und Polack F. P. (2009). Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease. *Nature Medicine* 15: 34-41.
- [45d] Openshaw P. J., Culley F. J. und Olszewska W. (2002). Immunopathogenesis of vaccine-enhanced RSV disease. *Vaccine* 20 (Suppl. 1): S27-S31.
- [46] Crowe J. E. Jr. und Williams J. V. (2003). Immunology of viral respiratory tract infection in infancy. *Paediatric Respiratory Reviews* 4: 112–119.
- [47] Shaw CA, Galarneau JR, Bowenkamp KE, Swanson KA, Palmer GA, Palladino G, Markovits JE, Valiante NM, Dormitzer PR, Otten GR (2013). The role of non-viral antigens in the cotton rat model of respiratory syncytial virus vaccine-enhanced disease. *Vaccine*;31: 306-312.
- [48] Mosmann, T.R., Coffman, R.L. (1989): TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual review of immunology* 7:145-173.
- [49] Swain, S.L., McKinstry, K.K., Strutt, T.M. (2012): Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses. *Nature reviews Immunology* 12:136-148.
- [50] Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., et al (1986): Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of immunology* 136:2348-2357.
- [51a] Commins, S.P., Borish, L., Steinke, J.W. (2010): Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125:S53-72.
- [51b] Crowe, C.R., Chen, K., Pociask, D.A.,(2009): Critical role of IL-17RA in immunopathology of influenza infection. *Journal of immunology*,183:5301-5310.



- [52] Bystrom J., Al-Adhoubi N., Al-Bogami M., Jawad A.S., Mageed R.A.(2013):Th17 lymphocytes in respiratory syncytial virus infection. *Viruses*. 5:777-791. Review.
- [53] Newcomb D.C., Boswell M.G., Sherrill T.P., Polosukhin V.V., Boyd K.L., Goleniewska K., Brody S.L., Kolls J.K., Adler K.B., Peebles R.S. Jr.(2013): IL-17A induces signal transducers and activators of transcription-6-independent airway mucous cell metaplasia. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 48:711-716.
- [54] Swain, S.L., McKinstry, K.K., Strutt, T.M.(2012): Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses. *Nature reviews Immunology*, 12:136-148.
- [55] Graham B. S., Bunton L. A., Wright P. F. und Karzon D. T. (1991). Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory syncytial virus in mice. *Journal of Clinical Investigation* 88: 1026–1033.
- [56] PATH RSV Vaccine Snapshot 2013. Website Stand Oktober 2014: <http://www.path.org/vaccineresources/details.php?i=1562>
- [57] Asatryan A., Pool V., Chen R.T., Kohl K.S., Davis R.L., Iskander J.K.; VAERS team. 2008:Live attenuated measles and mumps viral strain-containing vaccines and hearing loss: Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS), United States, 1990--2003. *Vaccine*. 26:1166-1172. Review.
- [58] Karron, R.A., Wright, P.F., Collins, P.L. et al. (2005). Identification of a recombinant live attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate that is highly attenuated in infants. *Journal of Infectious Disease*, 191:1093-1104.
- [59] Corti D., Suguitan A. L. Jr., Pinna D., Silacci C., Fernandez-Rodriguez B. M., Vanzetta F., Santos C., Luke C. J., Torres-Velez F. J., Temperton M. J., Weiss R. A., Sallusto F., Subbarao K. und Lanzavecchia A. (2010). Heterosubtypic neutralizing antibodies are produced by individuals immunized with a seasonal influenza vaccine. *Journal of Clinical Investigations* 120: 1663-1673.
- [60] Gerdil C. (2003). The annual production cycle for influenza vaccine. *Vaccine* 21: 1776–1779.
- [61] Ternette N., Tippler B., Überla K. und Grunwald T. (2007). Immunogenicity and efficacy of codon optimized DNA vaccines encoding the F-protein of respiratory syncytial virus. *Vaccine* 25: 7271–7279.
- [62] Grunwald T, Tenbusch M, Schulte R, Raue K, Wolf H, Hannaman D, de Swart RL, Überla K, Stahl-Hennig C. (2014). Novel vaccine regimen elicits strong airway immune responses and control of respiratory syncytial virus in nonhuman primates. *Journal of Virology*. 2014 88(8):3997-4007.
- [63] Bayer, W., Schimmer, S., Hoffmann, D., et al(2008): Evaluation of the Friend Virus model for the development of improved adenovirus-vectored anti-retroviral vaccination strategies. *Vaccine*, 26:716-726.
- [64] Holterman, L, Vogels, R, van der Vlugt, R, et al (2004): Novel replication-incompetent vector derived from adenovirus type 11 (Ad11) for vaccination and gene therapy: low seroprevalence and non-cross-reactivity with Ad5. *Journal of virology*, 78:13207-13215.

[65] Malykhina O., Yednak M.A., Collins P.L., Olivo P.D., Peeples M.E.(2011): A respiratory syncytial virus replicon that is noncytotoxic and capable of long-term foreign gene expression. *J Virol.*;85:4792-4801.

[66] Loomis R.J., Johnson P.R..(2013): Gene-based vaccine approaches for respiratory syncytial virus. *Curr Top Microbiol Immunol.* 372:307-324. Review.

[67] Kohlmann R., Schwannecke S., Tippler B., Ternette N., Temchura V., Tenbusch M., Überla K. und Grunwald T. (2009). Protective efficacy and immunogenicity of an adenoviral vector vaccine encoding the codon-optimized F protein of respiratory syncytial virus. *Journal of Virology* 83: 12601–12610.

[68] Tenbusch M., Grunwald T., Niezold T., Storcksdieck genannt Bonsmann M., Hannaman D., Norley S. und Überla K. (2010): Codon-optimization of the hemagglutinin gene from the novel swine origin H1N1 influenza virus has differential effects on CD4(+) T-cell responses and immune effector mechanisms following DNA electroporation in mice. *Vaccine* 28: 3273-3277.

[69] Ternette N., Stefanou D., Kuate, S., Überla K. und Grunwald T. (2007). Expression of RNA virus proteins by RNA polymerase II dependent expression plasmids is hindered at multiple steps. *Virology Journal* 4: 51.

[70] Stab V., Nitsche S., Niezold T., Storcksdieck genannt Bonsmann M., Wiechers A., Tippler B., Hannaman D., Erhardt C., Überla K., Grunwald T. und Tenbusch M. (2013). Protective efficacy and Immunogenicity of a Combinatory DNA Vaccine against Influenza A Virus and the Respiratory Syncytial Virus. *PLoS ONE* 8: e72217.

[71] Johnson J.E. und Chiu W. (2000). Structures of virus and viruslike particles. *Current Opinion in Structural Biology* 10: 229–235.

[72] Grgacic E. V. und Anderson D. A. (2006). Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods* 40: 60–65.

[73] Nagata, S. (1996): Fas-mediated apoptosis. *Advances in experimental medicine and biology*, 406:119-124.

[74] Wallach, D., Varfolomeev, E.E., Malinin, N.L., et al (1999): Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annual review of immunology*, 17:331-367.

[75]siehe [73]

[76] Fruh, K., Yang, Y.(1999): Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon gamma. *Current opinion in immunology*, 11:76-81.

[77] World Health Organization (WHO): HIV/AIDS. 2013  
<http://www.who.int/features/qa/71/en/index.html>] (04.09.2014)

[78] siehe [74]

[79] Rossey I., Sedeyn K., De Baets S., Schepens B., Saelens X. (2014): CD8- T cell immunity against human respiratory syncytial virus. *Vaccine*. S0264-410X(14)01221-3.

**[80] Anderson L.J., Graham B.S. (2014):** Challenges and opportunities for Respiratory syncytial virus vaccine. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Volume 372 Springer-Verlag

**[81] siehe [80]**

**[82] Raghunandan R., Lu H., Zhou B., Xabier M.G., Massare M.J., Flyer D.C., Fries L.F., Smith G.E., Glenn G.M.(2014).** An insect cell derived respiratory syncytial virus (RSV) F nanoparticle vaccine induces antigenic site II antibodies and protects against RSV challenge in cotton rats by active and passive immunization. *Vaccine*. **27**.

**[83] Mejias A. und Ramilo O. (2008).** Review of palivizumab in the prophylaxis of respiratory syncytial virus (RSV) in high-risk infants. *Biologics: Targets & Therapy* **2**: 433–439.

**[84] Resch B. (2014):** Respiratory Syncytial Virus Infection in High-risk Infants - an Update on Palivizumab Prophylaxis. *Open Microbiol J.*:**11**;**8**:71-77.

**[85] siehe [40] Kapitel: 3 143 ff**

**[86] siehe [40] Kapitel: 3 141 ff**

**[87] siehe [40] Kapitel:10 Seite 558 ff**

**[88] siehe [40] Kapitel: 1 Seite 43 ff**

**[89] siehe [40] Kapitel: 5 Seite 247 ff**

**[90] Eick A et al. (2008):** The role of neutralizing antibodies in protection of American Indian infants against respiratory syncytial virus disease. *Pediatr Infect Dis J*.

**[91] Stephenson I., Nicholson K. G., Colegate A., Podda A., Wood J., Ypma E., und Zambon M.(2003).** Boosting immunity to influenza H5N1 with MF59-adjuvanted H5N3 A/Duck/Singapore/97 vaccine in a primed human population. *Vaccine* **21**: 1687–1693.

**[92a] Wareing M. D. und Tannock G. A. (2001).** Live attenuated vaccines against influenza; an historical review. *Vaccine* **19**: 3320–3330.

**[92b] Parkin N. T., Chiu P. und Coelingh K. (1997).** Genetically engineered live attenuated influenza A virus vaccine candidates. *Journal of Virology* **71**: 2772–2778.

**[93] Atmar R. L., Keitel W. A., Patel S. M., Katz J. M., She D., El Sahly H., Pompey J., Cate T. R. und Couch R. B. (2006).** Safety and immunogenicity of nonadjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/H9N2 vaccine preparations. *Clinical Infectious Disease* **43**: 1135-1142.

**[94] Epstein S. L., Tumpey T. M., Misplon J. A., Lo C. Y., Cooper L. A., Subbarao K., Renshaw M., Sambhara S. und Katz J. M. (2002).** DNA vaccine expressing conserved influenza virus proteins protective against H5N1 challenge infection in mice. *Emerging Infectious Diseases* **8**: 796–801.

[95] siehe [68]

[96] Corti D., Suguitan A. L. Jr., Pinna D., Silacci C., Fernandez-Rodriguez B. M., Vanzetta F., Santos C., Luke C. J., Torres-Velez F. J., Temperton M. J., Weiss R. A., Sallusto F., Subbarao K. und Lanzavecchia A. (2010). Heterosubtypic neutralizing antibodies are produced by individuals immunized with a seasonal influenza vaccine. *Journal of Clinical Investigations* **120**: 1663-1673.

[97a] Oark M. H. und Chang J. (2012). Immunogenicity and Protective Efficacy of a Dual Subunit Vaccine against Respiratory Syncytial Virus and Influenza Virus. *Immune Network* **12**: 261-268.

[97b] Turner T. M., Jones L. P., Tompkins S. M. und Tripp R. A. (2013). A novel Influenza Virus Hemagglutinin-Respiratory Syncytial Virus (RSV) Fusion Protein Subunit Vaccine against Influenza and RSV. *Journal of Virology* **87**: 10792-10804.

[97c] Jennings G.T. und Bachmann M.F. (2007). Designing recombinant vaccines with viral properties: a rational approach to more effective vaccines. *Current Molecular Medicine* **7**: 143–155.

[98] Bachmann M. F. und Zinkernagel R. M. (1997). Neutralizing antiviral B-cell responses. *Annual Reviews of Immunology* **15**: 235–270.

[99] Richter A.-R. (2012). Immunogenität und Wirksamkeit von Virus-ähnlichen Partikeln (VLPs) mit Oberflächenproteinen des Respiratorischen Syncytialvirus im Maustiermodell. *Masterarbeit*, Ruhr-Universität Bochum.

[100] Deml L., Speth C., Dierich M. P., Wolf H. und Wagner R. (2005). Recombinant HIV-1 Pr55gag virus-like particles: potent stimulators of innate and acquired immune responses. *Molecular Immunology* **42**: 259–277.

[101] Kim K.S., Park S.A., Ko K.N., Yi S., Cho Y.J.(2014).:Current status of human papillomavirus vaccines. *Clin Exp Vaccine Res.* **2**:168-175. Review.

[102] Schirmbeck R., Böhm W. und Reimann J. (1996). Virus-like particles induce MHC class I restricted T-cell responses. Lessons learned from the hepatitis B small surface antigen. *Intervirology* **39**: 111–119.

[103] Soulié J. C., Devillier P., Santarelli J., Goudeau A., Vermeulen P., Guellier M. Saliou P., Hillion A. M., Tron F. und Huchet J. (1991). Immunogenicity and safety in newborns of a new recombinant hepatitis B vaccine containing the S and pre-S2 antigens. *Vaccine* **9**: 545–548.

[104] Landry N, Ward BJ, Trépanier S, Montomoli E, Dargis M, Lapini G und Vézina L. P. (2010). Preclinical and clinical development of plant-made virus-like particle vaccine against avian H5N1 influenza. *PLoS One* **5**: e15559.

[105] Nardin E. H., Oliveira G. A., Calvo-Calle J. M., Wetzel K., Maier C., Birkett A. J., Sarpotdar P., Corado M. L., Thornton G. B. und Schmidt A. (2004). Phase I testing of a malaria vaccine composed of hepatitis B virus core particles expressing Plasmodium falciparum circumsporozoite epitopes. *Infection and Immunity* **72**: 6519–6527.

- [106] Link A., Zabel F., Schnetzler Y., Titz A., Brombacher F., Bachmann M.F.(2012): Innate immunity mediates follicular transport of particulate but not soluble protein antigen. *J Immunol.*, **8**:3724-3733.
- [107] McGinnes L. W., Gravel K. A., Finberg R. W., Kurt-Jones E. A., Massare M. J., Smith G., Schmidt M. R. und Morrison T. G. (2011). Assembly and immunological properties of Newcastle disease virus-like particles containing the respiratory syncytial virus F and G proteins. *Journal of Virology* **85**: 366–77.
- [107b] Quan F. S., Kim Y., Lee S., Yi H., Kang S. M., Bozja J., Moore M. L. und Compans RW. (2011). Viruslike particle vaccine induces protection against respiratory syncytial virus infection in mice. *Journal of Infectious Diseases* **204**: 987–995.
- [108] Cusi, M.G., Zurbriggen R., Correale P., Valassina M., Terrosi C., Pergola L., Valensin P.E. und Glück R. (2002). Influenza virosomes are an efficient delivery system for respiratory syncytial virus-F antigen inducing humoral and cell-mediated immunity. *Vaccine* **20**: 3436-3442.
- [109] Pushko P. Tumpey T.M., Du F., Knell J., Robinson R. und Smith G. (2005). Influenza virus-like particles comprised of the HA,NA and M1 protein of H9N2 influenza virus induce protective immune responses in BALB/c mice. *Vaccine* **23**: 5751-5759.
- [110] Bright R.A., Carter D.M., Daniluk S., Toapanta F.R., Ahmad A., Gavrillov V., Massare M., Pushko P., Mytle N., Rowe T., Smith G. und Ross T.M. (2007). Influenza virus-like particles elicit broader immune responses than whole virion inactivated influenza virus of recombinant hemagglutinin. *Vaccine* **24**: 3871-3878.
- [111] Shaikh F.Y., Cox R.G., Lifland A.W., Hotard A.L., Williams J.V., Moore M.L., Santangelo P.J., Crowe J.E. Jr. (2012). A critical phenylalanine residue in the respiratory syncytial virus fusion protein cytoplasmic tail mediates assembly of internal viral proteins into viral filaments and particles. *MBio.* **3**
- [112] Drees B. (2014) Masterarbeit: Immunogenität und Wirksamkeit einer neuartigen Kombinationsvakzine auf Basis Virus-ähnlicher Partikel gegen das Respiratorische Syncytialvirus und das Influenzavirus im Mausmodel. (Ruhr-Uni-Bochum, Abt.f.mol.&med.Virologie)
- [113] Magro M., Mas V., Chappell K., Vázquez M., Cano O., Luque D., Terrón M. C., Melero J. A. und Palomo C. (2012). Neutralizing antibodies against the preactive form of respiratory syncytial virus fusion protein offer unique possibilities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 3089-3094.
- [114] siehe [70]
- [115] Openshaw P.J. (2013). The mouse model of respiratory syncytial virus disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* **372**:359-369.
- [116] Ng J.K., Zhang S.L., Tan H.C., Yan B., Maria Martinez Gomez J., Tan W.Y., Lam J.H., Tan G.K., Ooi E.E., Alonso S. (2014) First experimental in vivo model of enhanced dengue disease severity through maternally acquired heterotypic dengue antibodies. *PLoS Pathog.*

- [117] Rosenberg H.F., Dyer K. D. und Domachowske J.B. (2009). Resoiratory viruses and eosinophiles: exploring the connections. *Antiviral Research* **83**: 1–9.
- [118] Elsabahy M, Foldvari M. (2013). Needle-free gene delivery through the skin: an overview of recent strategies. *Curr Pharm Des.* **19**:7301-7315. Review.
- [119] Nabi G., Storcksdieck genannt Bonsmann M., Tenbusch M., Gardt O., Barouch D. H., Temchura V. und Überla K. (2013). GagPol-specific CD4<sup>+</sup> T-cell increase the antibody response to Env by intrastructural help. *Retrovirology* **10**: 117.
- [120] Kurt-Jones E. A., Popova L., Kwinn L., Haynes L. M., Jones L. P., Tripp R. A., Walsh E. E., Freeman M. W., Golenbock D. T., Anderson L. J. und Finberg R. W. (2000). Pattern recognition receptors TLR 4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nature Immunology* **1**: 398-401.
- [121] Fretzayas A., Papadopoulou A., Kotzia D., Moustaki M., (2012). The recent progress in RSV vaccine technology. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.***7**:237-241. Review.
- [122] Mastrangelo P., Hegele R.G. (2013). RSV fusion: time for a new model. *Viruses*; **5**:873-885. Review.
- [123a] Voraphani N., Stern D.A., Wright A.L., Guerra S., Morgan W.J., Martinez F.D..(2014). Risk of current asthma among adult smokers with respiratory syncytial virus illnesses in early life. *Am J Respir Crit Care Med.* 190(4):392-398.
- [123b] Knudson C.J., Varga S.M. (2014). The Relationship Between Respiratory Syncytial Virus and Asthma. *Vet Pathol.*
- [124] NIH <http://www.niaid.nih.gov/topics/rsv/understanding/pages/quickfacts.aspx> (Stand vom 10.09.2014)
- [125] DeMuth P.C., Min Y., Huang B., Kramer J.A., Miller A.D., Barouch D.H., Hammond P.T., Irvine D.J.(2013). Polymer multilayer tattooing for enhanced DNA vaccination., *Nat Mater.* **12**:367-376.

## 8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: Aufbau eines RSV Partikels	6
Abbildung 2: Aufbau eines Influenza A Virus Partikels	9
Abbildung 3: Phasen der adaptiven Immunantwort auf das Einwirken eines unbekanntes Antigenes	12
Abbildung 4: Übersicht RSV Vakzinkandidaten	15
Abbildung 5: Schematische Darstellung eines infektiösen RSV-Viruspartikels und einem RSV-M basierten Virus-ähnlichen Partikel	22
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Pseudotypisierung von lentiviralen HIV Partikeln mit RSV-Oberflächenproteinen	48
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Deletionskonstrukte RSV-F und RSV-G	49
Abbildung 8: Transduktionsfähigkeit pseudotypisierter lentiviraler Partikel von verschiedenen Zelllinien	52
Abbildung 9: Inhibition von pseudotypisierter lentiviraler Partikel	53
Abbildung 10: Transduktionsfähigkeit pseudotypisierter lentiviraler Partikel	54
Abbildung 11: Protein Charakterisierung der VLP Vakzine mittels Coomassie-Färbung	55
Abbildung 12: Protein Charakterisierung der VLP Vakzine mittels Western-Blot	56
Abbildung 13: Zeitlicher Immunisierungsverlauf	57
Abbildung 14: RSV spezifische neutralisierende Antikörper mittels Neutralisationstest	59
Abbildung 15: RSV spezifische IgA Antikörper mittels ELISA	60
Abbildung 16: RSV-RNA Kopienzahl mittels RSV-spezifischer q-RT-PCR nach Belastungsinfektion	61
Abbildung 17: RSV spezifische neutralisierende Antikörper mittels Neutralisationstest	64
Abbildung 18: RSV-RNA Kopienzahl mittels RSV-spezifischer q-RT-PCR nach Boost Immunisierung (LH)	65
Abbildung 19: RSV-RNA Kopienzahl mittels RSV-spezifischer q-RT-PCR nach Boost Immunisierung (BAL)	66
Abbildung 20: Zytokinexpression von CD4+-Zellen aus der Milz mittels FACS Analyse 7 Tage nach zweiter Immunisierung	68
Abbildung 21: Zytokinstatus von CD8+-Zellen aus der Milz nach F-Peptidstimulation und Analyse mittels FACS 7 Tage nach zweiter Immunisierung	69

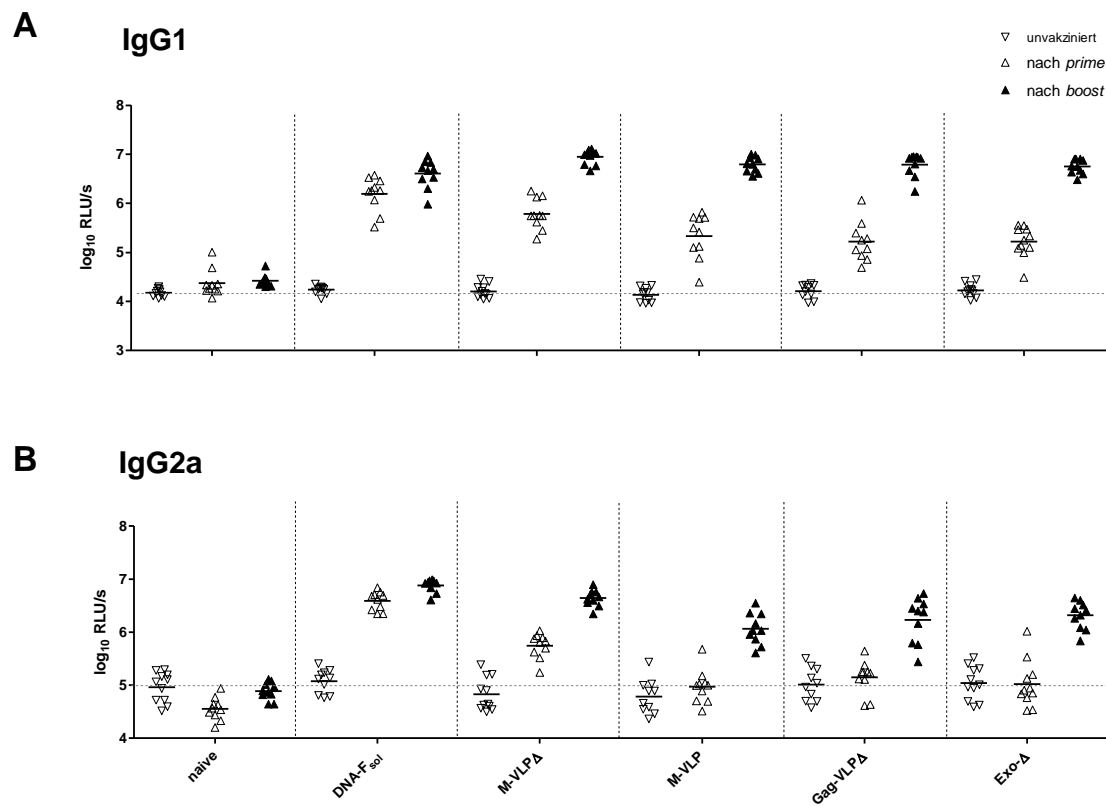
Abbildung 22: RSV spezifische neutralisierende Antikörper mittels Neutralisationstest	70
Abbildung 23: RSV-RNA Kopienzahl mittels RSV-spezifischer q-RT-PCR nach Boost Immunisierung (LH)	71
Abbildung 24: RSV spezifische neutralisierende Antikörper mittels Neutralisationstest	73
Abbildung 25: RSV spezifische IgA Antikörper mittels ELISA	74
Abbildung 26: RNA Kopienzahl mittels spezifischer q-RT-PCR nach Immunisierung	75
Abbildung 27: Zytokinexpression von CD4+-Zellen aus der Milz nach spezifischer Peptid-Stimulation mittels intrazellulärer Zytokinfärbung und FACS Analyse 7 Tage nach zweiter Immunisierung	77
Abbildung 28: Zytokinexpression von CD8+-Zellen aus der Milz nach spezifischer Peptid-Stimulation mittels intrazellulärer Zytokinfärbung und FACS Analyse 7 Tage nach zweiter Immunisierung	77
Abbildung 29: Spezifität der Serum-Antikörper mittels FACS-basiertem Antikörperbindungstest	80
Abbildung 30: Influenza und RSV spezifische neutralisierende Antikörper mittels Neutralisationstest	81
Abbildung 31: Gewichtsverlauf der Mäuse nach intra nasaler Belastungsinfektion	82
Abbildung 32: RSV und IVA spezifische IgA Antikörper mittels ELISA	83
Abbildung 33: RNA Kopienzahl mittels spezifischer q-RT-PCR nach Immunisierung	85

Seite

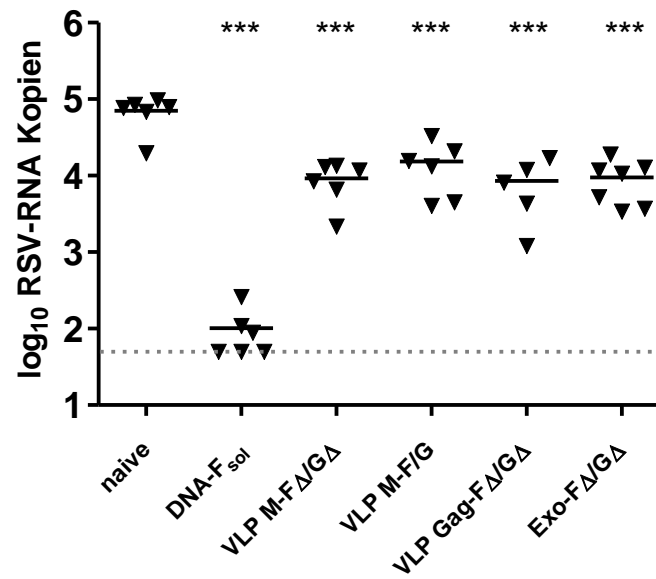
Tabelle 1: Transduktionsfähigkeit pseudotypisierter lentiviraler Partikel	50
Tabelle 2: HIV-Gag Konzentration im Vergleich zum Transduktionstiter von pseudotypisierter lentiviraler Partikel	51
Tabelle 3: Immunisierungsschema für Immunisierung mit VLPs	58
Tabelle 4: Immunisierungsschema für Immunisierung mit VLPs und RSV f.i.	63
Tabelle 5: Immunisierungsschema für Immunisierung mit VLPs nach rek.F-Protein	67
Tabelle 6: Immunisierungsschema für Vakzinierung mit VLPs nach DNA Immunisierung	77
Tabelle 7: Immunisierungsschema für Vakzinierung mit VLPs nach DNA Immunisierung gegen IVA und RSV	79



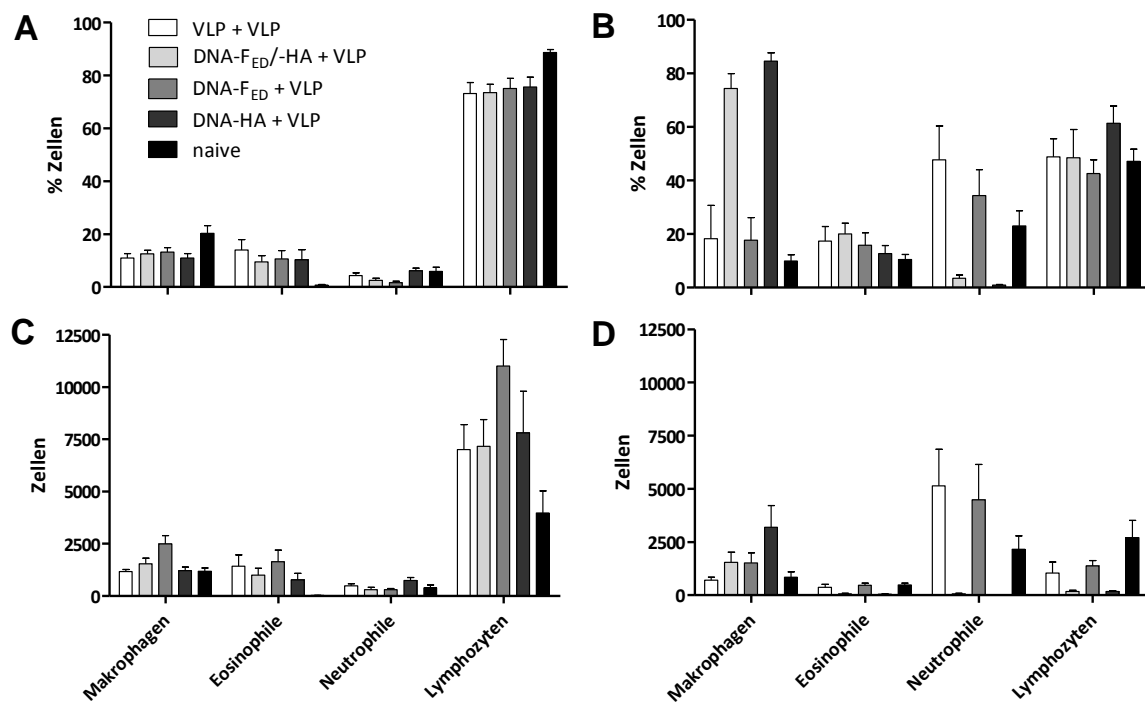
## 9. Anhang



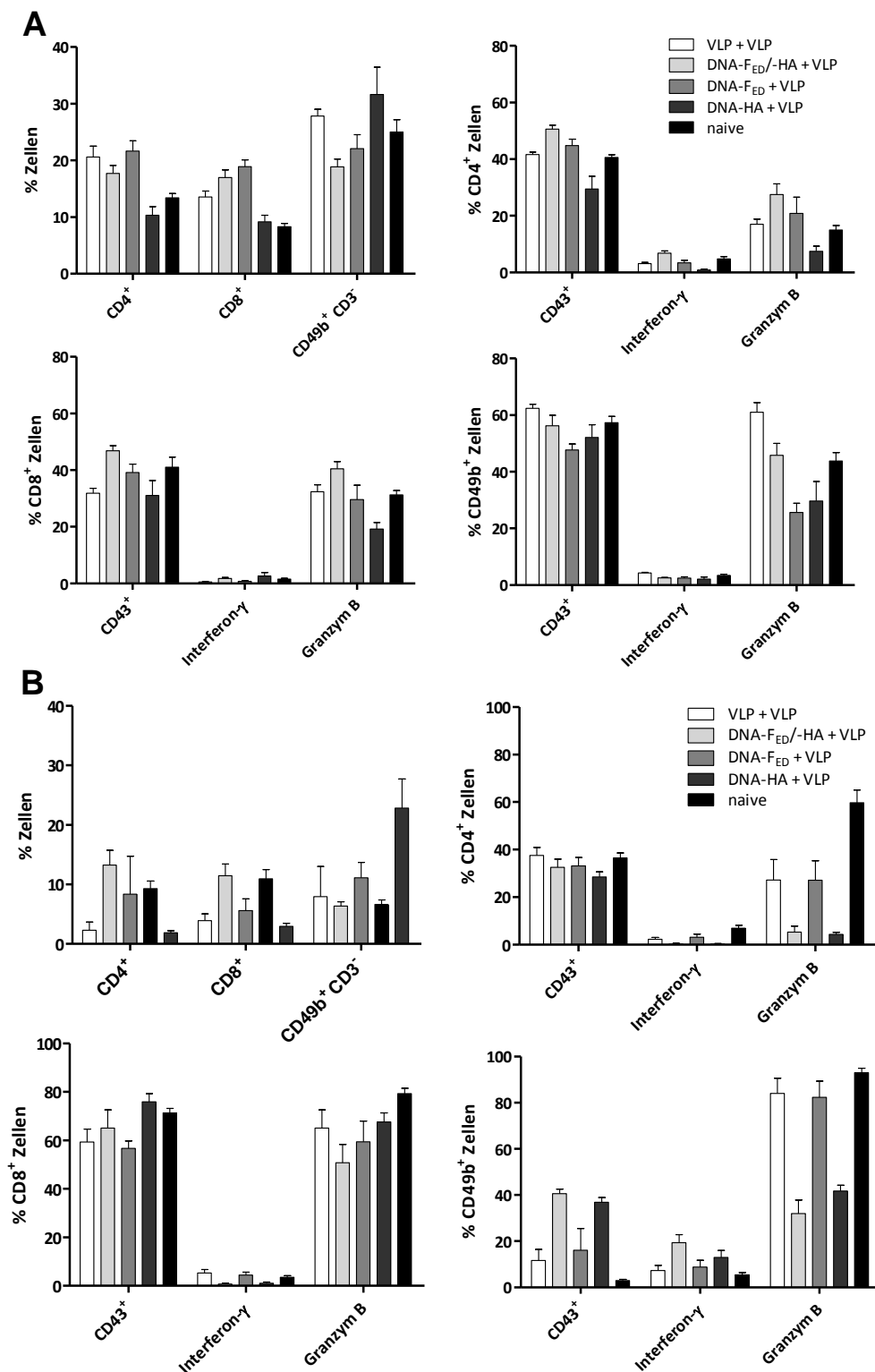
**Abbildung 34: IgG1 und IgG2a Antworten nach Immunisierung.** Die Detektion der RSV-spezifischen IgG1(A) und IgG2a (B) Antworten in den Seren der Mäuse nach *Prime* und nach *Boost* Immunisierung erfolgte im ELISA über polyklonale Antikörper. Aufgetragen sind die  $\log_{10}$  transformierten Werte der einzelnen Mäuse in relativen Lichteinheiten (RLU) pro Sekunde und der zugehörige arithmetischen Mittelwert. n=10.



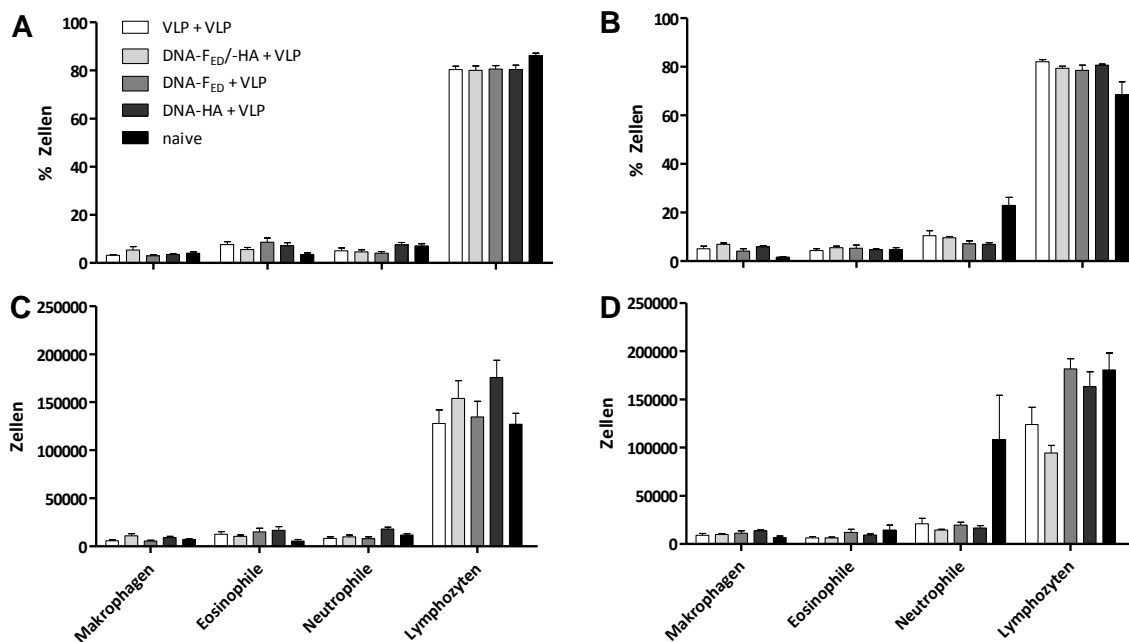
**Abbildung 35: RSV-RNA Kopienzahl mittels RSV-spezifischer q-RT-PCR.** Die isolierte RNA aus der BAL wurde mittels RT-PCR analysiert. Die entsprechende Vakzinierung ist jeweils angegeben. Hierbei ist eine *Prime-Boost* Immunisierung im Abstand von 4 Wochen durchgeführt worden. Die gestrichelte Linie stellt das Detektionslimit der Messung dar, welches 50 Kopien beträgt. Es ist der Mittelwert angegeben. \*\*\*= $p < 0.05$  One-Way-ANOVA mit Tukey-Posttest im Vergleich zur unvakzinierten Kontrollgruppe.  $n=6$ .



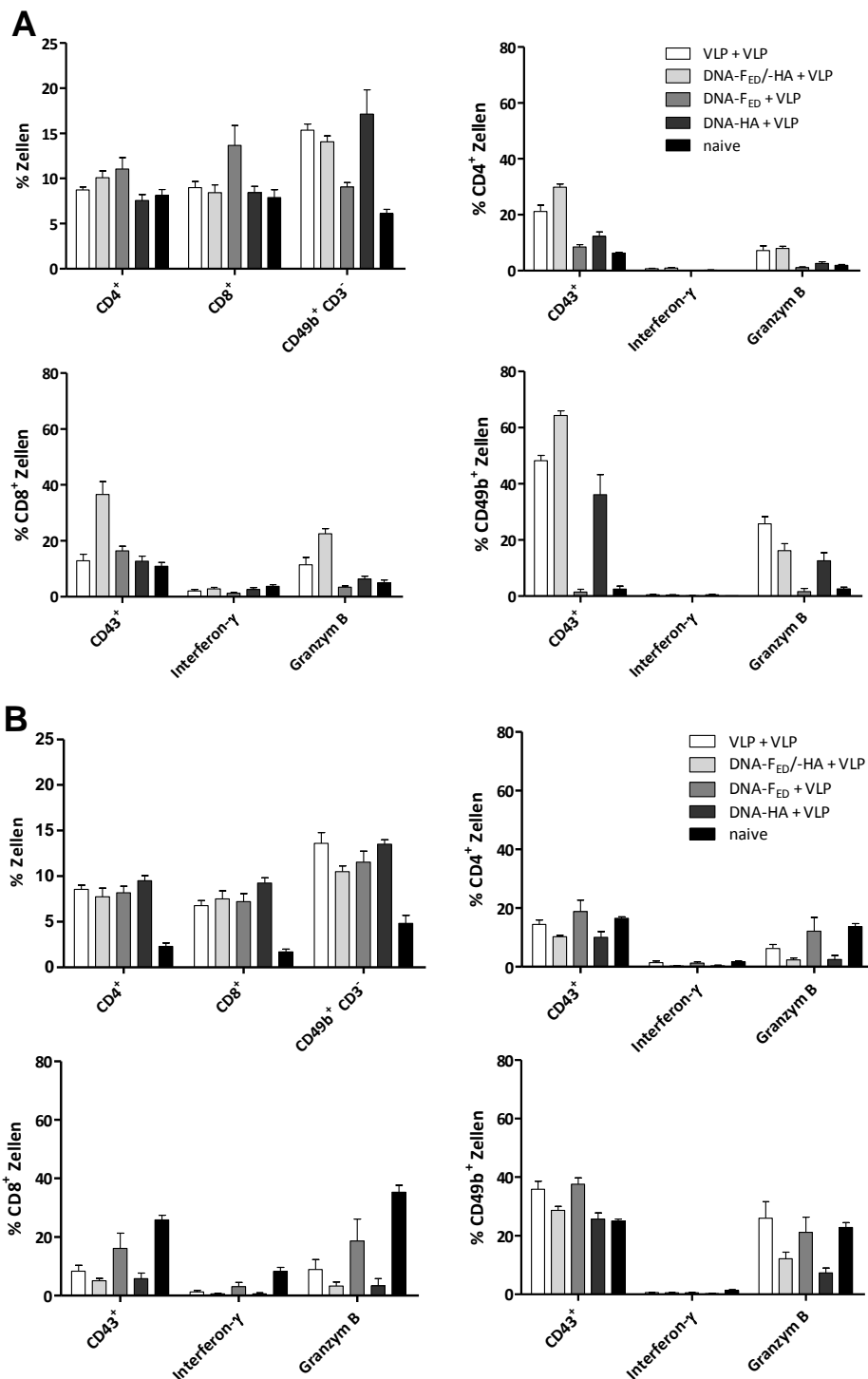
**Abbildung 36: Immunzellen in der BAL.** Die Makrophagen, Eosinophilen Granulozyten, Neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten in der Mäuse BAL wurden mittels Durchflusszytometrie gezählt. **A+B:** Prozent Zellen in der BAL der mit RSV A2 (**A**) oder mit Influenza PR8 (**B**) infizierten Mäuse. **C+D:** Absolute Zellzahlen der BAL der mit RSV A2 (**C**) oder mit Influenza PR8 (**D**) infizierten Mäuse. Dargestellt ist der Mittelwert der 6 bzw. 5 Mäuse jeder Gruppe mit dem zugehörigen Standardfehler.



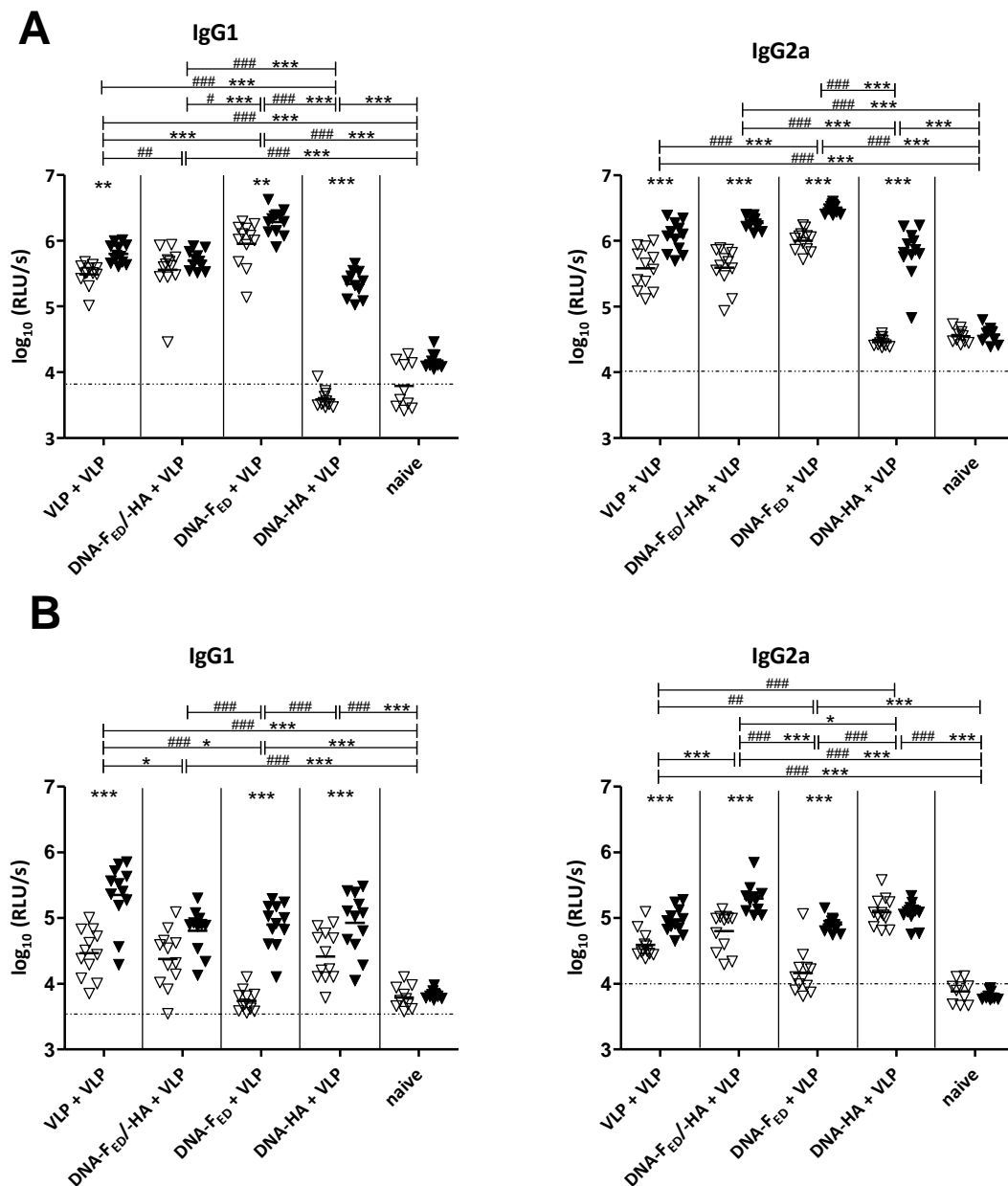
**Abbildung 37: Aktivierungsstatus der BAL Lymphozyten.** Die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, sowie die Natürlichen Killerzellen (CD49b<sup>+</sup>) in der BAL wurden mittels Durchflusszytometrie gezählt und prozentual aufgetragen. Der Aktivierungsstatus der Zellen wurde anhand der drei Marker CD43, Interferon- $\gamma$  und Granzym B bestimmt. **A:** BAL Lymphozyten der RSV A2 infizierten Mäuse. **B:** BAL Lymphozyten der Influenza PR8 infizierten Mäuse. Aufgetragen sind die Mittelwerte der Gruppen aus 6 bzw. 5 Mäusen mit dem zugehörigen Standardfehler.



**Abbildung 38: Immunzellen in der Lunge.** Die Makrophagen, Eosinophile Granulozyten, Neutrophile Granulozyten und Lymphozyten in den Mäuselungen wurden mittels Durchflusszytometrie gezählt. **A+B:** Prozent Zellen in der Lunge der RSV A2 (**A**) oder Influenza PR8 (**B**) infizierten Mäuse. **C+D:** Prozent Zellen in der Lunge der RSV A2 (**C**) oder Influenza PR8 (**D**) infizierten Mäuse. Dargestellt sind die Mittelwerte der 6 bzw. 5 Mäuse jeder Gruppe mit den zugehörigen Standardfehlern.



**Abbildung 39: Aktivierungsstatus der alveolären Lymphozyten nach Infektion mit RSV oder Influenza.** Die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, sowie die Natürlichen Killerzellen (CD49b<sup>+</sup>) in der BAL wurden mittels Durchflusszytometrie gezählt und prozentual aufgetragen. Der Aktivierungsstatus der Zellen wurde anhand der drei Marker CD43, Interferon- $\gamma$  und Granzym B gemessen. **A:** Alveoläre Lymphozyten der RSV A2 infizierten Mäuse. **B:** Alveoläre Lymphozyten der Influenza PR8 infizierten Mäuse. Dargestellt sind die Mittelwerte der 6 bzw. 5 Tiere der Gruppen mit den zugehörigen Standardfehlern. Es ist der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.



**Abbildung 40: IgG1 und IgG2a Antworten nach Immunisierung.** Die Detektion der RSV- (A) und Influenza-spezifischen (B) IgG1 und IgG2a Antworten in den Seren der Mäuse nach *Prime* (offene Dreiecke) und nach *Boost* (geschlossene Dreiecke) Immunisierung erfolgte im ELISA über polyklonale Antikörper. Die gepunktete Linie markiert das Detektionslimit. Die Antikörper Antworten der *Boost* Seren aller Gruppen weichen signifikant von denen der naiven Gruppe ab ( $p < 0,001$ ). Aufgetragen sind die  $\log_{10}$  transformierten Werte der einzelnen Mäuse in relativen Lichteinheiten (RLU) pro Sekunde und der zugehörige arithmetischen Mittelwert. Die Signifikanz der Differenzen zwischen *Prime* und *Boost* Immunisierung ist über den Gruppen mit \* markiert. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen ist bei der *Prime* Immunisierung mit # und bei der *Boost* Immunisierung mit \* markiert. ###/\*\*\* $p < 0,001$ ; ##/\*\* $p < 0,01$ ; #/\* $p < 0,05$ .  $n = 12$ .

## 10. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
nm	Nanometer
Bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	<i>Dulbecco's modified-eagles medium</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (fetales Kälberserum)
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasen
ml	Milliliter
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p.a.	pro analysis
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PEI	Polyethylenimin
P/S	Penicillin/Streptomycin
sek	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan



## 11. Danksagung

Danke sagt man eigentlich im Leben viel zu selten und somit möchte ich diese Stelle nutzen, um mich bei einigen Menschen zu bedanken, welche mir in meinem Leben zur Seite stehen/gestanden haben und diese Arbeit erleichtert haben.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Überla, für die Möglichkeit diese Dissertation an seinem Lehrstuhl anzufertigen und der DFG für das an mich vergebene Graduierten Kollegs Stipendium.

Ein großes Dankeschön geht für die direkte Betreuung und die ständige Diskussionsbereitschaft an Dr. Thomas Grunwald, ohne ihn gäbe es diese Arbeit sicherlich nicht in dieser Form.

Ein weiterer Dank geht natürlich an das Laborteam, ohne euch Bettina, Bianca, Bastian, Nadine, Andrea, Thomas und natürlich Anna und Britta wäre der Laboralltag nur halb so schön gewesen. Es ist toll mit euch zu arbeiten und von euch lernen zu dürfen. Anna und Britta möchte ich an dieser Stelle noch einmal herzlichst für ihre Mühen und den Arbeitseinsatz im Rahmen ihrer Masterarbeiten danken, diese Arbeiten sind ein Bestandteil der vorliegenden Dissertation geworden

Ein besonderer Dank geht natürlich auch an die gesamte Arbeitsgruppe. Vielen Dank Thomas für die unermüdliche Hilfe beim FACS. Michael und Matthias danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft.

An dieser Stelle möchte ich auch meinen Freunden danken, ohne euch wäre das Studium und die Disseration schwer geworden. Besonders herzlichst möchte ich mich bei Inga& Pepper bedanken, die in jeder Lebenslage ein offenes Ohr und ein Sofa für mich hatten.

Meinen Großeltern gilt ein ganz herzlicher Dank, denn ohne ihre Geduld mit mir wäre ich wohl nicht da wo ich nun bin. Danke liebe Oma und in Gedanken auch lieber Opa. Meinem Freund möchte ich an dieser Stelle auch danken, DANKE das es dich gibt.

Das letzte und größte Dankeschön geht an meine Mama, die leider den Abschluss meines Studiums und der nachfolgenden Dissertation nicht mehr erleben konnte. Du warst die beste Mama auf der Erde! Sie gab mir einen Spruch mit auf den Weg und dieser begleitet mich nun Tag täglich:

***Es dreht sich die Erde um des Menschen Geschick,  
es wechselt die Freude es wechselt das Glück!***

***Und wenn es Dir schlecht geht verlier NIE den Mut,  
es wechselt ja wieder und wird wieder gut!***