

**„Das Interleukin-1 $\beta$  Rezeptor-Homolog im Modifizierten Vakziniavirus Ankara  
(MVA) - Charakterisierung und möglicher Einfluss auf MVA-basierte Impfvektoren“**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz  
(D77)

Stefan Zimmerling  
geboren in Rüsselsheim

Mainz, den 11.04.2011

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 16.06.2011

*Meiner Familie*

---

1. EINLEITUNG	8
1.1. Das Modifizierte Vakziniavirus Ankara (MVA)	8
1.1.1. Einordnung von MVA in die Familie der Pockenviren	8
1.1.2. Entstehung von MVA	9
1.1.3. Replikationszyklus von Vakziniaviren	10
1.1.3.1. Eintritt des Virus in die Zelle	11
1.1.3.2. Virale Genexpression	12
1.1.3.3. Morphogenese und Produktion neuer Virionen	13
1.1.3.4. Replikationsdefizienz von MVA	14
1.1.4. Verwendung von MVA als Impfstoff	15
1.2. Immunmodulatoren in MVA	16
1.3. Das Interleukin-1 $\beta$ Rezeptor-Homolog von MVA	18
1.4. Interleukin-1 $\beta$	19
1.4.1. Überblick und Eigenschaften	19
1.4.2. Rolle von IL-1 $\beta$ im Kontext viraler Infektionen	21
1.5. Zielsetzung	23
2. MATERIALIEN UND METHODEN	24
2.1. Materialien	24
2.1.1. Reagenzien	24
2.1.2. Puffer und Lösungen	26
2.1.3. Geräte + Hilfsmittel	29
2.1.4. Kits	30
2.1.5. Virusstämme	31
2.1.6. Mausstämme	32
2.1.7. Zellkulturmedien und -zusätze	32
2.1.8. Zelllinien und Medien	33
2.1.9. unmarkierte Antikörper	36
2.1.10. markierte Antikörper	36
2.1.11. MHC-Klasse I-Multimere	37
2.1.12. Enzyme	37
2.1.13. Bakterienstämme	38
2.1.14. Peptide	38
2.2. Methoden	39
2.2.1. Mikrobiologische Methoden	39
2.2.1.1. Transformation von <i>E. coli</i>	39
2.2.1.2. Animpfen von Flüssigkulturen zur Präparation von Plasmid-DNA	39
2.2.2. DNA-Methoden	40
2.2.2.1. Isolation von Plasmid-DNA	40
2.2.2.2. Isolation von viraler DNA	40
2.2.2.2.1. Isolation viraler DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion	40
2.2.2.2.2. Isolation viraler DNA mittels DNeasy Blood & Tissue-Kit	41

---

---

2.2.2.3. Restriktionsverdau	41
2.2.2.4. Restriktionskartierung von genomischer Virus-DNA	41
2.2.2.5. DNA-Agarosegelelektrophorese	42
2.2.2.6. Aufreinigung von PCR-Produkten und DNA aus Agarosegelen	42
2.2.2.7. PCR-Methoden	43
2.2.2.7.1. PCR mit Taq-Polymerase	43
2.2.2.7.2. PCR mit Proofreading-Polymerase für Klonierungen	43
2.2.2.8. DNA-Sequenzierung	43
2.2.2.9. Dephosphorylierung	44
2.2.2.10. Ligation	44
2.2.3. Proteinbiochemische Methoden	44
2.2.3.1. Herstellung von Proteinpräparationen aus kultivierten Zellen	44
2.2.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration	45
2.2.3.3. Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	45
2.2.3.4. Coomassie-Färbung	45
2.2.3.5. Silberfärbung	46
2.2.3.6. <i>Western Blot</i>	46
2.2.3.6.1. Tank-Blot	46
2.2.3.6.2. Semi-Dry Blot	46
2.2.3.7. Nachweis Membran-immobilisierter Proteine	47
2.2.3.7.1. Fluoreszenznachweis	47
2.2.3.7.2. Lumineszenznachweis	47
2.2.4. Zellkulturtechniken	48
2.2.4.1. Einfrieren und Auftauen von Zellen	48
2.2.4.2. Bestimmung der Zellzahl	48
2.2.4.3. Präparation von Hühnerembryofibroblasten (engl. <i>chicken embryo fibroblasts</i> , CEF)	48
2.2.4.4. Präparation von Milzzellen	49
2.2.4.5. Präparation von Blutzellen	49
2.2.4.6. Präparation von Peritonealzellen	50
2.2.4.7. Differenzierung von Makrophagen und dendritischen Zellen aus Maus-Knochenmarkszellen	50
2.2.5. Virologische Techniken	51
2.2.5.1. Infektion von Zellen mit MVA	51
2.2.5.2. Herstellung rekombinanter Viren mittels K1L-Selektion	52
2.2.5.2.1. Infektion und Transfektion	54
2.2.5.2.2. Blindpassage	54
2.2.5.2.3. Passagierung auf RK13-Zellen (Wildtyp-Elimination)	54
2.2.5.2.4. Passagierung auf CEF-Zellen (K1L-Elimination)	55
2.2.5.2.5. Amplifikation und Überprüfung der Virusklone	55
2.2.5.3. Virusamplifikation und Aufreinigung für den experimentellen Gebrauch	56
2.2.5.4. Bestimmung des Virustiters	57
2.2.5.5. Wachstumsanalyse	58
2.2.5.5.1. Einstufen-Wachstumsanalyse	58
2.2.5.5.2. Mehrstufen-Wachstumsanalyse	58
2.2.5.6. Expressionsanalyse durch <sup>35</sup> S-Markierung viraler Proteine	58
2.2.6. Immunologische Techniken	59
2.2.6.1. ELISA	59

---

---

2.2.6.1.1. ELISA-Nachweis von murinem Interleukin-1 $\beta$	59
2.2.6.1.2. ELISA-Nachweis von murinem Interleukin-7 und Interleukin-15	60
2.2.6.1.3. Paralleler Nachweis mehrerer Zytokine mittels Multiplex-ELISA	60
2.2.6.1.4. Nachweis Vakzinia-spezifischer Antikörper	60
2.2.6.2. Nachweis von bioaktivem, humanem Interleukin-1 $\beta$ durch Reporterassay	61
2.2.6.3. ELISPOT für Interferon- $\gamma$	61
2.2.6.4. Intrazelluläre Zytokinfärbung (ICS) für Interferon- $\gamma$	62
2.2.6.5. B8-Pentamerfärbung	63
2.2.7. Arbeiten im Tiermodell	63
2.2.7.1. Narkotisierung und Töten von Mäusen	63
2.2.7.2. Immunisierung von Mäusen	64
2.2.7.3. Blutentnahme bei Mäusen	64
3. ERGEBNISSE	65
3.1. Konstruktion des Virus MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev	65
3.1.1. Klonierung des Transferplasmids pIII IL-1 $\beta$ R rev lacZ2	65
3.1.2. Herstellung des Virus durch homologe Rekombination	66
3.2. Viruscharakterisierung	68
3.2.1. Restriktionskartierung	68
3.2.2. $^{35}$ S-Markierung viraler Proteine zur Analyse der viralen Proteinsynthese	69
3.2.3. Wachstumsanalyse	71
3.2.4. Nachweis der Expression des MVA IL-1 $\beta$ -Rezeptors mittels eines spezifischen Antikörpers	72
3.2.5. Nachweis der Expression und Funktionalität des MVA IL-1 $\beta$ -Rezeptors in murinen und humanen Zellen	73
3.3. Einfluss des viralen IL-1 $\beta$ -Rezeptors auf die Induktion und Sekretion von IL-1 $\beta$ in murinen Zellen <i>in vitro</i>	75
3.3.1. Induktion von IL-1 $\beta$ und Rolle des IL-1 $\beta$ R in knochenmarksabgeleiteten myeloiden dendritischen Zellen	76
3.3.2. Induktion von IL-1 $\beta$ und Rolle des IL-1 $\beta$ R in knochenmarksabgeleiteten Makrophagen	79
3.3.3. Induktion von IL-1 $\beta$ in <i>ex vivo</i> rekultivierten Zellen einer Peritoneallavage	81
3.3.4. Induktion von weiteren Zytokinen in knochenmarksabgeleiteten, myeloiden dendritischen Zellen	82
3.3.5. Einfluss des viralen IL-1 $\beta$ -Rezeptors auf die Induktion und Sekretion von IL-1 $\beta$ in humanen Zellen <i>in vitro</i>	84
3.3.5.1. Induktion von IL-1 $\beta$ in stimulierten THP-1 Zellen	84
3.4. Einfluss des viralen IL-1 $\beta$ -Rezeptors <i>in vivo</i>	86
3.4.1. Induktion von IL-1 $\beta$ und anderen Zytokinen <i>in vivo</i>	86
3.4.2. Induktion von Antikörpern	89
3.4.3. Voranalyse der T-Zell-Antwort in C57BL/6N-Mäusen	90
3.4.4. Induktion von spezifischen T-Zellen in der Akut- und Gedächtnisphase	92
3.4.4.1. Kinetik der peripheren, MVA-spezifischen T-Zell-Antwort	92
3.4.4.2. Vergleich spezifischer T-Zellen in sekundären, lymphoiden Organen und in der Peripherie	96

---

---

3.4.4.3. Induktion von spezifischen Gedächtnis-T-Zellen	98
3.4.5. Einfluss des viralen IL-1 $\beta$ -Rezeptors auf die Apoptoserate von T-Zellen	100
3.4.6. Einfluss des viralen IL-1 $\beta$ -Rezeptors auf die Zytotoxizität spezifischer T-Zellen	101
4. DISKUSSION	106
4.1. Das IL-1 $\beta$ Rezeptor-Homolog von MVA bindet rekombinantes und endogenes IL-1 $\beta$	106
4.2. MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R induziert IL-1 $\beta$ nach Infektion Antigen-präsentierender und phagozytischer Zellen	107
4.3. Die Induktion von IL-1 $\beta$ durch MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R hat keinen Einfluss auf die Sekretion weiterer proinflammatorischer Zytokine	112
4.4. Die Deletion des MVA IL-1 $\beta$ Rezeptors beeinflusst die Gedächtnis-T-Zellantwort nach Immunisierung von Mäusen	114
4.5. Eignung von MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R als Impfstoff	119
5. ZUSAMMENFASSUNG	120
6. LITERATURANGABEN	122
7. ANHANG	139
7.1. Plasmide	139
7.2. Oligonukleotide	140
7.3. Abkürzungen	141
7.4. Abbildungen	145
7.5. Tabellen	148
8. DANKSAGUNG	149
9. LEBENSLAUF	151

## 1. EINLEITUNG

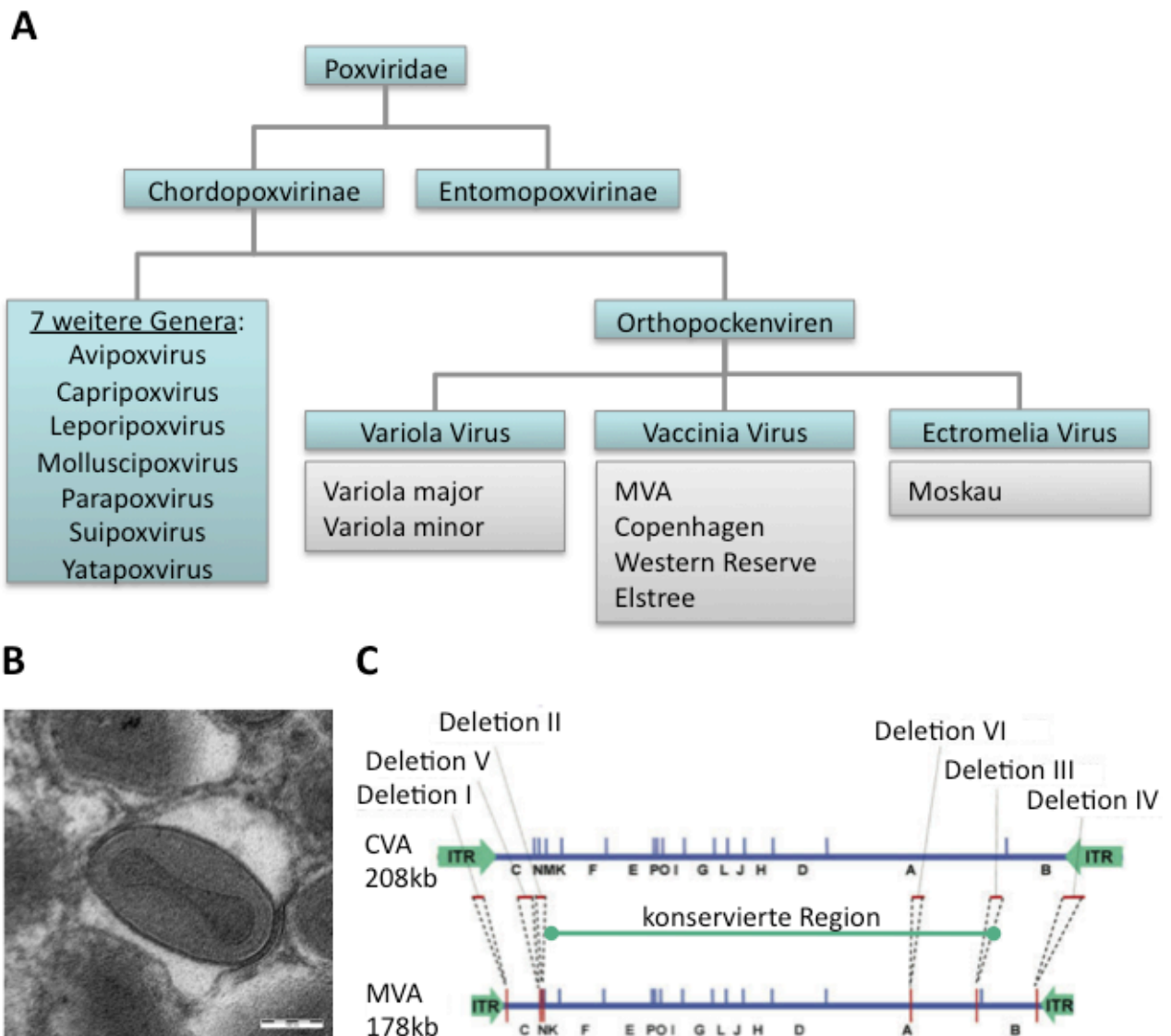
### 1.1. Das Modifizierte Vakziniavirus Ankara (MVA)

#### 1.1.1. Einordnung von MVA in die Familie der Pockenviren

Das Modifizierte Vakziniavirus Ankara gehört zur Familie der Pockenviren. Diese Familie gliedert sich auf in die Pockenviren der Wirbeltiere (*Chordopoxvirinae*) und die Pockenviren der Insekten (*Entomopoxvirinae*). Innerhalb der Subfamilie *Chordopoxvirinae* wird MVA zum Genus der Orthopockenviren gezählt. Neben den Orthopockenviren existieren sieben weitere Genera, welche Erreger wie die Schweinepocken oder Molluscum contagiosum enthalten. Das Genus der Orthopockenviren umfasst unter anderem die Vakziniaviren (VACV), deren Vertreter am längsten bekannt und am intensivsten erforscht sind (Abbildung 1 A). VACV wurden während der Eradikationskampagne der Weltgesundheitsorganisation (engl. *World Health Organization*, WHO) gegen die menschliche Pockenerkrankung als Impfstoff eingesetzt. Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts wurden VACV zur Impfung gegen Pocken verwendet und zählen somit zu den ältesten Impfstoffen. Darüber hinaus gehören in die Gattung der Orthopockenviren unter anderem der Erreger der menschlichen Pockenerkrankung das Variolavirus (VARV), das Mäusepockenvirus (engl. *Ectromelia virus*, ECTV) und das Kuhpockenvirus (engl. *Cowpox virus*, CPXV) als phylogenetisch ältestes Mitglied des Genus (Damon, 2007; Moss, 2007).

Die Viruspartikel der Orthopockenviren besitzen eine etwa 250nm große, fass- bzw. backsteinförmige Hülle, die unter anderem ein hantelförmiges *core*, sowie Lateralkörperchen enthält (Abbildung 1 B). Das in den Viruspartikeln enthaltene Genom ist ein doppelsträngiges DNA-Molekül von 170 bis 240kbp Größe. Dieses beinhaltet invertierte terminale Sequenzwiederholungen und ist an seinen Enden kovalent geschlossen. Es lässt sich in eine konservierte, zentrale Region, die strukturelle Gene und für die Replikation notwendige Gene enthält, sowie die variablen terminalen Regionen gliedern, in denen viele Virus-Wirt-Interaktionsgene, also sog. *host range gene* und Immunmodulatoren bzw. Immunevasionsfaktoren lokalisiert sind (Damon, 2007). Das Genom von MVA umfasst 178kbp und enthält 193 offene Leseraster die für 177 Gene kodieren (Antoine *et al.*, 1998).





**Abbildung 1: Einordnung und Charakteristika von MVA.** (A) Überblick über die Familie der Orthopockenviren. (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines MVA-Viruspartikels. (C) Schematische Darstellung des Genoms von MVA und seines Vorläufers CVA. ITR = *inverted terminal repeat*, die Buchstaben A-P geben die Fragmente nach *HindIII*-Restriktionsverdau des Genoms an (Schematisch nach Meyer *et al.*, 1991).

### 1.1.2. Entstehung von MVA

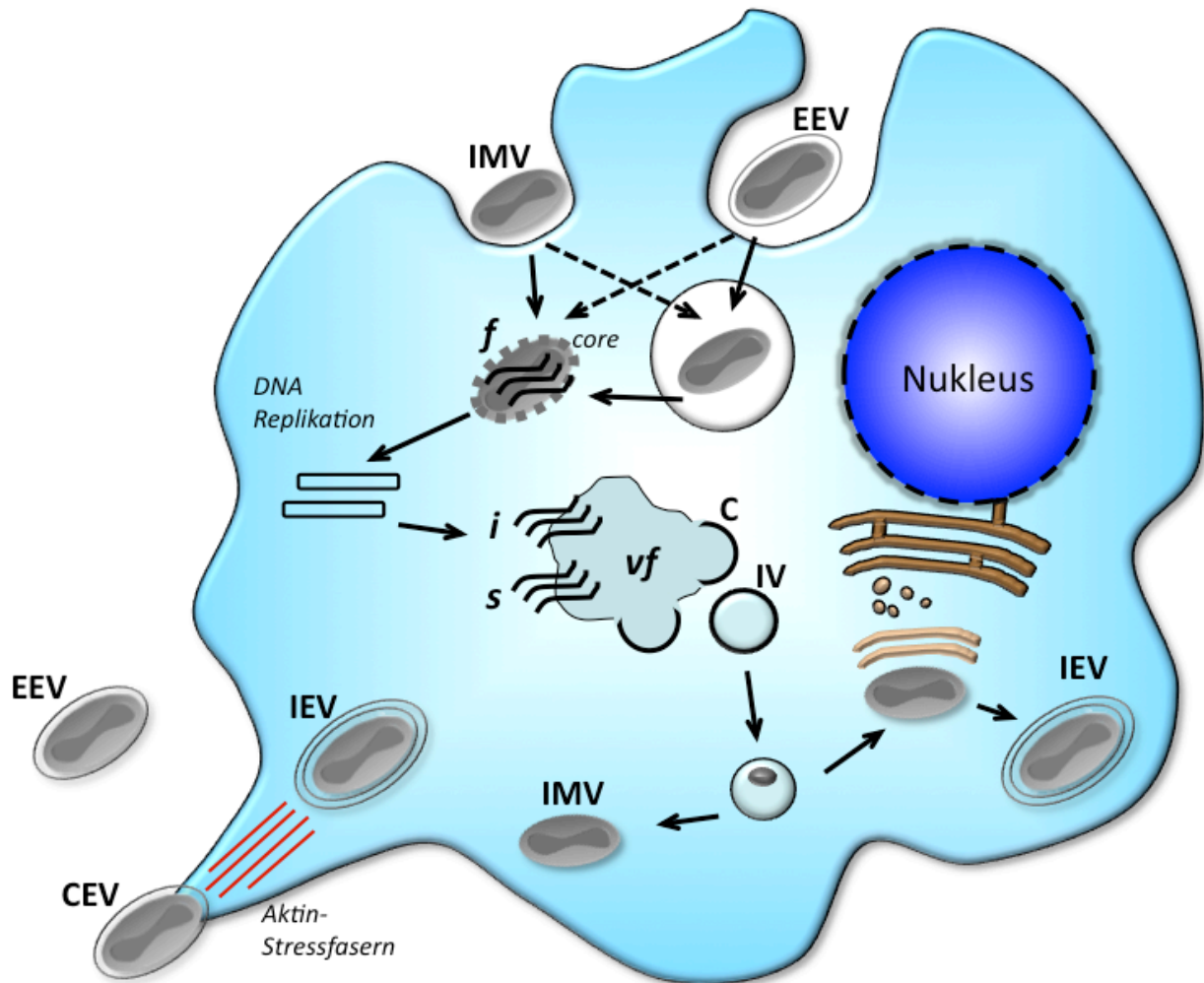
Vor dem Hintergrund der bei der Impfung mit VACV aufgetretenen Nebenwirkungen, insbesondere in immunsupprimierten Impflingen, wurden in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts Anstrengungen unternommen, attenuierte Pockenvirusstämme herzustellen. Aus einem dieser Ansätze ist MVA hervorgegangen. Ursprünglicher Vorläufer von MVA ist der Dermovakzinia-Stamm Chorioallantois Vakziniavirus Ankara (CVA), der in der Türkei als Impfstamm Verwendung fand. 1953 wurde CVA nach Deutschland eingeführt, durch

---

fraktionierte Ultrazentrifugation gereinigt und nach zwei kutanen Flächenimpfungen im Rind wiedergewonnen. Im Anschluss wurde das Virus durch fortlaufende Passagierung auf Hühnerembryofibroblastenzellen (engl. *chicken embryo fibroblasts*, CEF) weiter kultiviert und regelmäßig auf eintretende Attenuierung untersucht. Während die morphologischen Merkmale des Virus durch die fortlaufende Passagierung weitgehend unverändert blieben, zeigte sich eine drastische Abnahme der Virulenz. Die Passagen wurden bis zur 570. Passage fortgeführt. Ab diesem Zeitpunkt schien das Virus genetisch einheitlich und stabil zu sein und es wurden klonale Isolate gewonnen. Bereits ab der 516. Passage erhielt das Virus die Bezeichnung Modifiziertes Vakziniavirus Ankara, um seinen drastisch veränderten Eigenschaften Rechnung zu tragen (Mayr *et al.*, 1975). Genomische Analysen zeigten einen erheblichen Verlust von genetischer Information. Das Genom von CVA ist 208kb groß, das von MVA jedoch nur 178kb. Im Wesentlichen liegen die fehlenden Gene bei MVA innerhalb größerer Deletionen, die mit I bis VI bezeichnet werden (Abbildung 1 C). Die Deletionen sind in den variablen Bereichen des Genoms, an den linken und rechten Termini lokalisiert. Somit sind viele Immunmodulatoren und *host range*-Gene aufgrund der Deletionen nicht mehr im Genom von MVA vorhanden (Antoine *et al.*, 1998, Meyer *et al.*, 1991, Altenburger *et al.*, 1989).

### 1.1.3. Replikationszyklus von Vakziniaviren

Prinzipiell werden bei Pockenviren verschiedene, reife Viruspartikel unterschieden, die sich durch ihre äußere Hülle und Infektiosität unterscheiden. Es existieren reife Partikel, die lediglich mit einer Doppellipidmembran umgeben sind, sogenannte intrazelluläre, reife Virionen (engl. *intracellular mature virions*, IMVs) und reife Partikel, welche von zwei Doppellipidmembranen umgeben sind; die extrazellulären, reifen Virionen (engl. *extracellular enveloped virions*, EEVs). Zellassozierte EEVs werden als CEVs (engl. *cell associated virions*) bezeichnet. Alle Formen können den Replikationszyklus initiieren, gelangen jedoch auf unterschiedlichen, noch nicht vollständig geklärten Wegen in die Zelle. Die nachfolgend geschilderten Schritte der Replikation sind in Abbildung 2 nochmals grafisch dargestellt.



**Abbildung 2:** Schema des Replikationszyklus von Pockenviren. f = frühe Genexpression, i = intermediäre Genexpression, s = späte Genexpression, vf = viral factory, c = crescents, IV = immature virion.

#### 1.1.3.1. Eintritt des Virus in die Zelle

Voraussetzung für den Eintritt des IMV ist die Anheftung an die Zelle. Dies geschieht durch die Bindung viraler Oberflächenproteine an Glykosaminoglykane (GAG) der Wirtszelloberfläche (Chung *et al.*, 1998; Hsiao *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2000). Jedoch wurde auch gezeigt, dass GAG nicht essentiell für eine erfolgreiche Infektion sind (Carter *et al.*, 2005). Der eigentliche Eintritt kann durch eine pH-Wert-unabhängige Fusion der IMV-Membran mit der Plasmamembran erfolgen, die das virale core ins Zytoplasma freisetzt (Carter *et al.*, 2005). Ein zweiter, komplexerer Mechanismus besteht in der Endozytose des IMV. Auf die Endozytose folgt die Fusion der IMV-Membran mit der vesikulären Membran und die Freisetzung des core ins Zytoplasma. Dieser Mechanismus scheint von einer Erniedrigung des pH-Wertes abhängig zu sein (Townesley *et al.*, 2006). Darüber hinaus gibt es

---

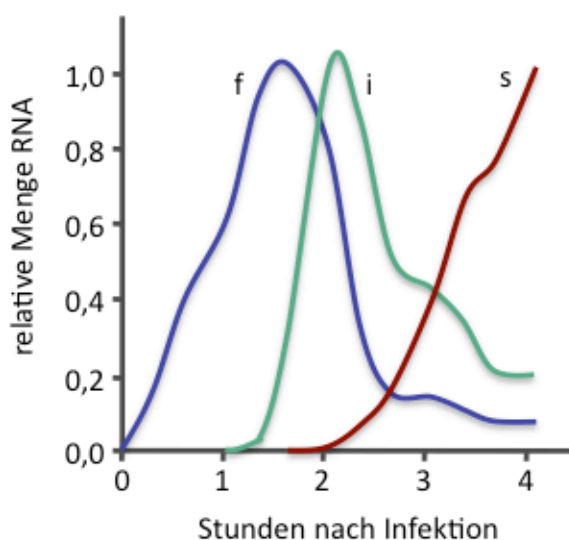
Hinweise, dass IMV durch Makropinozytose in die Zelle gelangen können (Mercer und Helenius, 2008). Die Fusion sowohl mit der Plasma- als auch der endosomalen Membran wird ebenfalls durch virale Proteine gesteuert (Moss, 2007).

Der Eintritt des EEV in die Zelle ist weitaus seltener, da meist nur sehr wenige EEVs produziert werden und die äußere Membran des EEV zudem sehr instabil ist. Nach Anheftung des EEV an die Zelle tritt der Verlust der äußeren Membran ein. Dieser Prozess wird ebenfalls von viralen Proteinen gesteuert (Law *et al.*, 2006; Roberts und Smith, 2008). Die so exponierte IMV-Membran fusioniert mit der Zellmembran und setzt das virale *core* ins Zytoplasma frei (Roberts und Smith, 2008).

#### 1.1.3.2. Virale Genexpression

Transkription und Genexpression bei Pockenviren gliedern sich in drei Phasen: früh, intermediär und spät, wobei die Transkriptionsfaktoren einer Phase durch Gene der jeweils zeitlich davorliegenden Genklasse kodiert werden (Abbildung 3). Die Transkriptionsfaktoren für frühe Gene sind hierbei spät kodiert und werden mit in die Virionen verpackt (Moss, 2007). Das freigesetzte, virale *core* wird zunächst mit Hilfe von Mikrotubuli tiefer in das Zytoplasma der Wirtszelle in die Nähe des Zellkerns transportiert (Carter *et al.*, 2003). Da die Viruspartikel alle notwendigen Enzyme für die Initiation der Transkription enthalten, findet diese zunächst innerhalb des *core* statt (Abbildung 2 f). Transkripte früher Gene gelangen aus dem *core* über Poren in dessen Hülle (Kates und McAuslan, 1967; Munyon *et al.*, 1967) bzw. durch teilweise Auflösung des *core* ins Zytoplasma (Roberts und Smith, 2008). Dort werden mit Hilfe des zellulären Translationsapparates die frühen Proteine synthetisiert. Frühe Proteine machen etwa die Hälfte aller kodierten Proteine aus. Sie kodieren hauptsächlich für Immunmodulatoren und *host range* Faktoren, sowie für die Enzyme zur DNA-Replikation und Transkriptionsfaktoren, die für die intermediäre Genexpression benötigt werden (Moss, 2007). Darüber hinaus kommt es bereits sehr früh im Verlauf der Infektion zu einer drastischen Abnahme der Proteinsynthese der Wirtszelle (Esteban und Metz, 1973; Moss und Salzman, 1968). Am Ende der frühen Genexpression steht der Zerfall des *core*, das sog. *uncoating*. Das *uncoating* hängt von der RNA- und Proteinsynthese ab, der genaue Mechanismus ist bis jetzt jedoch nicht geklärt (Joklik, 1964). Der Zerfall des *core* macht die virale DNA der Replikation zugänglich, so dass die Replikation des Genoms für die

spätere Produktion neuer viraler Partikel beginnen kann. Die Replikation findet ausschließlich im Zytoplasma statt (Joklik, 1968), in Bereichen, die weitgehend frei von zellulären Organellen sind, den sogenannten Virusfabriken (engl. *viral factories*, Abbildung 2; Pennington und Follett, 1974). Die Replikation wird durch einen Einzelstrangbruch an einem Ende des Genoms eingeleitet. Der Mechanismus der Replikation ist bisher weitgehend unklar, könnte aber ähnlich dem *rolling circle*-Modell von replizierenden Plasmiden in Bakterien verlaufen. Die Genomkopien liegen zunächst als Konkatemere vor, die im Verlauf der Virion-Morphogenese aufgelöst werden (Moss, 2007). Das Einsetzen der DNA-Replikation erfolgt zeitgleich mit dem Start der Transkription intermediärer Gene (Broyles, 2003). Das Vorliegen intermediärer Proteine ist Voraussetzung für das Einsetzen der späten Genexpression (Abbildung 2 s). Späte Gene kodieren überwiegend für Strukturproteine des Virions, für frühe Transkriptionsfaktoren und den viralen Transkriptionsapparat (Moss, 2007).



**Abbildung 3:** Darstellung der Transkriptmenge für frühe (f), intermediäre (i) und späte (s) Genklassen im Verlauf der Replikation. Nach Moss und Earl, 2001.

### 1.1.3.3. Morphogenese und Produktion neuer Virionen

Die Morphogenese neuer Viruspartikel beginnt in den *viral factories* mit der Entstehung einer sichelförmigen Anhäufung von Proteinen und Lipiden (Abbildung 2 c). Hieran wird das virale Genom als Nukleoprotein angelagert und von der unreifen Hülle umschlossen. Das entstandene Partikel wird als unreifes Virion (engl. *immature virion*, IV) bezeichnet

---

(Abbildung 2 IV; Moss, 2007). Dieses wird durch proteolytische Spaltung von *core*-Proteinen zum charakteristisch geformten, infektiösen IMV umgewandelt, das die Zelle nach deren Lyse verlassen kann (Roberts und Smith, 2008). Ein geringer Teil der IMVs wird entlang der Mikrotubuli von den *viral factories* weg transportiert (Ward, 2005; Sanderson *et al.*, 2000). Das IMV wird mit einer doppelten Membran umhüllt, die sich vermutlich von *trans*-Golgi-Zisternen (Hiller und Weber, 1985; Schmelz *et al.*, 1994) bzw. Endosomen (Tooze *et al.*, 1993) ableitet und nachfolgend als intrazelluläres, umhülltes Virion (engl. *intracellular enveloped virion*, IEV) bezeichnet wird. Das IEV wird entlang von Mikrotubuli zur Zytoplasmamembran transportiert, wo dessen äußere Membran mit der Zytoplasmamembran fusioniert und das Viruspartikel freisetzt (Hollinshead *et al.*, 2001). Dieses wird zunächst durch virale Proteine an der Zytoplasmamembran verankert und in diesem Stadium als zellassoziiertes Virion (engl. *cell associated virion*, CEV) bezeichnet (van Eijl *et al.*, 2000). CEVs können anschließend als EEVs von der Zelloberfläche freigesetzt werden. Darüber hinaus sind CEVs in der Lage, unterhalb ihres Anheftungspunktes Aktinpolymerisation hervorzurufen, was zu Ausstülpungen der Zellmembran (sog. *actin tails*) unterhalb des Virions führt (Frischknecht *et al.*, 1999). Insgesamt resultiert hieraus eine Fortbewegung des CEV in Richtung benachbarter Zellen, wo eine erneute Infektion hervorgerufen werden kann.

#### 1.1.3.4. Replikationsdefizienz von MVA

Bereits während seiner Generierung wurden die Replikationsmerkmale des MVA intensiv untersucht. Die von Mayr und Kollegen (Mayr *et al.*, 1975) beobachtete Attenuierung geht mit dem Verlust der Replikationsfähigkeit in der humanen Zelllinie HeLa einher. Dieser Befund führte zu einer genaueren Analyse der Replikationsfähigkeit von MVA in anderen menschlichen Zelllinien. In keinem der untersuchten Zelltypen wurde eine Replikation von MVA beobachtet (Mayr *et al.*, 1978; Meyer *et al.*, 1991). Weitere Analysen nach Inokulation verschiedener Säugerspezies (Maus, Kaninchen, Makake) hinsichtlich Pockenbildung, Infiltratbildung und Neurovirulenz ließen eine ausgeprägte Replikationsdefizienz von MVA in Säugetieren vermuten. Auch beim Menschen wurde in ersten Impfungen keine lokale Pustelreaktion an der Impfstelle beobachtet (Mayr *et al.*, 1975; Mayr *et al.*, 1978). Seither wurde die Replikation von MVA in Säugerszellen eingehend charakterisiert und bis auf wenige

---

Ausnahmen in allen untersuchten Säugerzelllinien eine Replikationsdefizienz beobachtet (Carroll und Moss, 1997; Meyer *et al.*, 1991). Dennoch läuft in all diesen Zelltypen die virale DNA-Replikation und Proteinsynthese vollständig ab. Es wurde beobachtet, dass sich in nicht permissiven Zellen IVs ansammeln und keine IMVs oder EEVs mehr gebildet werden. Somit ist die Replikationsdefizienz auf einen Defekt in der Morphogenese der Viruspartikel zurückzuführen (Sutter und Moss, 1992). Als mögliche Mechanismen werden eine fehlende proteolytische Spaltung viraler Proteine und ein gestörter Transport der viralen DNA zu den IVs vorgeschlagen (Sancho *et al.*, 2002; Sutter und Moss, 1992). Auf die Verwendung von MVA als replikationsdefizientem Impfstamm wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

#### 1.1.4. Verwendung von MVA als Impfstoff

Die erste Verwendung von MVA als Impfstoff erfolgte in Feldstudien im Rahmen der Eradikationskampagne der WHO gegen das Variolavirus (Hochstein-Mintzel *et al.*, 1975; Stickl und Hochstein-Mintzel, 1971; Stickl *et al.*, 1974). Etwa 120000 Probanden erhielten eine Erstimpfung mit MVA und eine Zweitimpfung mit dem konventionellen Impfstamm VACV Elstree. Sowohl Erst- als auch Zweitimpfung verliefen komplikationslos, d.h. die Erstimpfung mit MVA verursachte im Gegensatz zum konventionellen Erstimpfstoff VACV Elstree keine Nebenwirkungen und schützte vor deren Eintreten bei der Zweitimpfung. Der MVA-Impfstoff zur Verabreichung nach diesem Impfverfahren wurde 1977 durch das Bundesamt für Sera und Impfstoffe (dem heutigen Bundesinstitut für Impfstoffe und biomedizinische Arzneimittel) zugelassen (Mayr *et al.*, 1978). Selbst in immunsupprimierten oder bestrahlten Tieren traten keine Nebenwirkungen der Impfung auf (Mayr *et al.*, 1978). Mit der offiziellen Beendigung der WHO-Kampagne im Jahr 1980 und der erfolgreichen Eradikation des VARV, ging das Interesse an einem replikationsinkompetenten Impfstoff zunächst zurück. Schon bald zeigte sich jedoch, dass MVA auch weiterhin äußerst nützlich sein würde. Mit der Entdeckung, dass die Attenuierung von MVA mit dem Verlust genetischer Information, im Wesentlichen der Deletion sechs größerer Genomabschnitte einher geht, ergab sich die Möglichkeit, die Deletionsorte zur Insertion fremder Gene zu verwenden (Altenburger *et al.*, 1989; Sutter und Moss, 1992; Drexler *et al.*, 2004). Hieraus entwickelte sich die Anwendung von MVA als Vektorimpfstoff. Bis heute sind eine ganze

Reihe von Ansätzen entstanden, mit Hilfe von MVA-basierten Vektorimpfstoffen Infektionskrankheiten wie HIV, Influenza, Tuberkulose, sowie Tumore und sogar Allergien zu therapieren bzw. gegen sie zu impfen. Einige Impfstoffe befinden sich bereits in der klinischen Erprobung der Phasen I und II und haben dort zum Teil vielversprechende Ergebnisse geliefert (vgl. hierzu Übersichtsartikel Acres und Bonnefoy, 2008; Gomez *et al.*, 2008; Sutter und Staib, 2003). Vereinzelte Rückschläge in dieser Hinsicht sowie die in MVA verbliebenen, immunmodulatorischen Eigenschaften machen jedoch ein tiefergreifendes Verständnis der Interaktion von MVA mit dem Immunsystem notwendig.

## 1.2. Immunmodulatoren in MVA

Ein Großteil der im Vorläufer von MVA vorhandenen Immunmodulatoren ist durch die Passagierung auf CEF-Zellen verloren gegangen. Einige Immunmodulatoren sind jedoch nach wie vor in MVA enthalten und sind in Tabelle 1 aufgelistet. Für die meisten Gene konnte bereits ein Einfluss auf die Immunantwort gezeigt werden. Da es im Genom von MVA immer noch Gene mit bisher unbekannter Funktion gibt, ist nicht auszuschließen, dass noch weitere Immunmodulatoren existieren. Tabelle 1 zeigt deutlich, dass auch MVA noch über vielfältige, und potente Mechanismen verfügt, sowohl die angeborene als auch die erworbene Immunantwort entscheidend zu beeinflussen.

**Tabelle 1: Auflistung der bekannten, in MVA vorhandenen Immunmodulatoren.** \* = entsprechendes, homologes Gen in VACV Copenhagen

MVA-Gen	VACV-Gen*	Funktion	Referenz
006L	C10L	putativer, viraler IL-1-Rezeptor-Antagonist: Blockade des Typ I IL-1-Rezeptors	Kluczyk <i>et al.</i> , 2002
008L	C12L	Interleukin-18 Bindeprotein: Hemmung der IFN- $\gamma$ -Sekretion, NK-Zell- und T-Zell-Antwort	Reading und Smith, 2003
018L	C7L	<i>host range</i> -Gen: Hemmung der Interferonantwort	Meng <i>et al.</i> , 2009



MVA-Gen	VACV-Gen*	Funktion	Referenz
024L	K3L	Proteinkinase R (PKR)-Pseudosubstrat: Hemmung der Interferoninduktion von PKR	Beattie <i>et al.</i> , 1995 Davies <i>et al.</i> , 1993
031L	F3L	Funktion unklar: Hemmung der NK- Zellantwort	Froggatt <i>et al.</i> , 2007
050L	E3L	PKR und 2'-5'-OAS/RNase L-Inhibitor: Inhibition der IFN- $\beta$ , TNF- $\alpha$ und IL-6- Sekretion	Chang <i>et al.</i> , 1992 Rivas <i>et al.</i> , 1998 Myskiw <i>et al.</i> , 2009
146R	A35R	Inhibitor der MHC-Klasse II Antigenpräsentation: Hemmung der T- Zellantwort	Roper, 2006 Rehm <i>et al.</i> , 2010
153L	A41L	CC-Chemokin-Bindeprotein: Inhibition der akuten und Gedächtnis-T- Zellantwort	Clark <i>et al.</i> , 2006
157L	A44L	3-beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase: Hemmung der IFN- $\gamma$ -Sekretion und T- Zell-Antwort	Reading <i>et al.</i> , 2003
159R	A46R	<i>Toll-like</i> -Interleukin-1 Rezeptor- Adapter-Inhibitor: Hemmung der IFN- Sekretion, Virulenzfaktor	Stack <i>et al.</i> , 2005
184R	B16R	Interleukin-1 $\beta$ -Rezeptor: Inhibition der akuten und Gedächtnis-T-Zellantwort	Alcami und Smith, 1992 Staib <i>et al.</i> , 2005

Nicht in der Tabelle genannt sind die Gene 029L (F1L), 091L (H1L), 095R (H5R), 152R (A40R), 167R (B1R), 175R (B7R), 183R (B15R), da deren Funktion nur mittelbar Immunmodulatorisch bzw. noch weitgehend unklar ist.

---

### 1.3. Das Interleukin-1 $\beta$ Rezeptor-Homolog von MVA

Wie in Tabelle 1 dargestellt, ist einer der in MVA verbliebenen Immunmodulatoren das Interleukin-1 $\beta$  Rezeptor-Homolog. Das Protein wird durch den offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF) 184R codiert. Dieser umfasst 981bp und liefert ein 326aa großes Protein, dessen Expression bereits gezeigt wurde (Blanchard *et al.*, 1998). Der IL-1 $\beta$  Rezeptor ist in Orthopockenviren hochkonserviert (Antoine *et al.*, 1998), was seine Bedeutung im viralen Lebenszyklus unterstreicht. Die Deletion des ORF 184R führt nicht zu einer Virulenzsteigerung von MVA. Die Immunantwort in der akuten Phase nach Immunisierung von humanisierten HHD-Mäusen wird ebenfalls nicht durch die Deletion beeinflusst. In der Gedächtnisphase der Immunantwort führt die Immunisierung mit der IL-1 $\beta$ R-Deletionsmutante jedoch zu einer verbesserten spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellantwort, sowohl in HHD- als auch in C57BL/6N-Mäusen. Diese manifestiert sich in einem verbesserten Schutz gegen die Infektion mit einer letalen Dosis VACV Western Reserve (Staib *et al.*, 2005). Im Vergleich hierzu hat das VACV-Homolog des IL-1 $\beta$  Rezeptors weitaus gravierendere Auswirkungen, die zum Teil kontrovers diskutiert werden. Es wird durch den ORF B15R in VACV Western Reserve kodiert, und es wurde gezeigt, dass es humanes und murines IL-1 $\beta$ , das hauptsächlich wirksame Pyrogen im Kontext einer VACV-Infektion, nicht aber IL-1 $\alpha$  bindet. Darüber hinaus inhibiert B15 das Auftreten von Fieber, und die Deletion von B15R führt zu einem früheren Auftreten von Krankheitssymptomen sowie einer erhöhten Sterblichkeit in Mäusen (Alcami und Smith, 1992, Alcamì und Smith, 1996). Nach intracranialer Infektion von Mäusen zeigte die Deletionsmutante von B15R dagegen eine reduzierte Virulenz (Spriggs *et al.*, 1992). Im Vergleich zu B15 unterscheidet sich der MVA IL-1 $\beta$  Rezeptor durch zwei nicht-synonyme Aminosäureaustausche. Diese befinden sich beide in einer der drei für Proteine der Immunglobulin-Superfamilie typischen Ig-Domänen. Aus diesem Grund erscheint eine weiterführende Charakterisierung der Eigenschaften des IL-1 $\beta$  Rezeptors auch von MVA sinnvoll.

---

## 1.4. Interleukin-1 $\beta$

### 1.4.1. Überblick und Eigenschaften

Interleukin-1 $\alpha$  und Interleukin-1 $\beta$  sind die am längsten bekannten Zytokine. Ihre Geschichte geht zurück bis in die Anfänge des 20. Jahrhunderts, als man versuchte, das endogene, fieberauslösende Protein zu identifizieren (Atkins, 1984). Nachdem 1984 die cDNA für IL-1 $\beta$  isoliert wurde und das Protein anschließend rekombinant hergestellt werden konnte, gelang der Nachweis, dass IL-1 $\beta$  ein hochpotentes, endogenes Pyrogen ist (Auron *et al.*, 1984; Ogilvie *et al.*, 1996; Tewari *et al.*, 1990). IL-1 $\beta$  gehört zur IL-1-Superfamilie, zu der unter anderem auch IL-18 und IL-33 zählen. Die zellulären IL-1-Rezeptoren gehören der IL-1 Rezeptor/*toll-like* Rezeptor-Superfamilie an. Sie binden sowohl IL-1 $\alpha$  als auch IL-1 $\beta$ . Der Typ I IL-1 Rezeptor (IL-1RI, CD121a) ist für die eigentliche IL-1-Signaltransduktion zuständig. Der Typ II IL-1 Rezeptor (IL-1RII, CD121b) besitzt keine zytoplasmatische Domäne und kann somit nach Ligandenbindung keine Signale weiterleiten. Antagonistisch zum IL-1RI wirkt der Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist (IL-1Ra), indem er mit hoher Affinität an den IL-1RI bindet. Sowohl IL-1RII als auch IL-1Ra dienen der Feinregulation des IL-1-Signalweges (Dinarello, 2010). Von IL-1 $\beta$  sind jedoch sehr wenige Fälle bekannt, in denen das Molekül selbst als direkter Signalüberträger fungiert (Ben-Sasson *et al.*, 2009). In den meisten Fällen erfolgt eine Induktion weiterer Zytokine bzw. anderer Moleküle, die letztlich indirekt zur IL-1 $\beta$ -Wirkung beitragen. Hauptproduzenten von IL-1 $\beta$  sind Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (engl. *dendritic cells*, DCs). Auch NK-Zellen und B-Zellen sind in der Lage, IL-1 $\beta$  zu synthetisieren. Dendritische Zellen exprimieren den IL-1RI (Baltathakis *et al.*, 2001; Kampgen *et al.*, 1994; Larregina *et al.*, 1997; Luft *et al.*, 2002; Wesa und Galy, 2001) und sind zudem selbst in der Lage, IL-1 $\beta$  zu produzieren (Crawford *et al.*, 2003; de Saint-Vis *et al.*, 1998; Gardella *et al.*, 2000). Für Makrophagen wurde sowohl ebenfalls die Expression des Rezeptors gezeigt (Gleissner *et al.*, 2010; Neale und Athanasou, 1999), als auch die Fähigkeit zur Produktion von IL-1 $\beta$  nachgewiesen (Khaldoyanidi *et al.*, 1999; Pruijboom *et al.*, 1994). T-Zellen sind hingegen nicht in der Lage IL-1 $\beta$  zu sekretieren, besitzen sehr wohl aber den IL-1RI und sind somit in der Lage auf IL-1 $\beta$  zu reagieren (Lichtman *et al.*, 1988; Lowenthal und MacDonald, 1986). IL-1 $\beta$  wirkt zusammen mit einem Antigen oder Mitogen auf T-Zellen kostimulatorisch und kann als Wachstumsfaktor für Thymozyten dienen (Dinarello, 2010).

---

Auch auf Makrophagen hat IL-1 $\beta$  eine aktivierende Wirkung (Janeway, 2005). Sowohl DCs als auch Makrophagen kommt eine entscheidende Rolle bei Antigenprozessierung und Antigenpräsentation zu. Somit stehen diese Schlüsselfunktionen zum einen mit unter dem Einfluss von IL-1 $\beta$  und zum anderen dient IL-1 $\beta$  zur Vermittlung von Effektorfunktionen dieser Prozesse. Der wichtigste Effekt von IL-1 $\beta$  ist wie bereits dargestellt, die Induktion von Fieber. Dies geschieht durch Einwirkung auf den Hypothalamus. Zusätzlich werden in Fett- und Muskelgewebe Protein- und Energiereserven mobilisiert, um Energie für die Erhöhung der Körpertemperatur zu liefern. Mit dem Fieber gehen ein vermehrtes Schmerzempfinden, Vasodilatation und eine Senkung des Blutdruckes einher. Das Fieber inhibiert die virale und bakterielle Replikation und führt zugleich zu vermehrter Antigenprozessierung und stimuliert die spezifische Immunantwort. Darüber hinaus werden im Knochenmark neutrophile Granulozyten mobilisiert und myeloide Vorläuferzellen zur Differenzierung angeregt, was zu einer erhöhten Phagozytoserate und vermehrter Bildung von T-Zellen und dendritischen Zellen führt. In der Leber kommt es zur Induktion von Akutphase-Proteinen, die für die Aktivierung des Komplementsystems und der Opsonisierung notwendig sind. Des Weiteren führt IL-1 $\beta$  zur Induktion von Adhäsionsmolekülen im Gewebe und zur Sekretion von Chemokinen, was eine Einwanderung von inflammatorischen und immunkompetenten Zellen aus dem Blutkreislauf in den extrazellulären Raum und die Gewebe zur Folge hat. Interleukin-6 ist besonders sensitiv gegenüber IL-1 $\beta$ . Bereits Dosen von 1ng/kg IL-1 $\beta$  genügen, um extrem hohe Konzentrationen von IL-6 zu induzieren. IL-1 $\beta$  ist ein extrem wirksames, proinflammatorisches Zytokin, weshalb ihm auch im Kontext autoinflammatorischer Erkrankungen eine wichtige Rolle zukommt (Dinarello, 2010, Janeway, 2005). Die Bindung von IL-1 $\beta$  an den IL-1RI führt zu dessen Aktivierung und Signalweiterleitung über das Adaptermolekül MyD88 (Abbildung 4-1), welches mittelbar die Transkription der IL-1 $\beta$ -mRNA beeinflusst. Die IL-1 $\beta$ -mRNA ist vergleichsweise instabil und wird schnell degradiert. Extrazelluläre Stimuli (auch IL-1 $\beta$  selbst) sind in der Lage, die Transkription von IL-1 $\beta$  zu erhöhen und somit zu einem Anstieg der mRNA-Konzentration beizutragen (Abbildung 4-2). Die mRNA wird zunächst in eine 31kDa große Proform (pro-IL-1 $\beta$ ) translatiert (Abbildung 4-3). Aktives IL-1 $\beta$  wird durch Spaltung von pro-IL-1 $\beta$  durch Caspase-1 generiert. Caspase-1 liegt jedoch ebenfalls als inaktive Proform vor und muss erst durch das NLRP3-Inflammasom gespalten werden (Abbildung 4-6). Dies geschieht nach einem zweiten Stimulus, zum Beispiel extrazellulärem ATP (Abbildung 4-4). Die Spaltung von

pro-IL-1 $\beta$  durch Caspase-1 erfolgt entweder im Zytoplasma oder in sekretorischen Lysosomen (Abbildung 4-7). Darauf folgt die Freisetzung des aktiven, 18kDa großen, reifen IL-1 $\beta$ -Proteins (Abbildung 4-9). Es sind jedoch auch Caspase-1-unabhängige Prozessierungswege von pro-IL-1 $\beta$  bekannt (Dinarello, 2010).

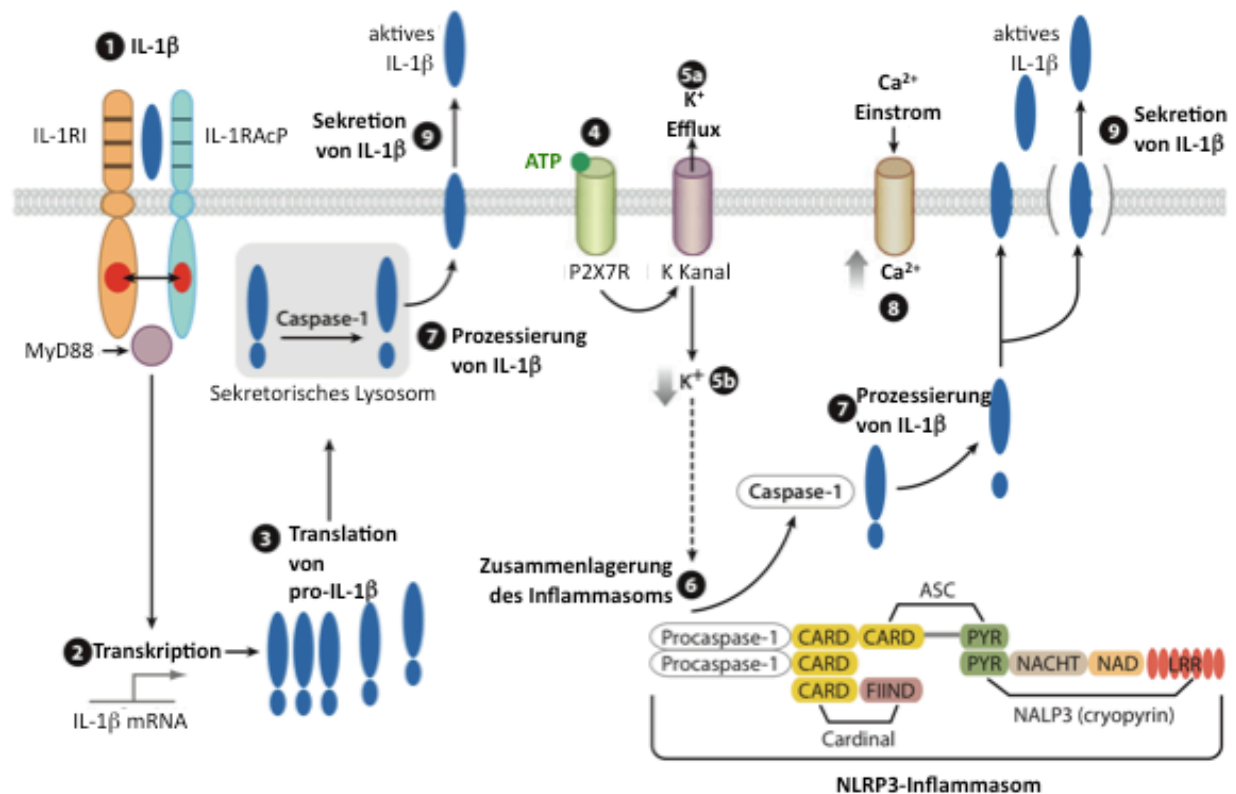


Abbildung 4: Expression und Prozessierung von IL-1 $\beta$ . Verändert nach Dinarello, 2010.

#### 1.4.2. Rolle von IL-1 $\beta$ im Kontext viraler Infektionen

Voraussetzung für das Zustandekommen einer adaptiven Immunantwort und die vollständige Beseitigung des Erregers nach einer viralen Infektion ist zunächst die Aktivierung der angeborenen Immunität. Dies geschieht zum einen mit Hilfe des Komplementsystems und zum anderen mit Hilfe sogenannter *pattern-recognition receptors* (PRRs), die Pathogen-assoziierte, molekulare Muster (engl. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) erkennen können. PRRs befinden sich auf vielen Zellen des angeborenen Immunsystems, darunter Monozyten, Neutrophile, Makrophagen, dendritische Zellen und auch auf Zellen des adaptiven Immunsystems (Janeway, 2005; Schroder und Tschopp, 2010). Zu den PRRs zählen membranständige Rezeptoren wie *toll-like* Rezeptoren und *C-type*

---

Lektine. Hinzu kommen die intrazellulären PRRs der *RIG-like helicase* (RLH)-Familie RIG-I und MDA5, sowie die DNA-Sensoren DAI und AIM2. Welcher der PRRs letztlich durch ein Virus aktiviert wird, hängt von der Art des Virus und auch vom Zelltyp ab. Alle diese Signaltransduktionswege aktivieren Moleküle wie NFκB, IRFs und AP-1, die proinflammatorische Zytokine und Chemokine zur Pathogenabwehr induzieren. Eine besondere Stellung unter den PRRs nimmt die Gruppe der *NOD-like* Rezeptoren (NLRs) ein. Aktivierte NLRs und auch AIM2 oligomerisieren in sogenannten Inflammasomen. Sowohl das NLRP3-Inflammasom als auch das AIM2-Inflammasom enthalten auch Caspase-1. Aktivierung des Inflammasoms führt zur Aktivierung von Caspase-1. Diese ist nachfolgend in der Lage, pro-IL-1β in seine reife Form zu überführen und somit die Sekretion von IL-1β als Reaktion auf das erkannte Virus einzuleiten. Dies hat das Einsetzen der proinflammatorischen Effektorfunktionen von IL-1β zur Folge. Außerdem wird durch die Aktivierung der PRR-tragenden Zelle der Prozess der Antigenprozessierung und Antigenpräsentation ausgelöst, was die Aktivierung von T-Zellen und somit die Induktion der adaptiven Immunantwort nach sich zieht (Schroder und Tschopp, 2010). Zu den Erregern, die das NLRP3-Inflammasom aktivieren können, zählen unter anderem Sendai-Virus, Adenoviren und Influenza (Kanneganti *et al.*, 2006; Muruve *et al.*, 2008). Das AIM2-Inflammasom wird durch dsDNA-Viren, wie das Maus-Zytomegalovirus aktiviert (Rathinam *et al.*, 2010). Die Bedeutung von IL-1β im Kontext viraler Infektionen wird durch seine erfolgreiche Anwendung als Adjuvanz nochmals unterstrichen (Kayamuro *et al.*, 2010).

### 1.5. Zielsetzung

Immunevasionsfaktoren spielen eine wichtige Rolle im Kontext der Infektion mit Pockenviren. Etwa ein Drittel aller VACV-Gene kodieren für solche Faktoren. Auch wenn im Laufe der Genese von MVA viele Immunevasionsfaktoren verloren gegangen sind, so stellen die verbliebenen Faktoren einen möglichen Ansatzpunkt für Verbesserungen des Impfstoffes dar. Als geeigneter Kandidat für solche Verbesserungen wurde die Deletion des Interleukin-1 $\beta$  Rezeptor Homolog in MVA identifiziert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Nachweis erbracht werden, dass der MVA IL-1 $\beta$ R im murinen und humanen System tatsächlich in der Lage ist, IL-1 $\beta$  zu binden und somit zu inaktivieren. Ferner sollte untersucht werden, ob MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R *in vitro* und *in vivo* IL-1 $\beta$  induziert und ob dies die vermehrte Bildung weiterer proinflammatorischer Zytokine zur Folge hat. Als Mechanismus der Induktion von IL-1 $\beta$  wurde eine Beteiligung von Inflammasomen überprüft. Des Weiteren war Ziel der Arbeit, die Immunantwort nach Immunisierung von Mäusen detailliert zu charakterisieren und die Mechanismen zu klären, die zur bereits publizierten, verbesserten Gedächtnis-T-Zellantwort nach Immunisierung mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R führen. Dabei sollten sowohl die Zytokinantworten als auch die zellulären Immunantworten auf Basis von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>T-Zellen untersucht werden. Die durchgeführten Untersuchungen sollten zur eingehenden Charakterisierung und zum grundlegenden Verständnis von MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R beitragen und somit die Basis für eine mögliche Verwendung des Virus als Vektorimpfstoff schaffen.

## 2. MATERIALIEN UND METHODEN

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Reagenzien

**Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Reagenzien und deren Hersteller.**

Chemikalien + Reagenzien	Hersteller
100bp Marker	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
1kb Marker	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
<sup>35</sup> S Cystein/Methionin-Mix	PerkinElmer LAS (Germany) GmbH, Rodgau
AccuCheck Counting Beads	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Ammoniumpersulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ampizillin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Amplify	GE Healthcare, Europe GmbH, Freiburg
Arabinofuranosyl-Cytidin (AraC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Bovines Serum-Albumin Fraktion V (BSA)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Bovines Serum-Albumin Fraktion V, immunograde	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
Chloroform-Isoamylalkohol 24:1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Complete Mini Protease-Inhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Concanavalin A	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Di-methyl-sulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ethylenglykoltetraacetat (EGTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ethanol p.a.	Merck KGaA, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
EZ Vision	Amresco Interchim, Guelph, Kanada
FACS Lysing Solution	BD Biosciences, Heidelberg



Chemikalien + Reagenzien	Hersteller
FugeneHD	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ionomycin	Merck Biosciences GmbH, Schwalbach
Isopropanol p.a.	Merck KGaA, Darmstadt
Kanamyzin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ketamin (Kentanest®)	Parke-Davis, Berlin
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Lipopolysaccharid aus <i>Salmonella typhimurium</i> (LPS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Low Melting Point Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Lumi-Light Western Blotting Substrat	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Methanol p.a.	Merck KGaA, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Nonidet P-40 (NP-40)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Odyssey Blocking Buffer	LI-COR GmbH, Bad Homburg
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol 25:24:1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Merck Biosciences GmbH, Schwalbach
pNpp-Substrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
QuantiBlue	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
Blutlysepuffer (Red Blood Cell Lysis Buffer)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
rhIL-1 $\beta$	Bender Medsystems, Wien
rmIL-1 $\beta$	Bender Medsystems, Wien
Roti-Load 4-fach	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Rotiphorese Blau R	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Chemikalien + Reagenzien	Hersteller
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Skim Milk Powder	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Staurosporin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Sucrose	Invitrogen, Karlsruhe
Tris	Merck KGaA, Darmstadt
TrueBlue Peroxidase-Substrat	KPL, Inc., Gaithersburg, USA
Tween-20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Xylazin (Rompun®)	Bayer AG, Leverkusen

### 2.1.2. Puffer und Lösungen

**Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen und deren Zusammensetzung**

Bezeichnung	Zusammensetzung
1x SDS-Lysispuffer	62,5mM Tris/HCl 2% w/v SDS 10% v/v Glycerin 3,2% v/v $\beta$ -Mercaptoethanol 0,01% w/v Bromphenolblau pH 6,8
36% v/v Sucrose	208g Sucrose auf 500mL mit Tris 10mM, pH9 sterilfiltrieren
Anodenpuffer I pH 10,4	0,3M Tris 10% v/v Methanol
Anodenpuffer II pH 10,4	25mM Tris 10% v/v Methanol pH 10,4
FACS-Puffer	20mM EDTA 0,15g Natriumazid 2% w/v bovines Serumalbumin

Bezeichnung	Zusammensetzung
	auf 500mL mit PBS sterilfiltrieren
Kathodenpuffer pH9,4	25mM Tris 40mM ε-amino-n-Caprinsäure 10% v/v Methanol pH 9,4
LB-Medium	1% w/v Trypton 0,5% w/v Hefeextrakt 1% Natriumchlorid auf 1L mit Reinstwasser
MVA ELISA <i>blocking buffer</i>	10% v/v FCS 0,05% v/v Tween-20 in PBS
MVA ELISA <i>coating buffer</i>	70mM Natriumhydrogencarbonat 30mM Natriumcarbonat pH 9,6
MVA ELISA Stopp-Lösung	0,5M NaOH
MVA ELISA Waschpuffer	44,5mM Natriumchlorid 0,3mM Kaliumdihydrogenphosphat 1,6mM Di-natriumhydrogenphosphat 0,3mM Kaliumchlorid 0,05% v/v Tween-20
Natriumchlorid 5M	292,2g Natriumchlorid in 1L Reinstwasser
PBS 0,5% Tween-20	0,5% v/v Tween-20 PBS
PBS ohne Kalzium und Magnesium	26,8g Di-natriumhydrogenphosphat- heptahydrat 80g Natriumchlorid 2g Kaliumchlorid

Bezeichnung	Zusammensetzung
	2,4g Kalium-dihydrogenphosphat pH 7,4 mit Salzsäure einstellen; mit Reinstwasser auf 1 L auffüllen
Proteinase K-Lösung	1mg/mL in 1,5M Kalziumchlorid
<i>Radioimmunoprecipitation assay (RIPA)-</i> Puffer	50mM Tris/HCl pH8 1% v/v Glycerin 0,5% w/v Natriumdeoxycholat 0,1% w/v SDS 137mM Natriumchlorid 1% v/v Nonidet P-40 2mM EDTA
SDS-Laufpuffer 10-fach	19,2M Glycin 5M Tris (pH 8,9) 10% w/v SDS
TAE-Puffer 20-fach	0,32M Tris 22,84ml Essigsäure (100%) 40ml EDTA (0,5 M, pH 8,0)
<i>Tank-Blot</i> Transferpuffer 10-fach	30,3g Tris 144g Glycin auf 1L mit Reinstwasser
TEN-Puffer 10-fach	100mM Tris pH 7,5 10mM EDTA 1M Natriumchlorid
TE-Puffer	10mM Tris (pH 8,0) 1mM EDTA
Tris 1,5M pH 8,8	10mM bis 1,5M, verschiedene pH-Werte

## 2.1.3. Geräte + Hilfsmittel

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Geräte und Hilfsmittel und deren Hersteller.

Bezeichnung	Hersteller
Absaugpumpe Vacusafe comfort	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
Filmentwickler AGFA Curix 60	Agfa Deutschland, Köln
Amersham Photometer Ultrospec 1100 pro	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Blutentnahmeröhrchen Microvette 100 (Lithium-Heparin oder Gerinnungsaktivator)	Sarstedt AG & Co, Nürnbrecht
Brutschrank Heraeus BBD 6220	Thermo Electron Corp., Ulm
Cycler T Personal	Analytik Jena AG / Biometra, Göttingen
Eierbrutschrank	Heka-Brutgeräte, Rietberg
ELISA-Platten MaxiSorp	Nunc GmbH & Co KG, Langenselbold
ELISA-Reader SPECTRAMax 340PC	Molecular Devices, Inc., Sunnyvale, USA
Elispot-Reader Eli-Scan	A.EL.VIS GmbH, Hannover
Filcon-Filter	Günter Keul GmbH, Steinfurt
Geldokumentationssystem	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Geltrockner Model 583	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Immuno-Blot PVDF-Membran	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Inkubator	Binder GmbH, Tuttlingen
Kühlzentrifuge Multifuge 1S-R	Thermo Electron Corp., Ulm
Lumi Imager F1	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Magnetrührer RCT basic	IKA-Werke, Staufen
Mikroskop Axiovert 40 C	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Netzgerät Standard Power Pack P25	Analytik Jena AG / Biometra, Göttingen
New Brunswick Schüttler U725 Innova	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Nürtingen
New Brunswick Scientific Schüttelinkubator Innova 44	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Nürtingen
Odyssey Imager	LI-COR GmbH, Bad Homburg

Bezeichnung	Hersteller
Orbitalmischer Polymax 1040	HEIDOLPH Instruments GmbH & Co. KG, Schwalbach
PAGE-Apparatur MiniProteanII	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
pH-Meter SevenEasy	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Privileg Mikrowelle 8020	Quelle AG, Fürth
Savant Speed-Vac SC100	Thermo Electron Corp., Ulm
SemiDry Blotting-Apparatur Fastblot B33	Analytik Jena AG / Biometra, Göttingen
Sterilwerkbank SG-400	Baker, Sanford, USA
Stuart Rollermischer SRT6	Barloworld Ltd., Johannesburg, Süd-Afrika
Thermomixer kompakt	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Nürtingen
Tisch-Kühlzentrifuge Fresco 17	Thermo Electron Corp., Ulm
Trans-Blot Transfer Medium NC-Membran 0,2µm	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ultraschallgerät Sonoplus mit Schallbecher UW2200 und Spitze	Bandelin GmbH & Co.KG, Berlin
Ultrazentrifuge Optima L-80 XP	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Wasserbad 1228-2F	Merck KGaA, Darmstadt, Darmstadt
Zellzähler Z1	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

#### 2.1.4. Kits

**Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Reagenzienkits und deren Hersteller**

Bezeichnung	Hersteller
Cytofix/Cytoperm-Kit mit Brefeldin A	BD Biosciences, Heidelberg
FlowCytoMix Kits	Bender Medsystems, Wien
Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
huIL-1β ELISA	BD Biosciences, Heidelberg
mIFN-α ELISA	PBL Interferonsource

Bezeichnung	Hersteller
mIFN- $\gamma$ ELISPOT	Mabtech AB, Nacka Strand, Schweden
mIL-15 ELISA	R & D Systems GmbH, Wiesbaden
mIL-6 ELISA	BD Biosciences, Heidelberg
mIL-7 ELISA	R & D Systems GmbH, Wiesbaden
mIL-1 $\beta$ ELISA	BD Biosciences, Heidelberg
mMIP-1 $\beta$ ELISA	R & D Systems GmbH, Wiesbaden
PCR Master	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
pGEM T-easy	Promega GmbH, Mannheim
Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Plasmid Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
ProteoSilver™ Plus Silver Stain Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Pwo Polymerase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Taq Kit	Qiagen GmbH, Hilden

### 2.1.5. Virusstämme

**Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Virusstämme mit Herkunft und Eigenschaften**

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
MVA II <sub>new</sub>	Wildtyp-Virus	Staib <i>et al.</i> , 2003
MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R	Offener Leserahmen 184 (= IL-1 $\beta$ -Rezeptor) entfernt	Staib <i>et al.</i> , 2005
MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev	MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R in das der offene Leserahmen 184 in die Deletion VI wieder eingesetzt wurde	hergestellt in dieser Arbeit

2.1.6. Mausstämme

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Mausstämme mit Herkunft und Eigenschaften

Mausstamm	Charakteristika und Referenzen	Herkunft / Zucht
C57BL/6N	Ingezüchteter Wildtyp-Stamm	Charles River Laboratories, Sulzfeld
B6-Casp1 <sup>tm1Flv</sup>	Kein funktionales NALP3-Inflammasom zur Spaltung von proIL-1 $\beta$ (Kuida <i>et al.</i> , 1995)	Labor Ivo Steinmetz, Friedrich-Loeffler-Institut für Medizinische Mikrobiologie Universität, Greifswald
B6.129P2-MyD88 <sup>tm1Aki</sup>	Eingeschränkte TLR und keine IL-1 Signalweiterleitung (Adachi <i>et al.</i> , 1998)	PEI
B6.Cg-MyD88 <sup>tm1Aki</sup> Ticam1 <sup>LPS2</sup>	Keine TLR- und IL-1 Signalweiterleitung (Waibler <i>et al.</i> , 2007; Yamamoto <i>et al.</i> , 2003)	PEI

2.1.7. Zellkulturmedien und -zusätze

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Zellkulturmedien und -zusätze und deren Hersteller

Bezeichnung	Herkunft
1M HEPES	Invitrogen, Karlsruhe
2x MEM	Invitrogen, Karlsruhe
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen M7522
DMEM	Biochrom AG, Berlin
EMEM	Biochrom AG, Berlin
Fötales Rinderserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Hygromycin B (HygroB)	InvivoGen, Toulouse, Frankreich



Bezeichnung	Herkunft
L-Glutamin, 200mM	Biochrom AG, Berlin
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Nicht-essentielle Aminosäuren-Mix, 100x (NEA)	Biochrom AG, Berlin
Penicillin/Streptomycin-Mix, 10000U/mL bzw. 10000µg/mL (Pen/Strep)	Lonza Sales AG, Basel, Schweiz
RPMI	Biochrom AG, Berlin
Trypsin-EDTA, 170000U/mL, 200mg/L EDTA	Lonza Sales AG, Basel, Schweiz
VLE-RPMI	Biochrom AG, Berlin
Zeocin (Zeo)	InvivoGen, Toulouse, Frankreich

### 2.1.8. Zelllinien und Medien

**Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Zelllinien mit Herkunft und Eigenschaften**

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft	Medium
BHK21	Hamster-Nierenzellen	ATCC, CCL-10	<b>RPMI</b> + 10%/2% FCS* + 5mM L-Glutamin + 100IU/mL Pen + 100µg/mL Strep
HEK 293T	Humane Nierenzellen	ATCC, CRL-11268	<b>RPMI</b> + 10%/2% FCS* + 5mM L-Glutamin + 100IU/mL Pen + 100µg/mL Strep
HEK Blue IL- 1β sensor cells	Gentechnisch veränderte humane Nierenzellen zum spezifischen Nachweis von bioaktivem, humanem IL-1β	InvivoGen, Toulouse, Frankreich	<b>DMEM</b> + 20%/10% FCS# + 2mM L-Glutamin + 100IU/mL Pen + 100µg/mL Strep

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft	Medium
	mittels stabil integriertem Reporterkonstrukt		+ 100µg/mL Zeo <sup>#</sup> + 100µg/mL HygroB <sup>#</sup>
HeLa	Humane Epithelzellen	ATCC, CCL-2	<b>RPMI</b> + 10%/2% FCS* + 5mM L-Glutamin + 100IU/mL Pen + 100µg/mL Strep
Hühnerembryo-fibroblasten (CEF)	Primäre Hühnerembryofibroblasten, Präparation nach Mayr <i>et al.</i> , 1974, siehe 2.2.4.3	aus bebrüteten Hühnereiern, Lohmann Tierzucht, Cuxhaven	<b>EMEM</b> + 10%/2% FCS* + 5mM L-Glutamin + NEA + 100IU/mL Pen + 100µg/mL Strep
Murine, knochenmarks-abgeleitete Makrophagen (BMDM)	Differenzierung aus Knochenmark, siehe 2.2.4.7	Maus-Knochenmark aus <i>Femur</i> und <i>Tibia</i>	<b>R10 (RPMI)</b> + 10%/2% FCS* + 5mM L-Glutamin + 100IU/mL Pen + 100µg/mL Strep + 50mM β-Mercaptoethanol
Murine, myeloide dendritische Zellen (mDC)	Differenzierung aus Knochenmark, siehe 2.2.4.7	Maus-Knochenmark aus <i>Femur</i> und <i>Tibia</i>	<b>mDC-Medium (RPMI)</b> + 10%/2% FCS <sup>†</sup> + 5mM L-Glutamin + 100IU/mL Pen + 100µg/mL Strep + 1mM Na-Pyruvat + 1mM HEPES + 50mM β-Mercaptoethanol

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft	Medium
NIH 3T3	Murine Fibroblasten	ATCC, CRL-1658	<b>DMEM</b> + 10%/2% FCS* + 5mM L-Glutamin + 100IU/mL Pen + 100µg/mL Strep
RK13	Kaninchen- Nierenzellen	ATCC, CCL-37	<b>EMEM</b> + 10%/2% FCS* + 5mM L-Glutamin + 100IU/mL Pen + 100µg/mL Strep
THP-1	Humane Monozyten	ATCC, TIB-202	<b>VLE-RPMI</b> + 10%/2% FCS <sup>†</sup> + 5mM L-Glutamin + 100IU/mL Pen + 100µg/mL Strep
THP-1 shASC	Humane Monozyten, knock-down von ASC durch shRNA	Willingham <i>et al.</i> , 2009	<b>VLE-RPMI</b> + 10%/2% FCS <sup>†</sup> + 5mM L-Glutamin + 100IU/mL Pen + 100µg/mL Strep

\* Kulturmedium: 10% FCS, Infektionsmedium 2% FCS

# Wachstumsmedium: 20% FCS ohne Zeo und HygroB, Selektionsmedium: 10% FCS mit Zeo und HygroB

† Kulturmedium: 10% FCS, Infektionsmedium 2% FCS; FCS mit Endotoxingehalt >1U/mL und auf Zellverträglichkeit getestet

2.1.9. unmarkierte Antikörper

**Tabelle 10: Auflistung der verwendeten unmarkierten Antikörper mit Herkunft und Arbeitsverdünnung**

Bezeichnung	Antigen	Herkunft	Arbeitsverdünnung
Anti-B5	CVRSNEKFDPVDDGPD SKDVVQYEQEIESLEAC	Eurogentec, Seraing, Belgien	1:3000
Anti-His	HHHHHH	Acris, Hiddenhausen	1:10000
Anti-huASC	AS 1-120 huASC	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg	1:500
Anti-mCD16/mCD32 purified	J774-Zellen	BD Biosciences, Heidelberg	1:2500
Anti-MVA IL-1 $\beta$ Rezeptor	CLWEKRGADNDRIIPI	Eurogentec, Seraing, Belgien	1:100
Anti-m $\beta$ -Actin	DDDIAALVIDNGSGK	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	1:10000
Anti-VACV Lister	VACV Lister Proteinpräparation	Dianova, Hamburg	1:2000

2.1.10. markierte Antikörper

**Tabelle 11: Auflistung der verwendeten markierten Antikörper mit Herkunft und Arbeitsverdünnung**

Bezeichnung	Herkunft	Arbeitsverdünnung
Anti-active Capase-3	BD Biosciences, Heidelberg	1:2,5*
Anti-Kaninchen-PO	Dianova, Hamburg	IHC 1:2000, WB 1:10000
Anti-Maus IgG-AP	Dianova, Hamburg	1:5000
Anti-Maus IRDye 680	LI-COR GmbH, Bad Homburg	1:15000
Anti-mB220 Pacific Blue	BD Biosciences, Heidelberg	1:100*
Anti-mCD4 Pacific Blue	BD Biosciences, Heidelberg	1:100*
Anti-mCD40L FITC	AbD Serotec, Düsseldorf	1:5*
Anti-mCD44 APC-Cy7	BD Biosciences, Heidelberg	1:100*

Bezeichnung	Herkunft	Arbeitsverdünnung
Anti-mCD62L APC	BD Biosciences, Heidelberg	1:100*
Anti-mCD8 Pacific Blue	BD Biosciences, Heidelberg	1:250*
Anti-mCD8 PerCP-Cy5.5	BD Biosciences, Heidelberg	1:250*
Anti-mInterferon- $\gamma$ PE	BD Biosciences, Heidelberg	1:100*
Anti-Rabbit IRDye 800	LI-COR GmbH, Bad Homburg	1:15000

\* = Die Verdünnung bezieht sich auf ein hypothetisches Färbevolumen von 50 $\mu$ L so dass eine Verdünnung von 1:100 beispielsweise ein Antikörpervolumen von 0,5 $\mu$ L bedeutet.

### 2.1.11. MHC-Klasse I-Multimere

**Tabelle 12: Auflistung der verwendeten MHC-Klasse I-Multimere mit Herkunft und Arbeitsverdünnung**

Bezeichnung	Antigen	Herkunft	Arbeitsverdünnung
B8 <sub>20</sub> -Pentamer, H2-k <sup>b</sup> PE	TSYKFESV	Prolimmune Ltd, Oxford, UK	5 $\mu$ L pro 1 $\cdot$ 10 <sup>6</sup> Zellen

### 2.1.12. Enzyme

**Tabelle 13: Auflistung der verwendeten Enzyme und deren Herkunft**

Bezeichnung	Herkunft
PNGase F	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Restriktionsenzyme	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt

## 2.1.13. Bakterienstämme

Tabelle 14: Auflistung der verwendeten Bakterienstämme mit Merkmalen und Herkunft

Stamname	Merkmale	Herkunft
One Shot TOP10	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>recA1 araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1 nupG</i> $\lambda$ -	Invitrogen, Karlsruhe

## 2.1.14. Peptide

Tabelle 15: Auflistung der verwendeten Peptide mit Herkunft und Sequenz

Bezeichnung	Sequenz	Referenz	Herkunft
MVA B8 <sub>20</sub> , H2-k <sup>b</sup>	TSYKFESV	Tscharke <i>et al.</i> , 2005	Thermo Electron Corp., Ulm
MVA K3 <sub>6</sub> , H2-k <sup>b</sup>	YSLPNAGDVI	Tscharke <i>et al.</i> , 2005	Thermo Electron Corp., Ulm
pCH110 <i>lacZ</i> <sub>876</sub> , H2-k <sup>b</sup>	TPHPARIGL	Gavin <i>et al.</i> , 1993	Thermo Electron Corp., Ulm

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Mikrobiologische Methoden

#### 2.2.1.1. Transformation von *E. coli*

Zur Amplifikation von Plasmiden wurden diese zunächst mittels Hitzeschock-Transformation in kompetente *E. coli*-Stämme (siehe Tabelle 14) eingebracht. Hierzu wurde die Bakterien-suspension zunächst auf Eis aufgetaut. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1-10ng Plasmid-DNA bzw. des zu transformierenden Ligationsansatzes und eine Inkubation von 30 Minuten auf Eis. Der Hitzeschock wurde für 30 Sekunden bei 42°C im Wasserbad durchgeführt und das Reaktionsgefäß sofort für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurde das 10-fache Volumen LB-Medium zugegeben und die Bakterien-suspension für eine Stunde bei 37°C unter Schütteln vorkultiviert, um die Synthese der Plasmid-kodierten Antibiotikaresistenzen zu ermöglichen. Geeignete Volumina der Transformationsansätze wurden anschließend auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 2.2.1.2. Animpfen von Flüssigkulturen zur Präparation von Plasmid-DNA

Um die Isolation von Plasmid-DNA zu ermöglichen, wurden ein oder mehrere Einzelklone eines Ausstriches mit Hilfe einer Pipettenspitze in ein Kulturröhrchen mit 5mL Antibiotika-haltigem LB-Medium überführt und über Nacht in einem Inkubationsschüttler bei 37°C kultiviert. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte anschließend wie unter 2.2.2.1 beschrieben, bzw. wenn größere Mengen Plasmid-DNA benötigt wurden, durch Überimpfen von 100µL Kultur in 300mL frisches, Antibiotika-haltiges LB-Medium und erneuter Kultivierung über Nacht bei 37°C. Die nachfolgende Isolierung der Plasmid-DNA ist unter 2.2.2.1 dargestellt.

## 2.2.2. DNA-Methoden

### 2.2.2.1. Isolation von Plasmid-DNA

Die Gewinnung von Plasmid-DNA aus Übernachtskulturen (siehe 2.2.1.2) erfolgte mittels alkalischer Lyse der Bakterienzellen und anschließender Aufreinigung der DNA über Silica-Säulen. Hierzu wurde für kleine Kulturvolumina das Qiagen Plasmid Mini Kit verwendet. Für große Volumina diente das Qiagen Plasmid Maxi Kit zur Isolierung der DNA. Die Durchführung erfolgte jeweils nach den Herstellerangaben.

### 2.2.2.2. Isolation von viraler DNA

#### 2.2.2.2.1. Isolation viraler DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion

Infizierte Zellen wurden mit einem Zellschaber aus der Zellkulturplatte gelöst und zusammen mit dem Medium in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Von der Zellsuspension wurde ein Anteil entsprechend  $2,5 \cdot 10^5$  Zellen für die Isolierung der DNA eingesetzt. Die infizierten Zellen wurden durch fünfminütige Zentrifugation bei 1500rpm vom Überstand getrennt. Das Pellet wurde in 50µL 10-fach TEN-Puffer resuspendiert. Für den nachfolgenden Proteinase K-Verdau wurden außerdem 50µL 10% SDS und 50µL Proteinase K zugegeben. Der Verdau erfolgte für eine Stunde bei 56°C in einem Thermomixer (300rpm). Die Extraktion der DNA wurde durch Zugabe von 500µL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) eingeleitet. Das entstandene Zwei-Phasen-System wurde durch kräftiges Vortexen gemischt und die Phasentrennung durch anschließendes Zentrifugieren für fünf Minuten bei 13000rpm herbeigeführt. Die Oberphase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Extraktion mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) wiederholt. Die Oberphase wurde wiederum in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Aufreinigung der enthaltenen DNA erfolgte mittels Fällung. Hierzu wurden 1/10 Volumen 3M Natriumacetat pH 5,3 sowie 2 Volumen eisgekühlter, absoluter Ethanol zugegeben. Die Fällung erfolgte durch Inkubation für 45 Minuten bei -80°C. Die gefällte DNA wurde anschließend durch 45-minütige



Zentrifugation bei 13000rpm pelletiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und zehn Minuten bei 37°C getrocknet. Das Lösen des Pellets erfolgte in 20µL Reinstwasser über Nacht bei 4°C.

### 2.2.2.2.2. Isolation viraler DNA mittels DNeasy Blood & Tissue-Kit

Für die Isolation viraler DNA unter Verwendung des Qiagen DNeasy Blood & Tissue-Kits wurden infizierte Zellen ebenfalls inklusive Medium in ein Reaktionsgefäß überführt und pelletiert. Das Pellet wurde in 200µL PBS resuspendiert und die Zellen anschließend wie vom Hersteller angegeben mit Proteinase K verdaut und die freigesetzte DNA über Silica-Säulen aufgereinigt. Die Elution der DNA erfolgte nicht mit dem mitgelieferten Elutionspuffer, sondern mit 100µL Reinstwasser.

### 2.2.2.3. Restriktionsverdau

Die Restriktion von Plasmid-DNA und PCR-Produkten im Rahmen von Klonierungen erfolgte mit Enzymen der Firma New England Biolabs nach Herstellerangaben in den jeweils zugehörigen Puffern. Für Zwecke des Testverdaus wurden gewöhnlich 1µg DNA in einem Gesamtvolumen von 10µL verdaut und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Für Klonierungen erfolgte der Verdau in einem Gesamtvolumen von 50-100µL. Hierbei wurden 5-10µg DNA eingesetzt.

### 2.2.2.4. Restriktionskartierung von genomischer Virus-DNA

Für die Restriktionskartierung genomischer Vakzinia-DNA wurden zwei 175cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit CEF-Zellen mit einer moi von 10 infiziert und 18h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden abgeschabt, 10 Minuten bei 2000rpm und 4°C pelletiert und in 500µL TE-Puffer mit 0,1% NP-40 resuspendiert. Die Lyse wurde für 10 Minuten auf Eis durchgeführt. Die Suspension wurde 5 Minuten bei 2000rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand noch ein zweites Mal zentrifugiert. Zu diesem Überstand wurde 1µL RNase A gegeben und

15 Minuten bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wurden die Proben wie unter 2.2.2.2.1 beschrieben 4 Stunden mit Proteinase K verdaut und die DNA extrahiert. Hierbei wurde jeder Extraktionsschritt doppelt durchgeführt und durch Invertieren statt durch Vortexen gemischt. Die DNA wurde nach der Fällung in 40µL TE-Puffer resuspendiert und die Konzentration bestimmt. 10µg der DNA wurden wie unter 2.2.2.3 beschrieben für 4 Stunden bei 37°C der Restriktion mit *EcoRI* unterzogen, 20 Minuten bei 65°C hitzeinaktiviert, mit DNA-Probenpuffer versetzt und auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 20V und 4°C. Nach der Hälfte der Gesamtlaufzeit wurde der Laufpuffer ausgetauscht. Das entwickelte Gel wurde wie unter 2.2.2.5 beschrieben dokumentiert.

#### 2.2.2.5. DNA-Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA in Agarosegelen wurden horizontale Elektrophoresekammern verwendet. Für das Gießen der Gele wurde Agarose in der gewünschten Prozentigkeit in 1x TAE-Puffer suspendiert und durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Die Gele wurden mit etwa 0,7 bis 1cm Dicke hergestellt und auf Raumtemperatur abgekühlt. Die aufzutragenden Proben wurden mit 1/6 Volumen EZ Vision als Ladepuffer und Färbereagenz versetzt und bei 80-120V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Dokumentation erfolgte durch Anregen des an die DNA angelagerten Farbstoffs mit UV-Licht der Wellenlänge 366nm und Fotografieren des Gels.

#### 2.2.2.6. Aufreinigung von PCR-Produkten und DNA aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von PCR-Produkten und DNA aus Agarosegelen erfolgte mittels des QIAquick Gel Extraction Kits nach den Angaben des Herstellers. In beiden Fällen erfolgte die Aufnahme der DNA aus der Agarosegelmatrix bzw. aus dem PCR-Ansatz in einem chaotropen Hochsalzpuffer, der die Bindung an Silica-Säulen ermöglichte. Nach dem Waschen der DNA wurde diese nicht in Elutionspuffer, sondern in Reinstwasser gelöst.

### 2.2.2.7. PCR-Methoden

#### 2.2.2.7.1. PCR mit *Taq*-Polymerase

Die Durchführung von PCRs zur Überprüfung von Virus-Klonen, zum Zwecke der Amplifikation für Sequenzierung von viraler und Plasmid-DNA und zur Sequenzüberprüfung von Plasmid-DNA erfolgte mittels des Roche PCR Master-Kits nach Herstellerangaben. Das Reaktionsvolumen betrug 25µL. PCR-Zyklen und -Temperaturen wurden ebenfalls nach Herstellerangaben gewählt. Lediglich die *Annealing*-Temperatur wurde an die jeweils verwendeten Oligonukleotide angepasst. Die Durchführung der Reaktionen erfolgte in einem Gerät des Typs T Personal von Biometra.

#### 2.2.2.7.2. PCR mit *Proofreading*-Polymerase für Klonierungen

Die Amplifikation von DNA für Klonierungen erfolgte mit einer Polymerase mit 3'-5'-Exnukleaseaktivität (*Proofreading*). Es wurde eine rekombinante *Pwo*-Polymerase verwendet. Das Ansatzvolumen betrug 50µL. 2,5U Polymerase und PCR-Puffer wurden in einem ersten und 1µM dNTPs, 1µg DNA und 10pmol Primer in einem zweiten Mix angesetzt und erst kurz vor dem Start der PCR vereinigt. Das Temperaturprotokoll wurde gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

### 2.2.2.8. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon, Martinsried. Zu diesem Zweck wurde 1µg der Probe vakuumgetrocknet und zusammen mit den zur Sequenzierung zu verwendenden Oligonukleotiden der Firma übergeben. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit den Programmen FinchTV und SeqMan.

#### 2.2.2.9. Dephosphorylierung

Um die Religation eines restringierten Vektors in Ligationsansätzen zu verhindern, wurde dieser vorher dephosphoryliert. Dies geschah mittels des Enzyms Antarctic Phosphatase nach den Angaben des Herstellers. Der dephosphorylierte Vektor wurde anschließend direkt in die Ligation eingesetzt.

#### 2.2.2.10. Ligation

Für die Ligation von DNA wurde das Enzym T4 DNA Ligase und der mitgelieferte 10-fach Reaktionspuffer verwendet. Anhand eines Agarosegels wurde die Konzentration von Vektor und zu inserierender DNA abgeschätzt und diese in einem 5-10-fachen Überschuss in die Reaktion eingesetzt. Wenn nicht anders angegeben, betrug das Reaktionsvolumen 10µL und die Inkubationstemperatur 4°C über Nacht. Der gesamte Ligationsansatz wurde wie unter 2.2.1.1 dargestellt transformiert.

### 2.2.3. Proteinbiochemische Methoden

#### 2.2.3.1. Herstellung von Proteinpräparationen aus kultivierten Zellen

Für die Herstellung von Proteinlysaten wurden zwei verschiedene Methoden angewandt. Standardmäßig erfolgte die Lyse der Zellen mit 1x SDS-Lysispuffer. Hierzu wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen ein Mal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100µL Lysispuffer pro  $1 \cdot 10^6$  Zellen. Die Zellen wurden durch Pipettieren im Lysispuffer resuspendiert und die gesamte Probe sofort in ein QIAshredder-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 13000rpm und 4°C für zwei Minuten erfolgte die Lagerung der Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20°C.

Da mit oben genanntem Puffer keine Bestimmung der Proteinkonzentration möglich war, erfolgte in solchen Fällen die Lyse der Zellen in RIPA-Puffer. Hierzu wurden die Zellen nach Waschen mit PBS in 100µL Lysispuffer pro  $1 \cdot 10^6$  Zellen resuspendiert und anschließend 20

Minuten auf Eis inkubiert. Die Abtrennung der Zelltrümmer erfolgte durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt bei 13000rpm und 4°C für 5 Minuten. Die Überstände wurden bei -20°C gelagert.

#### 2.2.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Lysaten in RIPA-Puffer erfolgte mit dem Biorad Proteinassay-Reagenz. Das Reagenz wurde nach Herstellerangaben verdünnt und mit 5µL Proteinlysate versetzt. Die Proben wurden gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Absorption bei 595nm in einem Ultrospec Biophotometer. Die Proteinkonzentration wurde durch lineare Regression mit den Absorptionswerten einer BSA-Verdünnungsreihe bekannter Konzentrationen errechnet.

#### 2.2.3.3. Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte durch denaturierende SDS-Gelelektrophorese. Hierzu wurden Acrylamid/Bisacrylamid-Gele in der jeweiligen Prozentigkeit in 1mm Mini ProteanII Apparaturen vorbereitet. Die Zusammensetzung der Trenngele wurde dem Handbuch Roche Lab FAQ (2010) entnommen. Alle Trenngele wurden in Kombination mit 5%-igen Sammelgelen verwendet. Pro Spur wurden ca. 5-15µg Protein in SDS Probenpuffer aufgetragen. Die Entwicklung der Gele erfolgte in SDS-Laufpuffer bei einer Spannung von 80 bis 120V und einer Stromstärke von maximal 400mA.

#### 2.2.3.4. Coomassie-Färbung

Die entwickelten Proteingele wurden direkt nach Beendigung der Elektrophorese in Rotiphorese Blau R überführt und nach Angaben des Herstellers für etwa 15-30 Minuten gefärbt. Das Entfärben erfolgte mit 50%/10%/40% v/v Methanol/Eisessig/Wasser drei Mal für jeweils 15 Minuten. Die Dokumentation erfolgte durch Einscannen der noch feuchten Gele zwischen zwei UV-durchlässigen Plastikfolien.

#### 2.2.3.5. Silberfärbung

Die Silberfärbung von Proteingelen erfolgte mit dem ProteoSilver™ Plus Silver Stain Kit nach Herstellerangaben. Die Dauer der Färbung betrug gewöhnlich 10-15 Minuten. Die Dokumentation der Gele erfolgte ebenfalls durch Einscannen wie unter 2.2.3.4. dargestellt.

#### 2.2.3.6. *Western Blot*

##### 2.2.3.6.1. *Tank-Blot*

Die Durchführung des *Tank-Blots* erfolgte ebenfalls in Mini ProteanII-Kammern. Die entwickelten Proteingele und eine Nitrozellulosemembran von der Größe des Gels wurden auf einen Stapel bestehend aus einem Gewebeschwamm und zwei Whatman-Papieren gelegt, mit zwei weiteren Whatman-Papieren und einem Gewebeschwamm abgedeckt und in die dafür vorgesehene Halterung gelegt. Hierbei zeigte die Membranseite des Aufbaus in Richtung der Anode. Die Gele wurden in die Apparatur mit *Tank-Blot* Transferpuffer überführt. Der Proteintransfer erfolgte bei 100V und maximal 400mA für eine Stunde bei Raumtemperatur.

##### 2.2.3.6.2. *Semi-Dry Blot*

Der Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran im *Semi-Dry* Verfahren erfolgte in Transferkammern mit Flächenelektroden. Auf die Anode wurden zunächst drei mit Anodenpuffer I getränkte Whatman-Papiere gelegt. Hierauf folgten drei Whatman-Papiere mit Anodenpuffer II. Anschließend wurde eine mit Methanol aktivierte PVDF-Membran und hierauf das entwickelte Proteingel in die Apparatur gelegt. Die Membran wurde mit drei in Kathodenpuffer getränkten Whatman-Papieren abgedeckt. Der Proteintransfer erfolgte mit  $1\text{mA}/\text{cm}^2$ .

### 2.2.3.7. Nachweis Membran-immobilisierter Proteine

#### 2.2.3.7.1. Fluoreszenznachweis

Nach dem Blotvorgang wurde die Membran in ein 50mL Röhrchen mit LICOR Blocking Puffer überführt und eine Stunde auf dem Rollermischer bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Anschließend wurde der Primärantikörper in LICOR Blocking Puffer mit 0,1% Tween-20 verdünnt und über Nacht bei 4°C auf einem Rollermischer auf der Membran belassen. Das Waschen der Membran erfolgte in PBS mit 0,05% Tween-20 viermalig für jeweils 5 Minuten auf dem Rollermischer. Danach erfolgte die Zugabe des IRDye-konjugierten Sekundärantikörpers in LICOR Blocking Puffer mit 0,1% Tween-20 und 0,01% SDS. Die Inkubation wurde für zwei Stunden auf dem Rollermischer bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Membran wurde wie oben stehend beschrieben gewaschen und an einem LICOR-Scanner eingescannt.

#### 2.2.3.7.2. Lumineszenznachweis

Nach beendetem Blotvorgang wurde die Membran in ein 50mL-Röhrchen mit PBS mit 5% Magermilchpulver und 0,05% Tween-20 (Blockingpuffer) überführt und eine Stunde auf dem Rollermischer bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Die Inkubation mit dem in Blockingpuffer verdünnten Primärantikörper auf dem Rollermischer erfolgte bei 4°C über Nacht. Anschließend wurde die Membran mit PBS mit 0,05% Tween-20 viermalig für jeweils 5 Minuten auf dem Rollermischer gewaschen. Der HRP-konjugierte Sekundärantikörper wurde in Blockingpuffer verdünnt und die Membran damit für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Rollermischer inkubiert. Das Waschen erfolgte wie oben beschrieben. Die Membran wurde auf ein Papiertuch abgetropft und mit der nach Anleitung hergestellten Lumi-Light Substratlösung vollständig bedeckt. Nach fünfminütiger Inkubation im Dunklen wurde das Substrat durch abtropfen entfernt. Zur Detektion wurde die Membran entweder an einem Lumi-Imager eingescannt oder ein Film aufgelegt und entwickelt.

## 2.2.4. Zellkulturtechniken

### 2.2.4.1. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Kryokonservierung von Zelllinien erfolgte in speziellem Einfriermedium aus 90% v/v FCS und 10% v/v DMSO. Hierzu wurden die Zellen einer 175cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit PBS gewaschen, abgelöst und durch abzentrifugieren bei 1200rpm und Raumtemperatur für 5 Minuten pelletiert. Das Pellet wurde in 2mL Einfriermedium resuspendiert und auf zwei Kryoröhrchen verteilt. Diese wurden zunächst durch Aufbewahren in einem -80°C-Gefrierschrank schnell auf -80°C heruntergekühlt und dann in einem Stickstoff-Lagertank mit -180°C in der Gasphase gelagert.

Das Auftauen der Zellen erfolgte durch rasches Aufwärmen der Zellen in einem 37°C-Wasserbad und Überführen in Kulturmedium. Die Zellen wurden pelletiert, in frischem Medium aufgenommen und in eine 175cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt.

### 2.2.4.2. Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels eines automatischen Beckman Coulter Z1 Zählgerätes. 1:100 oder 1:1000 Verdünnungen der zu bestimmenden Zellsuspension in 10mL Isoton wurden zur Zählung verwendet. Gemessen wurden nur Zellen zwischen 6 und 25µm.

### 2.2.4.3. Präparation von Hühnerembryofibroblasten (engl. *chicken embryo fibroblasts*, CEF)

Die Präparation von CEF-Zellen erfolgte aus 10 Tage bei 37°C und 50% Luftfeuchtigkeit bebrüteten, spezifisch-Pathogen-freien Eiern. Die Embryonen wurden steril aus dem Ei entnommen und der Kopf abgetrennt. Die Eingeweide wurden entfernt und die gesäuberten Embryonenteile ein Mal in PBS gewaschen. Die Embryonen wurden durch eine 50mL Spritze in einen Erlenmeyerkolben überführt und somit gleichzeitig zerkleinert. Pro Embryo wurden 2,5mL Trypsin und 3,75mL PBS zugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Magnetrührer bei ca. 300rpm inkubiert. Nach dem Absetzen der Gewebeteile wurde der



Überstand über sterile Gaze filtriert. Der Verdau wurde noch zwei Mal mit 2mL bzw. 1,5mL Trypsin und 2,25mL bzw. 1mL PBS wiederholt. Die Überstände wurden jeweils für 7 Minuten bei 1500rpm und 4°C abzentrifugiert, die entstandenen Pellets zwei Mal mit PBS gewaschen und anschließend in Medium resuspendiert. Die verschiedenen Fraktionen wurden vereinigt, nochmals über Gaze filtriert und die Zellen entsprechend 1/8 bis 1 Ei (je nach gewünschter Zelldichte) in 175cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät.

#### 2.2.4.4. Präparation von Milzzellen

Das Töten der Mäuse wurde wie unter 2.2.7.1 beschrieben durchgeführt. Nach erfolgter Entnahme der Milzen wurden diese in eine Zellkulturschale mit PBMC-Medium überführt. Die Milzzellen wurden durch Ausklopfen der Milzkapsel mit einer 2mL Messpipette freigesetzt und resuspendiert. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 1200rpm und Raumtemperatur pelletiert und zur Lyse der Erythrozyten in 3mL Blutlysepuffer aufgenommen. Die Zellen wurden 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Lyse mit 7mL PBMC-Medium gestoppt. Die Zellen wurden nochmals pelletiert und ein Mal mit PBMC-Medium gewaschen. Die Zellen wurden in 1mL PBMC-Medium resuspendiert und über Filcon-Filter filtriert, um Gewebereste zu entfernen. Zuletzt wurde die Zellzahl bestimmt (siehe 2.2.4.2.).

#### 2.2.4.5. Präparation von Blutzellen

Für die Präparation von Zellen aus Blut wurden 500-700µL Vollblut mit 3mL Blutlysepuffer versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Stoppen der Lyse erfolgte mit 7mL PBMC-Medium. Die Zellen wurden bei 1200rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur pelletiert und ein Mal mit PBMC-Medium gewaschen. Das Pellet wurde in 500-1000µL PBMC-Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

#### 2.2.4.6. Präparation von Peritonealzellen

Peritonealzellen wurden durch Lavage des Peritoneums gewonnen. Hierzu wurden Mäuse mit CO<sub>2</sub> getötet und die Bauchdecke durch Entfernen des Fells freigelegt. Dann wurden 5-7mL PBS in die Bauchhöhle injiziert und die Peritonealzellen durch leichtes Bewegen der Maus resuspendiert. Die zellhaltige Flüssigkeit wurde aus der Bauchhöhle entnommen und die Zellen für 5 Minuten bei 1200rpm und Raumtemperatur pelletiert. Anschließend wurde ein Mal mit PBMC-Medium gewaschen und die Zellen in 500µL Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

#### 2.2.4.7. Differenzierung von Makrophagen und dendritischen Zellen aus Maus-Knochenmarkszellen

Zur Untersuchung der IL-1β-Induktion und -Sekretion nach MVA-Infektion *in vitro*, wurden Makrophagen und myeloide dendritische Zellen (mDC) aus Knochenmarkszellen der Maus differenziert.

Die Mäuse wurden durch Überdosierung einer Ketamin/Xylazin-Narkose und anschließende zervikale Dislokation wie unter 2.2.7.1 beschrieben getötet und das Fell mit 70%-igem Ethanol desinfiziert. Anschließend wurde das Fell vollständig von den Hinterbeinen abpräpariert und im Verlaufe dessen auch die Füße knapp oberhalb der Fußzehen abgetrennt. Dann wurden die Beine mit einer Schere oberhalb des Hüftgelenks vom Abdomen abgetrennt und vorsichtig vollständig von Muskelgewebe und Sehnen befreit. Hüft-, Knie- und Fußgelenk wurden ebenfalls mit einer Schere durchtrennt. Für die weitere Präparation wurden die auf diese Weise erhaltenen *Femur* und *Tibia* für 30 Sekunden in 70%-igem Ethanol desinfiziert. Nach Abtrocknen des Alkohols wurden die Knochen an beiden Enden mit einer Schere eröffnet und das Knochenmark mit einer mDC-Medium-gefüllten Spritze mit Kanüle in eine 10cm Zellkulturschale gespült. Das Vereinzeln der Zellen erfolgte durch wiederholtes Auf-und-Ab-Pipettieren der erhaltenen Zellsuspension. Die Zellen wurden in ein Zentrifugationsgefäß überführt und bei 1200rpm fünf Minuten bei Raumtemperatur pelletiert. Danach erfolgte die Lyse der Erythrozyten. Hierzu wurden die Zellen in 3mL Blutlysepuffer resuspendiert und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert.

---

Anschließend erfolgte eine Inaktivierung des Lysispuffers durch Mediumzugabe. Die Zellen wurden nochmals pelletiert und ein Mal mit Medium gewaschen.

Für die Generierung von Makrophagen erfolgte das Einstellen der Zellzahl auf  $1 \cdot 10^6$ /mL mit R10-Medium. Die Zellen wurden in Anwesenheit von 20ng/mL rekombinatem, murinem *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) für 10 Tage in 10cm Zellkulturschalen im Brutschrank kultiviert. Nach zwei Tagen wurde nochmals die gleiche Menge zytokinhaltiges Medium zugegeben und anschließend alle zwei Tage die Hälfte des Kulturüberstandes verworfen und durch frisches, zytokinhaltiges Medium ersetzt. Das Ablösen der Zellen nach beendeter Differenzierung erfolgte durch 15-minütiges Trypsinieren bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen mit R10-Medium gewaschen und für Infektionsexperimente verwendet.

Myeloide dendritische Zellen wurden ebenfalls mit einer Zellzahl von  $1 \cdot 10^6$ /mL in mDC-Medium kultiviert. Die Differenzierung erfolgte in Anwesenheit von 100ng/mL rekombinatem, murinem *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) für 8 Tage im Brutschrank. Alle zwei Tage wurde die Hälfte der Zellen abzentrifugiert, das Medium verworfen und die Zellen in frischem, zytokinhaltigem Medium erneut zur Kultur gegeben. Für weitere Experimente wurde die nicht/schwach adhärente Zellfraktion verwendet.

## 2.2.5. Virologische Techniken

### 2.2.5.1. Infektion von Zellen mit MVA

Die Infektion von Zellen mit Wildtyp- oder rekombinatem MVA wurde - falls nicht anders angegeben - in Medium mit reduziertem FCS-Gehalt von 2% durchgeführt. Virussuspensionen, die noch intakte Zellen enthielten, wurden zunächst dreimalig eingefroren und wieder aufgetaut, um Zellen und Virusaggregate zu zerstören. Anschließend wurden alle Virussuspensionen in einem Ultraschallbad drei Mal für eine Minute auf Eis sonifiziert. Zwischen den einzelnen Sonifikationsschritten wurden die Proben für jeweils 15 bis 30 Sekunden kräftig mit einem Vortex-Gerät gemischt. Nachfolgend wurde die Virussuspension auf die gewünschte Virusmenge verdünnt und die Verdünnung auf die Zellen gegeben. Die Adsorption des Virus erfolgte für 60-120 Minuten bei 37°C im

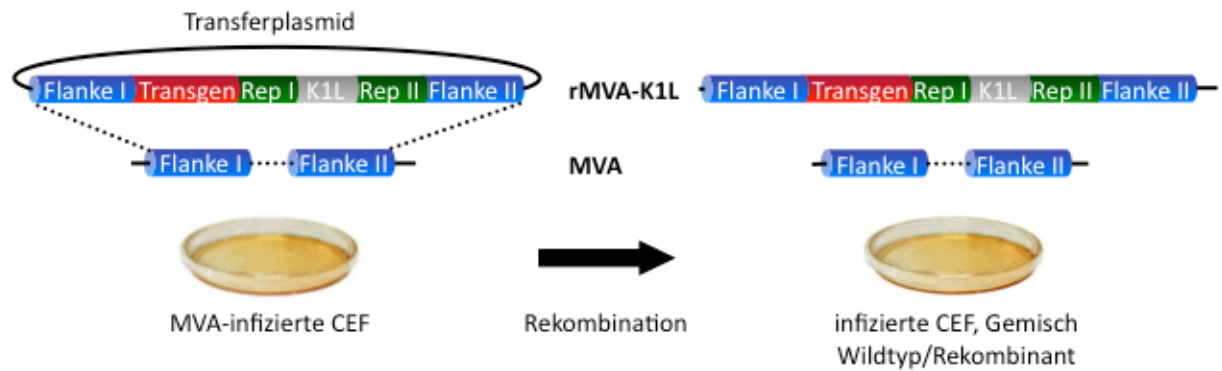
---

Brutschrank. Das virushaltige Medium wurde von den Zellen abgenommen und durch neues Infektionsmedium ersetzt.

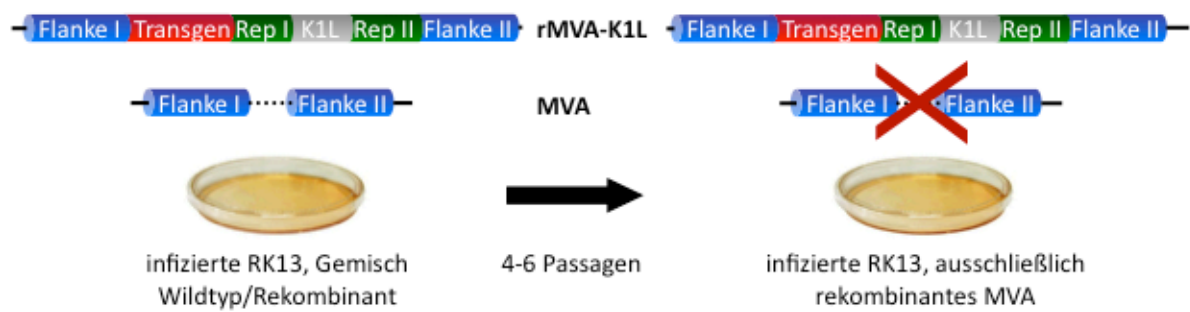
#### 2.2.5.2. Herstellung rekombinanter Viren mittels K1L-Selektion

Die Selektion rekombinanter, MVA-basierter Viren kann zur Herstellung von Insertions- und Deletionsmutanten verwendet werden. In dieser Arbeit wurde die Technik lediglich zur Herstellung von Insertionsmutanten verwendet. Das zu Grunde liegende Prinzip ist die homologe Rekombination eines Gens von einem Transferplasmid in das MVA-Genom, welches sich zu Nutze macht, dass MVA auf RK13-Zellen nur in Gegenwart des K1L-Gens replizieren kann (Staib *et al.*, 2000). Als Ausgangsvirus wurde ein MVA F6-Stamm verwendet, MVAII<sub>new</sub> aus dem die K1L-Restsequenz entfernt wurde (Staib *et al.*, 2003). Abbildung 5 stellt den Vorgang der Virusherstellung schematisch dar. Zunächst wurde ein Transferplasmid benötigt. In diesem befinden sich flankierende Sequenzen des gewünschten Insertionsortes, häufig einer der 6 MVA-Deletionen. Dazwischen sind das zu inserierende Gen und der Selektionsmarker K1L angeordnet. Das K1L-Gen wird von zwei repetitiven Sequenzabschnitten flankiert, häufig Fragmente des *E.coli lacZ*-Gens. Nach Infektion von CEF-Zellen erfolgte die Transfektion des Transferplasmids. Plasmid und Virusgenom können aufgrund der homologen, flankierenden Sequenzen miteinander rekombinieren, was zu einer Integration der Gene zwischen den Flanken in das MVA-Genom führt (Abbildung 5, Schritt 1). Das erhaltene Virusgemisch aus Wildtyp und rekombinanten Virus wurde so lange auf RK13-Zellen, die nur für das rekombinante Virus permissiv sind (Sutter *et al.*, 1994), passagiert, bis durch PCR kein Wildtyp-Virus mehr nachweisbar war (Abbildung 5, Schritt 2). Anschließend erfolgte die Passage des rekombinanten Virus auf CEF-Zellen, in denen das Vorhandensein von K1L nicht essentiell für die Replikation ist. Aufgrund der lacZ-Flanken kann das K1L nun durch homologe Rekombination aus dem Virusgenom eliminiert werden (Abbildung 5, Schritt 3). Die Passage auf CEF-Zellen erfolgte so lange, bis kein K1L mehr durch PCR nachweisbar war.

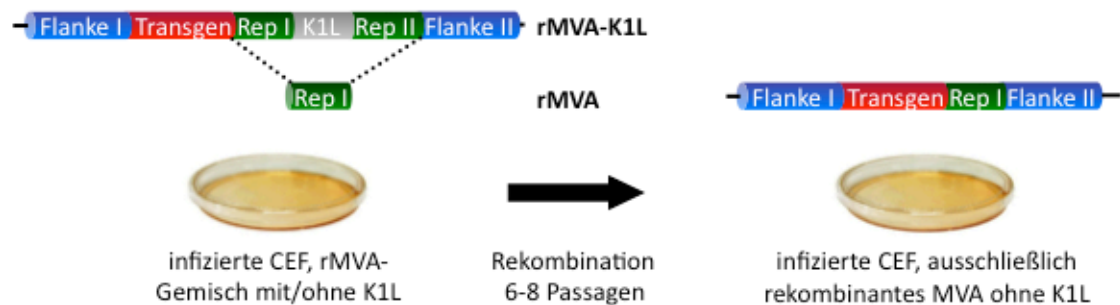
### 1 Transfektion/Infektion



### 2 Selektion



### 3 Elimination von K1L



**Abbildung 5: Schema der Herstellung von rekombinantes MVA mittels K1L-Selektion.** 1: Herstellung des rekombinantes Virus durch Infektion und Transfektion von CEF-Zellen. 2: Selektion des rekombinantes Virus durch K1L auf RK13-Zellen. 3: Elimination von K1L durch Passage auf CEF-Zellen. Rep = repetitive Sequenz, rMVA = rekombinantes MVA.

#### 2.2.5.2.1. Infektion und Transfektion

Für die Infektion und Transfektion wurden ausschließlich Medien ohne Antibiotikazusatz verwendet. Subkonfluente CEF- oder BHK21-Zellen (70-80%) in einer 6er Zellkulturplatte wurden mit dem Ausgangsvirus wie unter 2.2.5.1 beschrieben mit einer  $moi$  von 0,05 infiziert. Das Virus in 1mL Infektionsmedium wurde 90 Minuten auf den Zellen belassen. Während der Virusadsorption wurden 4 $\mu$ g des Transferplasmids in 250 $\mu$ L Medium ohne Zusätze mit 10 $\mu$ L Transfektionsreagenz in 250 $\mu$ L Medium ohne Zusätze gemischt (Verhältnis Plasmid:Transfektionsreagenz 1:2,5) und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der 90-minütigen Adsorption wurde das virushaltige Medium von den Zellen abgenommen und durch 1,5mL frisches Infektionsmedium ersetzt. Das Transfektionsgemisch wurde anschließend direkt in dieses Medium getropft. Die Zellen wurden 48-72 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert, nachfolgend abgeschabt und inklusive Medium in die Blindpassage eingesetzt.

#### 2.2.5.2.2. Blindpassage

Die Blindpassage diente zur Amplifikation der entstandenen, rekombinanten Virusklone. Hierzu wurden 1/4 Volumen des Ansatzes aus 2.2.5.2.1 auf CEF-Zellen gegeben und 48-72 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die infizierten Zellen wurden durch Abschaben wiedergewonnen.

#### 2.2.5.2.3. Passagierung auf RK13-Zellen (Wildtyp-Elimination)

Zur Elimination des Wildtyp-Virus wurden RK13-Zellen mit 1/4 Volumen der Blindpassage infiziert. Nach zweistündiger Virusadsorption wurden 2-fach MEM und 2% *Low melting point* Agarose (in Reinstwasser) 1:1 gemischt und von diesem Gemisch 2mL in jede Vertiefung der 6er Zellkulturplatte gegeben. Die Agarschicht wurde etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur erstarren gelassen und die Zellen anschließend 3-5 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Agarschicht diente dazu, die Vermischung von Einzelklonen über das Medium zu

---

vermeiden. Nach Ausbildung von Infektionsherden auf dem Zellrasen wurden diese inklusive der darüber liegenden Agarose mit einer 200 $\mu$ L Pipettenspitze abgeschabt, in 500 $\mu$ L Infektionsmedium überführt und drei Mal eingefroren und wieder aufgetaut. 200 $\mu$ L des Virusklons wurden zur Infektion von  $1 \cdot 10^6$  BHK21-Zellen und die anschließende DNA-Gewinnung wie unter 2.2.2.2.2 beschrieben verwendet. Die DNA wurde durch PCR wie unter 2.2.2.7.1 beschrieben auf Wildtyp-Kontaminationen überprüft. Eine Test-PCR wurde alle 2 Passagen durchgeführt. Die Passagierung erfolgte in 12er Zellkulturplatten so lange, bis kein Wildtyp-Virus mehr durch PCR nachgewiesen werden konnte.

#### 2.2.5.2.4. Passagierung auf CEF-Zellen (K1L-Elimination)

Durch Entfernen des Selektionsdruckes wurde die Elimination des Selektionsmarkers K1L gefördert. Je 200 $\mu$ L der Wildtyp-freien Virusklone aus 2.2.5.2.3 wurden zur Infektion von CEF-Zellen in 12er Zellkulturplatten verwendet. Anschließend erfolgten die Überschichtung mit Agarose, Inkubation und Gewinnung der Virusklone wie unter 2.2.5.2.3 beschrieben. Alle 2 Passagen wurde eine Infektion von BHK21-Zellen zur DNA-Gewinnung und anschließende PCR auf K1L durchgeführt. Die Passagierung auf CEF-Zellen erfolgte so lange, bis kein K1L mehr nachweisbar war. Von mindestens zwei reinen Virusklonen erfolgte die Amplifikation.

#### 2.2.5.2.5. Amplifikation und Überprüfung der Virusklone

Die reinen Virusklone wurden zur Infektion von CEF-Zellen in einer Kammer einer 6er Zellkulturplatte verwendet. Nach 48-72 Stunden wurden die Zellen abgeschabt und für die Infektion einer Zellkulturflasche mit 75cm<sup>2</sup> Fläche benutzt. Aus dem gesamten Ansatz wurde schließlich eine T175-Zellkulturflasche infiziert. Das so erhaltene Virus wurde ein weiteres Mal durch PCR überprüft. Dann erfolgte die weitere Amplifikation des Virus. Die vorhandene Virussuspension wurde gegebenenfalls mit Infektionsmedium auf 30mL aufgefüllt und je 1mL in neue, mit Medium vorbereitete, T175-Zellkulturflaschen CEF-Zellen gegeben. Das Gesamtvolumen des Mediums für die Virusadsorption betrug 5mL. Die Adsorption wurde unter langsamem Schwenken zwei Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach der Adsorption wurde mit Infektionsmedium auf 22,5mL Gesamtvolumen aufgefüllt und die

---

infizierten Zellen für 48 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der vollständigen Infektion des Zellrasens wurden die Kulturflaschen bei -80°C eingefroren um Viruspartikel aus den Zellen frei zu setzen und das Ablösen der Zellen zu vereinfachen. Zum Auftauen wurden die Kulturflaschen wieder aus dem Gefrierschrank genommen und langsam auf Raumtemperatur gebracht. Sobald der Überstand angetaut war, wurden alle Kulturflaschen so lange durch kräftiges Klopfen behandelt, bis das gefrorene Medium in kleine Stücke zerbrochen war. Dieses Vorgehen diente dazu, die infizierten Zellen vollständig vom Boden der Kulturflasche abzulösen. Nachfolgend wurden Zelltrümmer und die im Überstand enthaltenen Virionen durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert. Hierzu wurden die vollständig aufgetauten Proben in Zentrifugenbecher überführt und in einem Festwinkelrotor (Typ 19) 1,5 Stunden bei 16000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die virushaltigen Pellets in 10mM Tris pH 9,0 resuspendiert. Die Suspension wurde noch zwei weitere Male eingefroren und wieder aufgetaut, um alle Zellen vollständig zu zerstören und die Virionen freizusetzen. Die Suspension wurde als so genannter *crude stock* aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Vor der weiteren Verwendung wurde das Wachstumsverhalten des rekombinanten Virus (siehe 2.2.5.5), sowie die Expression des inserierten Proteins überprüft.

### 2.2.5.3. Virusamplifikation und Aufreinigung für den experimentellen Gebrauch

Der *crude stock* diente als Ausgangsmaterial zur Herstellung neuer Viruslösungen für den experimentellen Gebrauch. Der Virustiter des *crude stocks* wurde bestimmt (siehe 2.2.5.4) und gemäß 2.2.5.2.5 eine Infektion mit  $1 \cdot 10^7$  *plaque forming units* (PFU)/T175-Flasche ( $\text{moi} \approx 1$ ) durchgeführt. Die so erhaltene Virussuspension wurde nach der Aufreinigung im Festwinkelrotor wie unter 2.2.5.2.5 beschrieben einer weiteren Reinigung über Sucroslösung in einem Ausschwingrotor (SW32Ti) unterzogen. In den Zentrifugenröhrchen wurden 10mL 36%-ige Sucroslösung vorgelegt, die Virussuspension drei mal 15 Sekunden mit einer Ultraschallnadel auf Eis behandelt und anschließend 10mL Virussuspension je Röhrchen über die Sucroslösung geschichtet. Die Zentrifugation erfolgte für eine Stunde und zwanzig Minuten bei 13300rpm und 4°C. Das so gewonnene, pelletierte Virus wurde im geringstmöglichen Volumen 10mM Tris pH 9,0 resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C



---

gelagert. Wenn nicht anders angegeben, wurden die auf diese Weise gewonnenen Virussuspensionen für alle Analysen in dieser Arbeit verwendet.

#### 2.2.5.4. Bestimmung des Virustiters

Zur Ermittlung des Virustiters wurden serielle Verdünnungen des zu bestimmenden Virus hergestellt und die nach Infektion von CEF-Zellen entstandene Anzahl von Plaques immunhistochemisch nachgewiesen. Hierfür erfolgte die Herstellung von Verdünnungen des Virus über 9 log-Stufen ( $10^{-1}$  bis  $10^{-9}$ ) in Infektionsmedium. Die Verdünnungsstufen  $10^{-3}$  bis  $10^{-9}$  wurden in Duplikaten auf CEF-Zellen in 6er Zellkulturplatten in einem Volumen von 1mL ausgebracht und die Adsorption des Virus für zwei Stunden bei 37°C im Brutschrank durchgeführt. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und frisches Infektionsmedium zugegeben. Die infizierten Zellen wurden 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Für die immunhistochemische Färbung wurde das Medium entfernt und 5 Minuten mit eiskaltem Methanol/Aceton (50:50) fixiert. Anschließend wurde für 30 Minuten mit 3% FCS in PBS blockiert, um unspezifische Bindungen der verwendeten Antikörper zu vermeiden. Der Erstantikörper  $\alpha$ -VACV Lister wurde in einer Verdünnung von 1:2000 in PBS für zwei Stunden bei Raumtemperatur und unter Schwenken verwendet. Danach erfolgte ein 5-minütiger Waschschrift mit PBS. Der peroxidasegekoppelte  $\alpha$ -Kaninchen-Zweitantikörper wurde ebenfalls 1:2000 in PBS eingesetzt. Die Inkubationsdauer betrug 45 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde nochmals mit PBS gewaschen und dann das TrueBlue-Substrat zugegeben. Das Reagenz wurde so lange auf den Zellen belassen, bis eine deutliche Färbung sichtbar war (ca. 5 Minuten). Die Reaktion wurde mit Leitungswasser gestoppt und die Platten luftgetrocknet. Die Anzahl der Plaques wurde ausgezählt, mit der Verdünnungsstufe verrechnet und von den Duplikaten ein Mittelwert gebildet. Die Titerangabe erfolgte in *plaque forming units* (PFU)/mL.

---

### 2.2.5.5. Wachstumsanalyse

#### 2.2.5.5.1. Einstufen-Wachstumsanalyse

Die Einstufen-Wachstumsanalyse diente dazu, die produzierte Menge Virus pro infizierter Zelle festzustellen. Hierfür wurden CEF-Zellen in 6er Zellkulturplatten ausgesät und mit einer  $moi$  von 10 infiziert. Die Virusadsorption erfolgte in 1mL Medium für 2 Stunden. Anschließend wurde ein Mal mit 2mL Medium gewaschen und 2mL frisches Infektionsmedium zugegeben. Nach 0, 4, 8, 12, 24 und 48 Stunden wurden die Zellen abgeschabt und mit Überstand in ein Reaktionsgefäß überführt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Bestimmung des Virusgehaltes erfolgte durch Titration wie unter 2.2.5.4 beschrieben.

#### 2.2.5.5.2. Mehrstufen-Wachstumsanalyse

Mittels der Mehrstufen-Wachstumsanalyse wurde die Fähigkeit des Virus analysiert, sich auf einem Zellrasen auszubreiten. Hierfür wurden CEF-Zellen in 6er Zellkulturplatten ausgesät und mit einer  $moi$  von 0,05 infiziert. Die Virusadsorption erfolgte in 1mL Medium für 2 Stunden. Anschließend wurde ein Mal mit 2mL Medium gewaschen und 2mL frisches Infektionsmedium zugegeben. Nach 0, 12, 24, 48 und 72 Stunden wurden die Zellen abgeschabt und mit Überstand in ein Reaktionsgefäß überführt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Bestimmung des Virusgehaltes erfolgte durch Titration wie unter 2.2.5.4 beschrieben.

#### 2.2.5.6. Expressionsanalyse durch $^{35}\text{S}$ -Markierung viraler Proteine

Durch  $^{35}\text{S}$ -Markierung neu synthetisierter, viraler Proteine aus infizierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten ist es möglich, den Verlauf des viralen Lebenszyklus nachzuvollziehen. Hierzu wurden CEF-Zellen in 12er Zellkulturplatten in 500 $\mu\text{L}$  Infektionsmedium mit dem jeweiligen Virus entsprechend einer  $moi$  von 10 infiziert. Die Adsorption des Virus erfolgte für 40 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Anschließend wurde mit 1mL Medium gewaschen, 1mL Infektionsmedium zugegeben und bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank inkubiert. 30

Minuten vor dem gewünschten Analysenzeitpunkt wurde das Medium abgenommen, die Zellen gewaschen und 50 $\mu$ Ci  $^{35}$ S-Labeling-Mix in 500 $\mu$ L DMEM ohne Cystein und Methionin zugegeben. Die weitere Inkubation der Zellen erfolgte unsteril bei 37°C in einem Hybridisierungssofen für 30 Minuten. Aus den infizierten Zellen wurden wie unter 2.2.3.1 beschrieben Proteinlysate mit 1-fach SDS-Lysispuffer hergestellt und auf einem SDS-Polyacrylamidgel (siehe 2.2.3.3) aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte entgegen den Angaben in 2.2.3.3 in einer größeren ProteanII-Apparatur unter entsprechender Anpassung der Mengenangaben für ca. 3 Stunden bei 200V. Die entwickelten Gele wurden mit 7%-iger Essigsäure bedeckt und für 30 Minuten fixiert. Die Essigsäure wurde abgossen und die Gele mit Amplify-Lösung für 30 Minuten überschichtet. Anschließend wurden die SDS-Gele auf Whatman-Papier überführt, mit Folie abgedeckt und 2 Stunden bei 80°C im Vakuumgeltrockner getrocknet. Die Detektion erfolgte durch Auflegen (bei -80°C) und Entwickeln eines Röntgenfilms.

## 2.2.6. Immunologische Techniken

### 2.2.6.1. ELISA

#### 2.2.6.1.1. ELISA-Nachweis von murinem Interleukin-1 $\beta$

Der immunologische Nachweis von IL-1 $\beta$  erfolgte mittels eines Kits (siehe 2.1.4). MaxiSorp-Platten wurden gemäß den Angaben des Herstellers für den Test vorbereitet. Die zu messenden Zellkulturüberstände wurden 1:1 mit 10% FCS in PBS verdünnt und zwei Stunden bei Raumtemperatur in den vorbereiteten Platten auf dem Orbitalmischer inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden ebenfalls gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die Dauer der Detektion betrug gewöhnlich 30 Minuten. Die entwickelten ELISA-Platten wurden gescannt und nachfolgend durch lineare Regression in Microsoft Excel ausgewertet.

#### 2.2.6.1.2. ELISA-Nachweis von murinem Interleukin-7 und Interleukin-15

Der Nachweis von IL-7 und IL-15 erfolgte ebenfalls unter Verwendung eines Kits (siehe 2.1.4). MaxiSorp-Platten wurden nach Herstellerangaben präpariert. Zellkulturüberstände oder Serumproben wurden 1:1 mit 1% BSA in PBS verdünnt und zwei Stunden bei Raumtemperatur in den vorbereiteten Platten auf dem Orbitalmischer inkubiert. Die nachfolgenden Schritte wurden gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Inkubation mit Substrat erfolgte für 20-30 Minuten. Anschließend wurden die entwickelten Platten gescannt und durch lineare Regression in Excel ausgewertet.

#### 2.2.6.1.3. Paralleler Nachweis mehrerer Zytokine mittels Multiplex-ELISA

Der gleichzeitige Nachweis mehrerer Zytokine erfolgte unter Verwendung eines Flow-Cytomix-Kits (siehe 2.1.4). Hierzu wurden 25µL Zellkulturüberstand oder Mausserum nach Herstellerangaben mit den mitgelieferten Reagenzien behandelt, so dass die einzelnen Zytokine durch fluoreszenzmarkierte Antikörper nachweisbar waren. Die Fluoreszenzen wurden durchflusszytometrisch quantifiziert und mit der mitgelieferten Software analysiert.

#### 2.2.6.1.4. Nachweis Vakzinia-spezifischer Antikörper

Vakziniavirus-spezifische Antikörper in Serumproben von immunisierten Mäusen wurden durch ELISA nachgewiesen. MaxiSorp-Platten wurden mit  $1 \cdot 10^6$  PFU/well gradientengereinigtem MVA über Nacht bei 4°C beschichtet. Die Platten wurden vier Mal mit Waschpuffer für fünf Minuten auf dem Orbitalmischer gewaschen und anschließend 1h bei 37°C mit Blocking Puffer inkubiert. Nach viermaligem Waschen wurden die Serumverdünnungen in die Platte gegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde vier Mal gewaschen und alkalische Phosphatase gekoppelter anti-Maus IgG-Antikörper zugegeben. Die Inkubation erfolgte 30 Minuten bei 37°C. Die Platte wurde vier Mal gewaschen und pro Kammer 75µL pNpp-Substratlösung zugegeben. Die

---

Entwicklungsdauer betrug 20 Minuten bei 37°C. Die Farbreaktion wurde mit 50µL 0,5M Natronlauge gestoppt und die Absorption bei 405nm in einem ELISA-Reader bestimmt.

#### 2.2.6.2. Nachweis von bioaktivem, humanem Interleukin-1β durch Reporterassay

Bioaktives, humanes IL-1β wurde durch einen Reporterassay nachgewiesen. Hierzu wurde eine Reporterzelllinie verwendet, in der stabil ein Konstrukt integriert ist, das Teile des IL-1β-Promotors mit nachfolgendem Gen für die sekretierte embryonische alkalische Phosphatase (SEAP) enthält. Die produzierte Menge SEAP ist proportional zur Menge IL-1β in der getesteten Probe und kann mittels eines Substrates, das durch Phosphatase-Aktivität einen Farbumschlag erfährt, gemessen werden. HEK Blue IL-1β Sensor-Zellen wurden auf eine Zelldichte von  $3,3 \cdot 10^5$  Zellen/mL eingestellt und 150µL dieser Zellsuspension in eine Kammer einer 96er Zellkulturplatte gegeben. Es erfolgte die Zugabe von 50µL Überstand infizierter THP-1 Zellen, in dem IL-1β nachgewiesen werden sollte. Die Sensor-Zellen wurden zusammen mit dem Überstand über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden 50µL des Überstands der Sensor-Zellen in eine neue Kammer einer 96er Zellkulturplatte gegeben und mit 150µL SEAP-Substrat versetzt. Die Farbreaktion erfolgte bei 37°C im Brutschrank für 20 bis 60 Minuten. Die Zellkulturplatte wurde nach erfolgtem Farbumschlag auf Eis aufbewahrt, um die Reaktion zu stoppen. Die Absorption der Proben wurde bei 655nm in einem ELISA-Reader bestimmt.

#### 2.2.6.3. ELISPOT für Interferon-γ

Der ELISPOT für Interferon-γ wurde mit Hilfe eines Kits (siehe 2.1.4) durchgeführt. Die mitgelieferten ELISPOT-Platten wurden für zwei Minuten mit 70%-igem Ethanol aktiviert und anschließend fünf Mal mit sterilfiltriertem Wasser gewaschen. Der Primärantikörper wurde in sterilfiltriertem PBS verdünnt und über Nacht bei 4°C auf den Platten belassen. Es wurde fünf Mal mit filtriertem PBS gewaschen und anschließend wurden unspezifische Bindungen durch einstündige Inkubation mit Kulturmedium bei Raumtemperatur blockiert. Für die Zugabe der Zellsuspensionen wurde das Medium abgenommen. Zunächst wurden 75µL Zellsuspension zugegeben. Für Milzzellen (Präparation siehe 2.2.4.4) wurde eine Zellzahl von

---

1,5 bis  $3 \cdot 10^4$ /75 $\mu$ L, für Blutzellen (Präparation siehe 2.2.4.5) von 2,5 bis  $5 \cdot 10^4$ /75 $\mu$ L in PBMC-Medium verwendet. Zu den Zellen wurde 75 $\mu$ L B8- oder lacZ-Peptidverdünnung für eine Endkonzentration von 1 $\mu$ g/mL bzw. 75 $\mu$ L Ionomycin/PMA (Endkonzentration 25ng/mL bzw. 1 $\mu$ g/mL) als Positivkontrolle gegeben. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Proben wurden abgenommen und es erfolgte fünfmaliges Waschen mit filtriertem PBS. Der Sekundärantikörper wurde in PBS mit 0,5% FCS verdünnt und für zwei Stunden auf den Platten belassen. Nach nochmaligem Waschen wurde eine Stunde mit Streptavidin-konjugierter alkalischer Phosphatase inkubiert. Erneut wurde fünf Mal mit PBS gewaschen und anschließend NBT/BCIP-Substrat zugegeben. Dieses wurde auf den Platten belassen, bis eine deutliche Färbung sichtbar war (10-30 Minuten) und die Reaktion anschließend mit Leitungswasser gestoppt. Nach dem Trocknen wurden die Membranen der Platte auf eine Klebefolie transferiert, gescannt und die Spots mittels A-EL-VIS Software ausgezählt.

#### 2.2.6.4. Intrazelluläre Zytokinfärbung (ICS) für Interferon- $\gamma$

Für die intrazelluläre Zytokinfärbung von Interferon- $\gamma$  wurden Milz- bzw. Blutzellen aus immunisierten Mäusen (Präparation siehe 2.2.4.4 und 2.2.4.5) zunächst rekultiviert und restimuliert. Hierzu wurden  $1 \cdot 10^6$  Zellen/mL in Gegenwart von B8- oder lacZ-Peptid mit einer Endkonzentration von 1 $\mu$ g/mL bzw. 75 $\mu$ L Ionomycin/PMA (Endkonzentration 25ng/mL bzw. 1 $\mu$ g/mL) als Positivkontrolle für 2 Stunden in PBMC-Medium kultiviert. Dann erfolgte die Zugabe von 1/1000 Volumen Brefeldin A, welches die Sekretion von Proteinen über den Golgi-Apparat inhibiert. Die Anreicherung der Proteine erfolgte für 3 Stunden bei 37°C. Die Zellen wurden bei 1200rpm und 4°C für 5 Minuten pelletiert und ein Mal mit PBS gewaschen. Unspezifische Bindungen wurden durch Inkubation mit Maus F<sub>c</sub>-Block für 30 Minuten bei 4°C abgesättigt. Die Zellen wurden ein Mal mit PBS gewaschen und zunächst die Antikörper zur Färbung von Oberflächenproteinen zugegeben und 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Es erfolgte ein Waschschriff mit PBS und nachfolgend die Permeabilisierung der Zellen mittels Fix/Perm-Reagenz für 30 Minuten bei 4°C. Nach einmaligem Waschen mit Perm/Wash-Reagenz wurden dann die Antikörper für die Färbung intrazellulärer Proteine zugegeben und 30 Minuten bei 4°C auf den Zellen belassen. Die Zellen wurden ein Mal mit

Perm/Wash-Reagenz gewaschen und im nach dem Abgießen verbleibenden Puffer resuspendiert und bis zur Messung bei 4°C gelagert.

#### 2.2.6.5. B8-Pentamerfärbung

20µL Vollblut oder  $1 \cdot 10^6$  Milzzellen (Präparation siehe 2.2.4.4 und 2.2.4.5) in 20µL FACS-Puffer wurden mit 5µL B8-Pentamer versetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Färbung von Oberflächenproteinen. Hierzu wurden die entsprechenden Antikörper in einem Gesamtvolumen von 10µL FACS-Puffer verdünnt und zu den Pentamer-gefärbten Zellen gegeben. Die Färbung wurde für 30 Minuten bei 4°C durchgeführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1mL FACS Lysing Solution und eine Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 1200rpm und 4°C abzentrifugiert. Zu den gefärbten Proben wurde 1mL FACS-Puffer gegeben, um die Zellen zu waschen und 5 Minuten bei 1200rpm und 4°C zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden im nach dem Abgießen verbleibenden FACS-Puffer resuspendiert und bis zur Messung bei 4°C gelagert.

#### 2.2.7. Arbeiten im Tiermodell

##### 2.2.7.1. Narkotisierung und Töten von Mäusen

Die Narkose von Mäusen erfolgte mittels intraperitonealer Injektion von Ketamin/Xylazin. Die Zusammensetzung dieses Narkosemittels erfolgte gemäß FDA, so dass eine Endkonzentration von Ketamin 10mg/mL und Xylazin 0,4mg/mL in isotonischer Kochsalzlösung (0,9%) vorlag. Pro 10g Körpergewicht der Maus wurden 0,1mL Narkosemittel injiziert.

Zur Tötung von Mäusen erfolgte die Injektion von 1mL des Narkosegemisches und nach Eintreten der Narkose zusätzlich Entbluten am Herz mittels Omnican F-Spritze (B.Braun, Melsungen) oder Genickbruch.

### 2.2.7.2. Immunisierung von Mäusen

Die Immunisierung von Mäusen erfolgte mit einer Insulinspritze und 0,3 x 12mm Kanüle. Das zu verwendende Virus wurde in PBS auf die gewünschte Dosis verdünnt und anschließend injiziert. Für intravenöse Injektion wurden die Tiere etwa 10 Minuten mit Rotlicht bestrahlt, um einen Anstieg der Körpertemperatur und eine damit einhergehende Erweiterung der Schwanzvene zu erreichen. Dann wurde das Virus in 100µL Gesamtvolumen in die Schwanzvene appliziert. Für die intraperitoneale Injektion wurden 250µL Gesamtvolumen verwendet. Die Injektion erfolgte paralateral der *Linea alba* auf Höhe des Kniegelenkes in die Bauchhöhle.

### 2.2.7.3. Blutentnahme bei Mäusen

Die Entnahme von Blut erfolgte an der Schwanzvene. Hierzu wurden die Mäuse zunächst etwa 10 Minuten mit Rotlicht bestrahlt, um einen Anstieg der Körpertemperatur und eine damit einhergehende Erweiterung der Schwanzvene zu erreichen. Dann wurden die Mäuse in eine Broome-Halterung gesetzt, die die Manipulation des Schwanzes bei gleichzeitiger Fixierung des Maus erlaubte. Mit einem Skalpell (Klingenform Nr. 11) wurde die Schwanzvene angeritzt und das austretende Blut (maximal 100µL) mit einem mit einer Kapillare versehenen Blutentnahmeröhrchen aufgefangen.



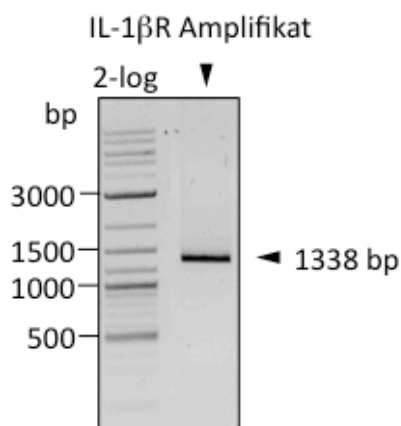
### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Konstruktion des Virus MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev

Für die Untersuchung des viralen, löslichen IL-1 $\beta$  Rezeptors von MVA lagen zu Beginn dieser Arbeit lediglich das wildtypische MVA und eine entsprechende Deletionsmutante des IL-1 $\beta$ R vor. Um die Validität der im Folgenden gezeigten Ergebnisse zu gewährleisten, war es notwendig, zusätzlich ein revertiertes Virus MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev herzustellen, bei welchem das deletierte Gen funktional wieder eingesetzt ist. Dies erfolgte, um beobachtete Effekte eindeutig auf die genetisch eingeführte Deletion zurückführen zu können. Die Herstellung des revertierten Virus wurde mittels homologer Rekombination durchgeführt, wofür zunächst das erforderliche Transferplasmid hergestellt wurde.

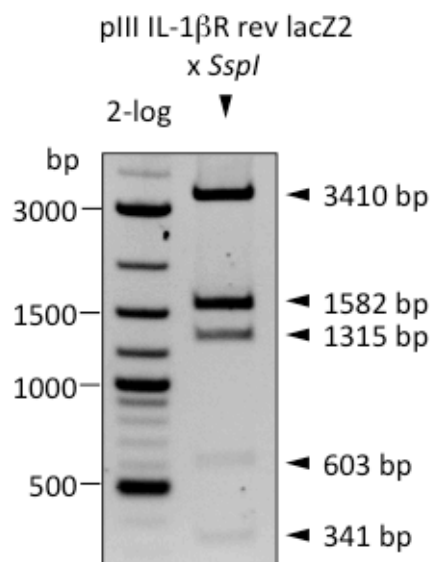
##### 3.1.1. Klonierung des Transferplasmids pIII IL-1 $\beta$ R rev lacZ2

Zuerst erfolgte die Amplifikation des IL-1 $\beta$ R-Gens (GenBank Accession-Nummer: AY603355) aus genomischer DNA von MVA. Genomische DNA wurde wie unter 2.2.2.2.1 beschrieben aus infizierten Zellen präpariert und in eine PCR, die mit einer *Proofreading*-Polymerase (siehe 2.2.2.7.2) durchgeführt wurde, eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte mit den Oligonukleotiden SZ020 und SZ021, so dass am 5'-Ende des Gens eine *Bam*HI-Restriktionssequenz und am 3'-Ende eine *Pst*I-Restriktionssequenz eingefügt wurde.



**Abbildung 6: Amplifikation des IL-1 $\beta$ R durch PCR.** Dargestellt ist die gelelektrophoretische Auftrennung eines Teils des PCR-Ansatzes. 2-log = 2-log Marker (NEB).

Die PCR ergab ein Fragment von der erwarteten Größe von 1338bp (Abbildung 6). Das PCR-Fragment wurde aus der Agarosegelmatrix wie unter 2.2.2.6 beschrieben extrahiert und mit *Bam*HI und *Pst*I verdaut (siehe 2.2.2.3). Gleichzeitig wurde der Zielvektor pIII lacZ2 A (siehe 7.1) ebenfalls restringiert. Die Restriktionsansätze wurden gemäß dem Verfahren wie unter 2.2.2.6 beschrieben aufgereinigt und das Zielplasmid dephosphoryliert und ligiert (siehe 2.2.2.9 und 2.2.2.10). Der Ligationsansatz wurde in *E.coli* TOP 10 transformiert (siehe 2.2.1.1) und das Plasmid amplifiziert und präpariert (siehe 2.2.1.2 und 2.2.2.1). Das Plasmid pIII IL-1 $\beta$ R rev lacZ2 (siehe 7.1) wurde durch Restriktion (siehe 2.2.2.3) mit dem Enzym *Ssp*I überprüft (Abbildung 7) und die Sequenz durch Sequenzierung (siehe 2.2.2.8) verifiziert.

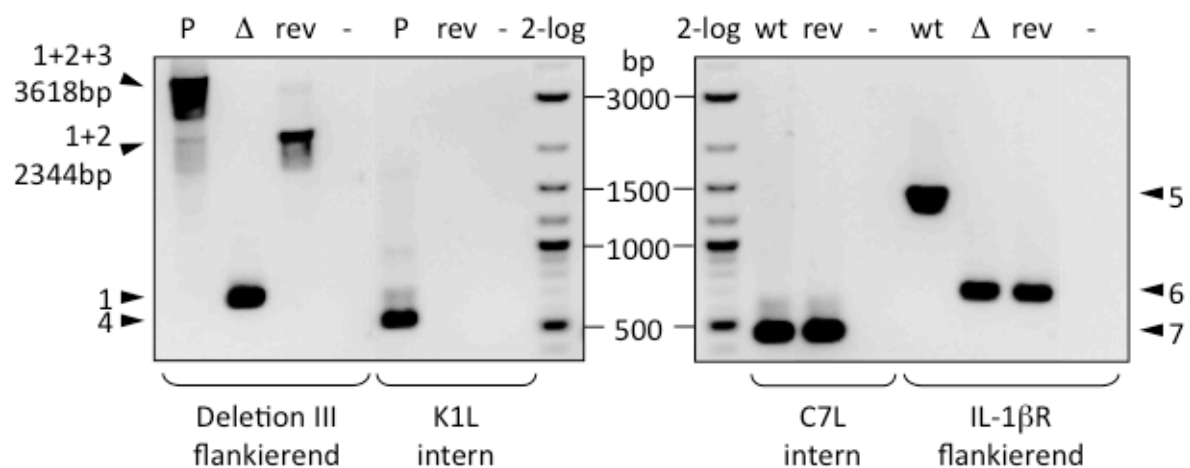


**Abbildung 7: Überprüfung des Plasmids pIII IL-1 $\beta$ R rev lacZ2 durch Restriktion mit *Ssp*I.** 1 $\mu$ g des Plasmids wurden eine Stunde bei 37°C mit dem Enzym *Ssp*I inkubiert und der gesamte Restriktionsansatz anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. 2-log = 2-log Marker (NEB).

### 3.1.2. Herstellung des Virus durch homologe Rekombination

Zur Herstellung des Virus MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev wurden CEF- und BHK21-Zellen mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R infiziert und mit dem Plasmid pIII IL-1 $\beta$ R rev lacZ2 transfiziert, um das IL-1 $\beta$ R-Gen in die Deletion III wieder einzusetzen. Laut PCR-Überprüfung mit den Deletion III-Oligonukleotiden HLPEI66 und HLPEI67 enthielten zwei der erhaltenen Klone kein Wildtyp-Virus mehr. Beide klonalen Isolate wurden für die CEF-Passagen zur K1L-Entfernung weiter verwendet. Die Infektion wurde gemäß 2.2.5.2.4 durchgeführt. Die erhaltenen Klone wurden jeweils durch PCR mit den Oligonukleotiden K1Lint1neu und K1Lint2neu auf das Vorhandensein von K1L

überprüft. Nach insgesamt 3 Passagen war kein K1L mehr nachweisbar. Das so erhaltene Virus wurde durch PCR charakterisiert. Die Überprüfung der Insertion in Deletion III erfolgte mit den Oligonukleotiden HLPEI66 und HLPEI67, der Test auf K1L mit K1Lint1neu und K1Lint2neu und die Überprüfung auf Wildtypverunreinigungen mit den flankierenden Oligonukleotiden SZ006 und SZ007 für den IL-1 $\beta$ R-Originalloкус. Zusätzlich wurde mit den Oligonukleotiden HLPEI82 und HLPEI83 das Gen C7L amplifiziert, um die genomische Stabilität zu beurteilen. C7L befindet sich im Bereich der terminalen Sequenzwiederholungen des MVA-Genoms und ist aufgrund dieser Lage anfälliger dafür, von genomischen Rearrangements im Laufe der Viruspassagierung betroffen zu sein.



Zu erwartende Teilgrößen der PCR-Fragmente:

- |                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| 1: Deletion III-Amplifikat, 732bp | 5: Locus IL-1 $\beta$ R im wt-Genom, 1389bp                             |
| 2: IL-1 $\beta$ R-Insert, 1612bp  | 6: Locus IL-1 $\beta$ R $\Delta$ MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R, ca. 408bp |
| 3: K1L-Gen, 1274bp                | 7: C7L-Gen, 446bp   |
| 4: K1L-Gen, 557bp                 |   |

**Abbildung 8: Qualitative Überprüfung von MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev mittels PCR.** DNA wurde aus infizierten Zellen der 3. Amplifikation isoliert und durch PCR überprüft. P = pIII IL-1 $\beta$ R rev lacZ2, wt = MVAII<sub>new</sub>,  $\Delta$  = MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R, rev = MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev, - = Negativkontrolle (Wasser), 2-log = 2-log Marker (NEB).

Abbildung 8 zeigt das Ergebnis der PCR. Die Überprüfung der Deletion III von MVA  $\Delta$ IL1 $\beta$ R rev lieferte das korrekte Fragment von 2344bp. Die Größe ergibt sich aus den Sequenzen der Deletion III-Flanken mit inseriertem IL-1 $\beta$ R-Gen und einer lacZ-Restsequenz (vgl. Abbildung 5); das K1L-Gen ist nicht vorhanden. Folglich lieferte die K1L-PCR kein Produkt. Die PCR über den IL-1 $\beta$ R-Originalloкус zeigte, dass dieser mit einer Fragmentgröße von ca. 408bp erwartungsgemäß kleiner als das entsprechende Fragment in MVA war. Das C7L-Fragment

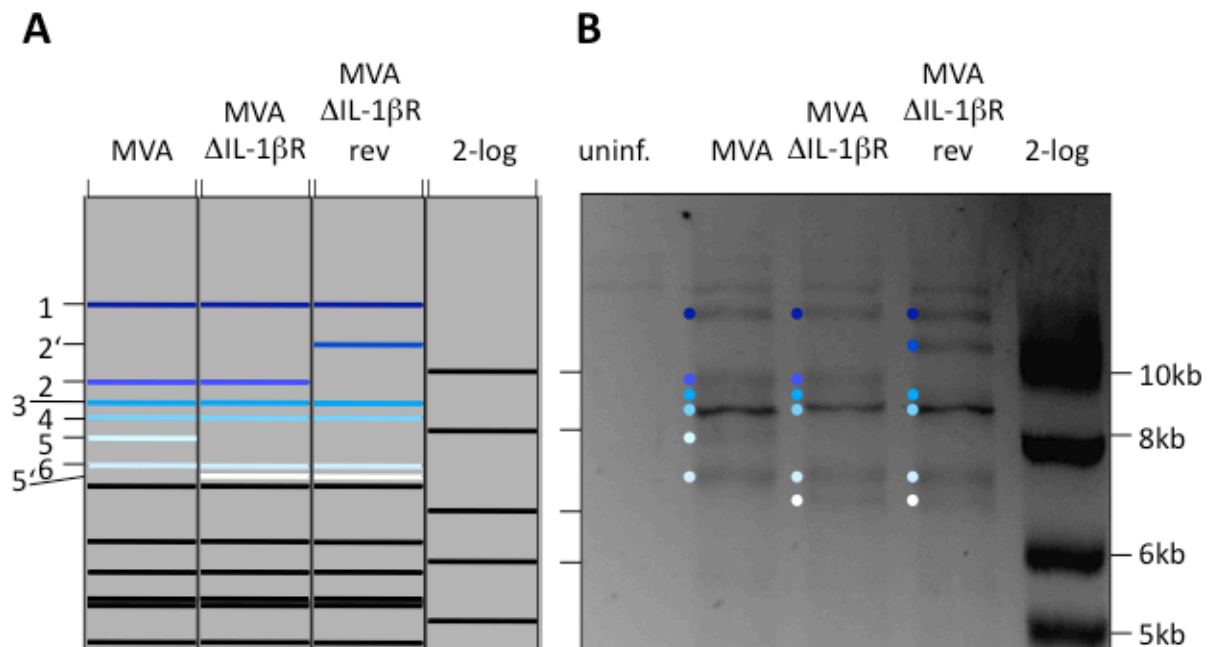
von 446bp konnte erfolgreich amplifiziert werden, so dass eine Instabilität des viralen Genoms ausgeschlossen werden konnte.

### 3.2. Viruscharakterisierung

Die in dieser Arbeit verwendeten Viren wurden weiterhin genomisch, auf Proteinebene und funktional charakterisiert. Zunächst erfolgte die genomische Überprüfung durch Restriktionsanalyse.

#### 3.2.1. Restriktionskartierung

Genomische DNA wurde aus mit MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R oder MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev infizierten CEF-Zellen gemäß 2.2.2.4 isoliert. Je 10 $\mu$ g genomische DNA wurden mit *EcoRI* verdaut und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Abbildung 9 zeigt das Ergebnis der elektrophoretischen Analyse.

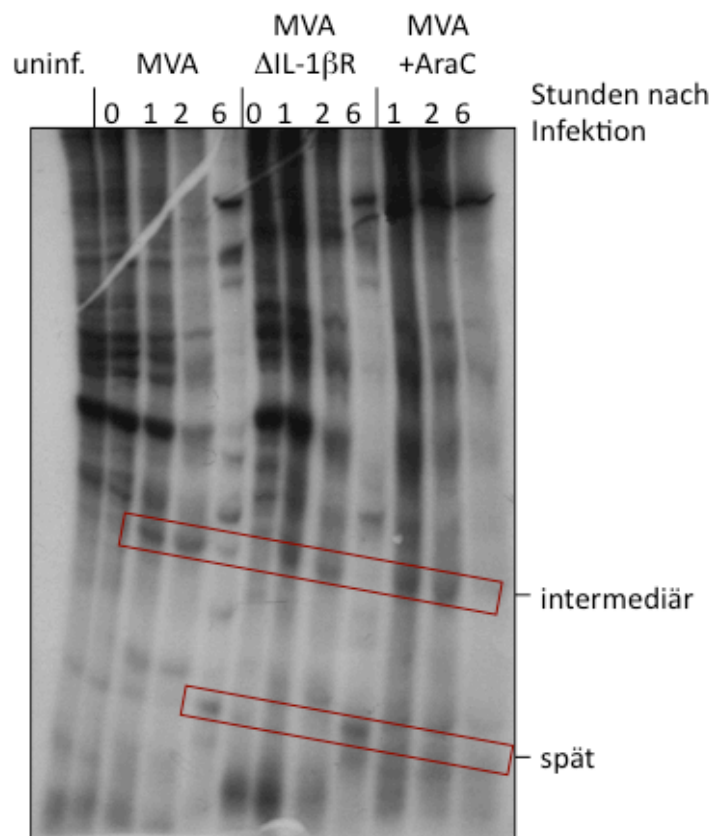


**Abbildung 9: Gelelektrophoretische Auftrennung des Restriktionsverdaus viraler, genomischer DNA mit *EcoRI*.** (A) Erwartete Bandenmuster nach virtuellem Verdau der DNA im Programm Vector NTI. (B) Experimentelle Auftrennung der Restriktionsansätze auf einem Agarosegel. Zuordnung der Fragmente siehe Text. 2-log = 2-log Marker (NEB).

Zunächst wurde die Restriktion mit dem Programm Vector NTI simuliert, um die Zuordnung der Banden zu erleichtern. Die Banden wurden nach absteigender Größe nummeriert und Fragmente, deren Größe sich durch die Viruskonstruktion änderte, mit der gleichen Zahl und nachfolgendem Apostroph gekennzeichnet (Abbildung 9 A). Das experimentelle Ergebnis entsprach im Wesentlichen der Simulation (Abbildung 9 B). Oberhalb des *EcoRI*-Fragmentes 1 traten zwei zusätzliche Banden auf, die nicht berücksichtigt wurden, da es sich anhand des Vergleiches mit der unifizierten Probe um zelluläre DNA handeln musste. Durch die Deletion des IL-1 $\beta$ R-Gens bei MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R, entfiel genomisches Material aus dem *EcoRI*-Fragment 5, was zu einer Reduktion in dessen Größe führte (*EcoRI*-Fragment 5'). Des Weiteren nahm die Größe des *EcoRI*-Fragments 2 durch die Reinsertion des IL-1 $\beta$ R-Gens in die Deletion III im Rahmen der Konstruktion von MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev wie erwartet zu (*EcoRI*-Fragment 2'). Zusammenfassend ergab die Restriktionskartierung das erwartete Bild intakter viraler, genomischer DNA, mit der Einschränkung, dass kleinere genomische Defekte oder Mutationen mit dieser Methode nicht detektiert werden können.

### 3.2.2. <sup>35</sup>S-Markierung viraler Proteine zur Analyse der viralen Proteinsynthese

Die Charakterisierung des viralen Lebenszyklus der verwendeten Viren auf Proteinebene erfolgte durch <sup>35</sup>S-Markierung neu synthetisierter Proteine zu verschiedenen Zeitpunkten. CEF-Zellen wurden wie unter 2.2.5.6 beschrieben mit MVA und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R bzw. MVA in Gegenwart von 40 $\mu$ g/mL AraC infiziert. Nach erfolgter Inkubation mit dem radioaktiv markierten Cystein/Methionin-Mix, wurden Zelllysate nach 0, 1, 2 und 6 Stunden hergestellt und die enthaltenen Proteine gemäß 2.2.5.6 elektrophoretisch aufgetrennt. Die Belichtung des Röntgenfilms mit dem Gel bei -80°C über Nacht ergab das in Abbildung 10 dargestellte Resultat.

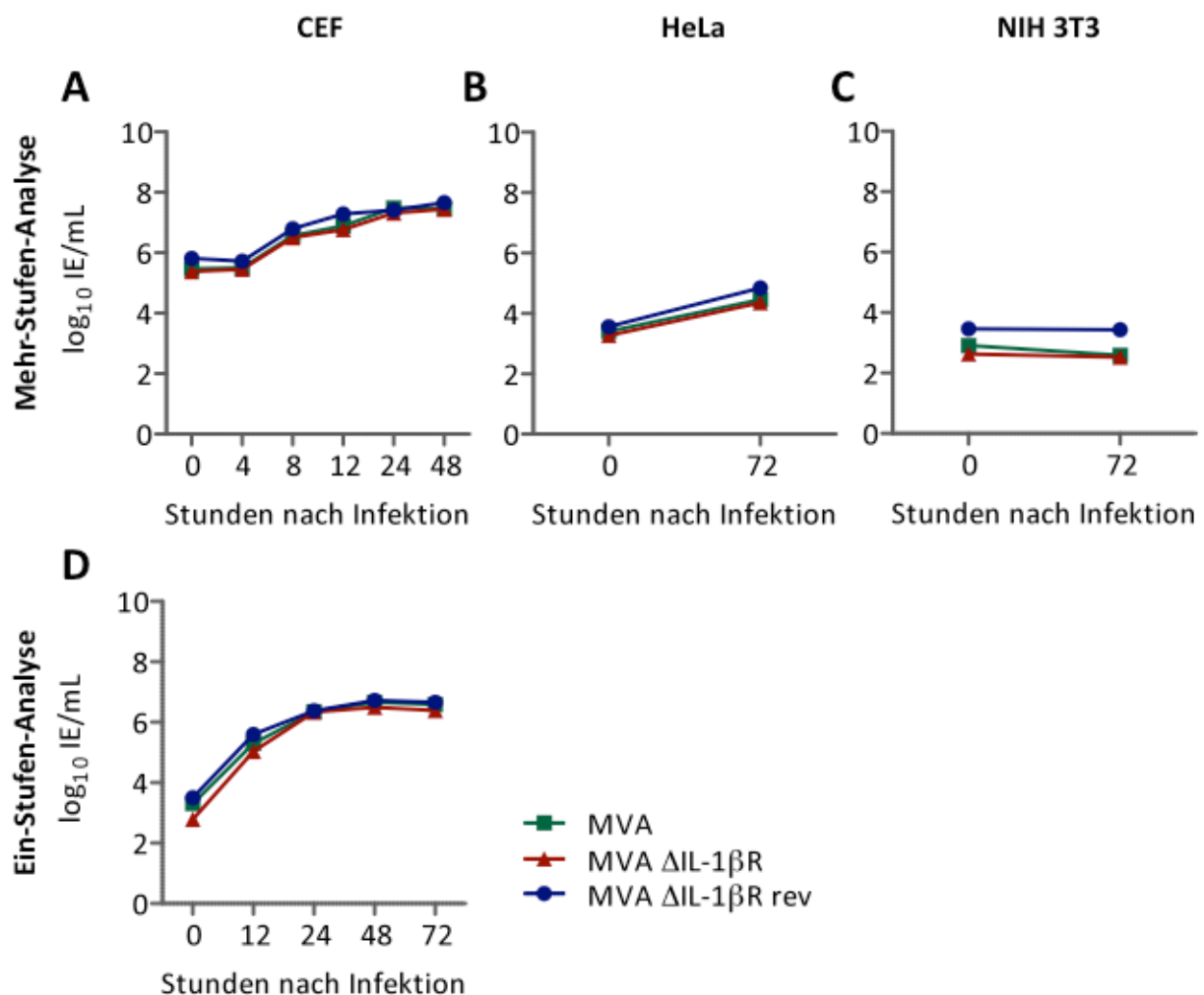


**Abbildung 10: Virale Proteinexpression nach Infektion von CEF-Zellen mit MVA und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R bzw. MVA in Gegenwart von AraC.** CEF-Zellen wurden mit einer moi von 10 mit dem jeweiligen Virus infiziert und 30 Minuten nach Zugabe von  $^{35}$ S-Cystein/Methionin zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Die enthaltenen Proteine wurden elektrophoretisch getrennt und das Bandenmuster auf einem Röntgenfilm festgehalten. Intermediäre und späte Genprodukte sind durch rote Umrandung gekennzeichnet. uninf. = uninfiziert.

In allen Proben ist deutlich zu sehen, dass aufgrund der viralen Infektion bereits nach 6 Stunden wie erwartet die Proteinsynthese der Wirtszelle fast vollständig eingestellt wurde (Sutter und Moss, 1992). Des Weiteren sind die Bandenmuster für MVA und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R, so weit erkennbar, identisch. Das IL-1 $\beta$ R-Protein ist vermutlich auf Grund seiner schwachen Expression bzw. der Tatsache, dass es sich um ein sekretiertes Protein handelt, nicht zu erkennen. Deutlich sichtbar sind Proteine, die nach einer Stunde erscheinen und bei 6 Stunden bereits nicht mehr vorhanden sind. Hierbei handelt es sich um intermediäre Proteine (Abbildung 10, oberer Kasten). Hingegen sind auch Proteine zu erkennen, die erst nach 6 Stunden erscheinen (Abbildung 10, unterer Kasten), jedoch nicht in Gegenwart von AraC, einem Inhibitor der späten Genexpression. Solche Banden repräsentieren späte, virale Proteine. Insgesamt zeigte die Analyse, dass das Virus MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R keine Unterschiede zum Wildtyp-Virus in der Proteinsynthese aufweist und dass auch der virale Lebenszyklus von der Deletion des IL-1 $\beta$ R-Gens nicht beeinflusst wird.

3.2.3. Wachstumsanalyse

Um die Replikation der verwendeten Viren zu charakterisieren, wurde eine Wachstumsanalyse in verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Für die Wachstumsanalyse wurden CEF-Zellen wie unter 2.2.5.5.1 und 2.2.5.5.2 beschrieben mit MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R oder MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev infiziert, zu verschiedenen Zeitpunkten abgeschabt und die erhaltenen virushaltigen Proben wie unter 2.2.5.4 dargestellt zurücktitriert. Darüber hinaus erfolgte die Mehr-Stufen-Analyse auch in HeLa und NIH 3T3-Zellen, um sicherzustellen, dass die Replikationsinkompetenz des Wildtypvirus auch in den modifizierten Viren erhalten geblieben war.



**Abbildung 11: Ein- und Mehr-Stufen-Wachstumsanalyse von MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev. (A,D) CEF, (B) HeLa, (C) NIH 3T3. Die Zellen wurden für die Mehr-Stufen-Analyse mit der moi 0,5, für die Ein-Stufen-Analyse mit der moi 10 infiziert. Nach definierten Zeitpunkten wurden die infizierten Zellen und das Kulturmedium gesammelt und auf CEF-Zellen zurücktitriert. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.**

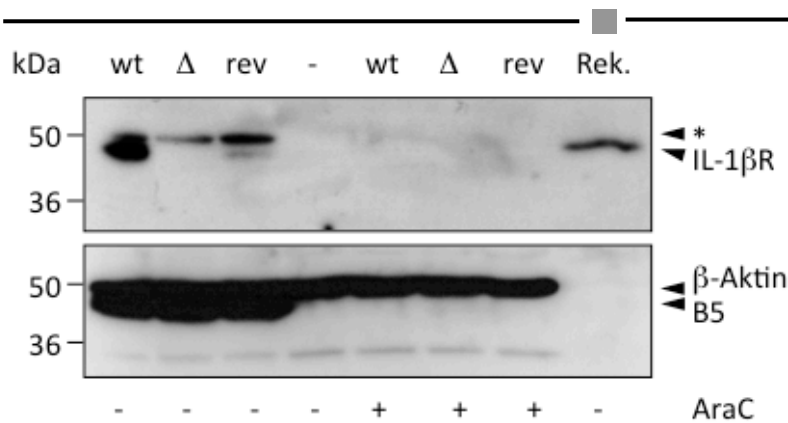
---

Die Mehr-Stufen-Wachstumsanalyse zeigte, dass alle analysierten Viren in der Lage waren, durch Replikation auf CEF-Zellen eine Steigerung des Virustiters gegenüber der eingesetzten Virusmenge um 2-3 Zehnerpotenzen zu erreichen (Abbildung 11 A). Im Gegensatz hierzu erfolgte auf NIH 3T3-Zellen keine Replikation (Abbildung 11 C) und auf HeLa-Zellen lediglich eine sehr geringe Zunahme des Virustiters (Abbildung 11 B). Ein geringer Grad an Replikation wurde bereits in der Literatur beschrieben (Carroll und Moss, 1997; Wyatt *et al.*, 1998). Auch die Virusausbeute pro infizierter Zelle, die mittels Infektion von CEF-Zellen mit einer moi von 10 ermittelt wurde, zeigte keine Auffälligkeiten (Abbildung 11 D). Alle getesteten Viren erreichten eine Steigerung des Virustiters um etwa 4 Zehnerpotenzen. Somit trug die Wachstumsanalyse dazu bei nachzuweisen, dass alle in dieser Arbeit verwendeten Viren identische Wachstumscharakteristika mit Wildtyp-MVA besitzen und dass darüber hinaus die Sicherheit der Viren erhalten geblieben ist.

#### 3.2.4. Nachweis der Expression des MVA IL-1 $\beta$ -Rezeptors mittels eines spezifischen Antikörpers

Da mit den bisherigen Analysen das Vorhandensein des IL-1 $\beta$ R in den einzelnen Viren lediglich indirekt analysiert wurde, erfolgte zusätzlich der Nachweis mit einem spezifischen Antikörper. Für die Analyse der Expression des IL-1 $\beta$ R auf Proteinebene erfolgte die Infektion von CEF-Zellen mit MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev bei einer moi von 10. Als Kontrolle wurde zusätzlich ein Probensatz mit AraC behandelt, das die Expression des spät exprimierten IL-1 $\beta$ R unterdrücken sollte. Nach der Virusadsorption, erfolgte ein Mediumwechsel wie unter 2.2.5.1 beschrieben. Zusätzlich wurde 1/1000 Volumen Brefeldin A zugegeben, um die Sekretion des Proteins zu inhibieren und es damit intrazellulär anzureichern. Nach 16h bei 37°C wurden Proteinlysate wie unter 2.2.3.1 angegeben mit RIPA-Puffer hergestellt. Die enthaltenen Proteine wurden elektrophoretisch getrennt und auf eine Membran transferiert (vgl. 2.2.3.4 und 2.2.3.6.2). Die Detektion des IL-1 $\beta$ R erfolgte mit dem anti-MVA IL-1 $\beta$  Rezeptor-Antikörper unter Verwendung der Lumineszenzdetektion (siehe 2.2.3.7.2).





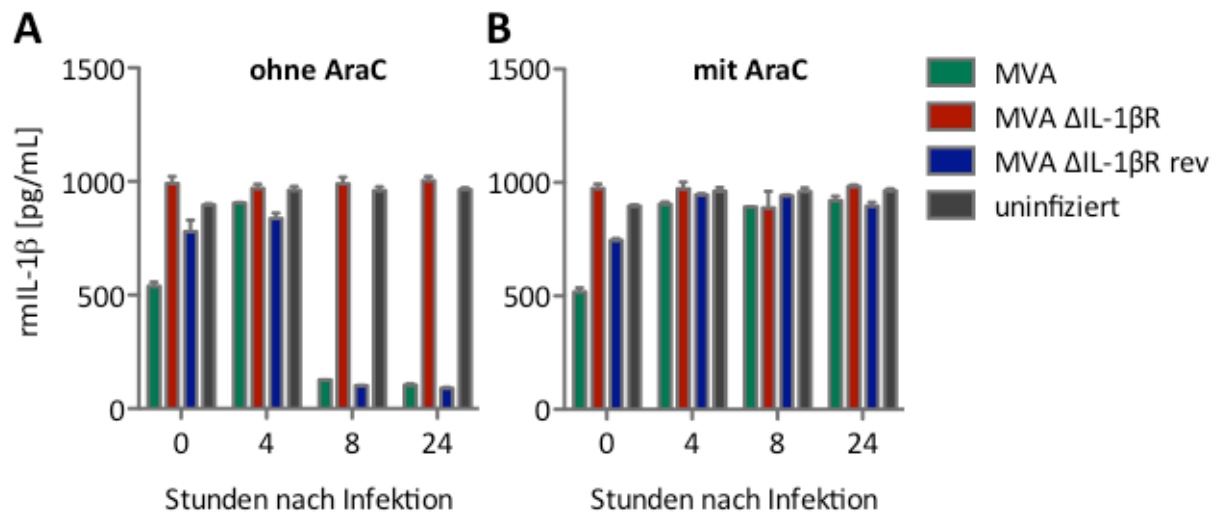
**Abbildung 12: Analyse der Expression des IL-1βR in MVA, MVA ΔIL-1βR und MVA ΔIL-1βR rev nach Infektion von CEF-Zellen.** CEF-Zellen wurden mit einer moi von 10 infiziert und in Gegenwart von Brefeldin A 16 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und die Lysate elektrophoretisch getrennt. Nach dem Membrantransfer der Proteine aus dem Gel erfolgte die Inkubation mit dem IL-1βR-spezifischen Antikörper und die Detektion. wt = MVA<sub>IL-1βR</sub>, Δ = MVA ΔIL-1βR, rev = MVA ΔIL-1βR rev, - = uninferiert, Rek. = rekombinanter IL-1βR aus Insektenzellen, \* = unspezifische Bindung an virales Protein.

In Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Daten zum VACV IL-1βR-Protein (Alcami und Smith, 1992) betrug das Molekulargewicht des detektierten Proteins in MVA und MVA ΔIL-1βR rev, sowie bei rekombinatem IL-1βR aus Insektenzellen etwa 50kDa (Abbildung 12). Eine darüber hinaus beschriebene, intrazelluläre Vorstufe mit 47kDa konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. In Anwesenheit von AraC war die Expression des IL-1βR-Proteins vollständig unterdrückt. Zwischen dem MVA-Wildtyp und der Revertante bestand ein deutlicher Unterschied in der Expressionsstärke, dennoch legten die Kontrollen β-Aktin (für die Menge zellulären Proteins) und B5 (für die Menge viralen Proteins) die Auftragung ähnlicher Proteinmenge nahe. Möglicherweise ist die Expression des Rezeptors tatsächlich in der Revertante etwas geringer, weshalb im folgenden Experiment besonderes Augenmerk auf mögliche Unterschiede in der Bioaktivität der einzelnen Proben gelegt wurde.

### 3.2.5. Nachweis der Expression und Funktionalität des MVA IL-1β-Rezeptors in murinen und humanen Zellen

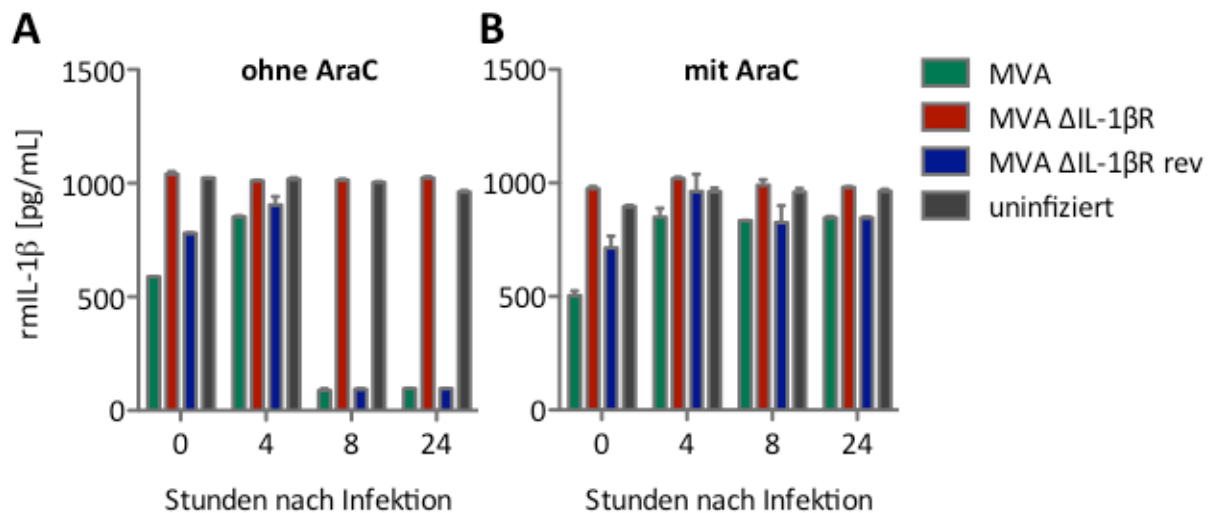
Der Nachweis der Expression und Funktion des MVA IL-1β-Rezeptors erfolgte mittels Zellkulturüberständen von infizierten Zellen. Hierzu wurden NIH 3T3 und HaCat-Zellen mit einer moi von 5 infiziert und nach 0, 4, 8 und 24 Stunden die Überstände abgenommen. Zu den Überständen wurde zwecks Untersuchung auf vorhandene Bindungsaktivität des viralen Rezeptors rekombinantes, murines IL-1β (rmIL-1β) in einer Konzentration von 1000pg/mL

gegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wurden die Proben mit einem ELISA für rIL-1 $\beta$  analysiert. Diese Vorgehensweise machte sich die Konkurrenz eines oder beider ELISA-Antikörper mit dem viralen Rezeptor um Bindungsstellen am Zytokin zu Nutze, so dass in Anwesenheit des viralen Proteins kein IL-1 $\beta$  mehr im ELISA detektiert werden konnte. Das Experiment wurde mit und ohne Anwesenheit von AraC als Kontrolle durchgeführt.



**Abbildung 13: Expression und Bindungsaktivität des MVA IL-1 $\beta$ R nach Infektion von NIH 3T3-Zellen.** (A) Expression in infizierten, unbehandelten Zellen. (B) Expression nach zusätzlicher Zugabe von AraC. NIH 3T3-Zellen wurden mit einer moi von 5 infiziert und die Überstände nach verschiedenen Zeitpunkten abgenommen und mit rIL-1 $\beta$  versetzt. Vorhandene Bindungsaktivität wurde durch ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

In NIH 3T3 Zellen zeigten nicht mit AraC behandelte Proben 0 und 4 Stunden nach Infektion das Vorhandensein von freiem rIL-1 $\beta$ ; d.h. es lag keine Bindungsaktivität für IL-1 $\beta$  vor (Abbildung 13 A). Nach 8 und 24 Stunden konnte hingegen in Übereinstimmung mit der späten Expression des IL-1 $\beta$ R, nach Zugabe der Überstände aus MVA und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev infizierten Zellen kein rIL-1 $\beta$  mehr detektiert werden. Im Gegensatz dazu, war rIL-1 $\beta$  weiterhin in dem Ansatz mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R nachweisbar, was das Fehlen des viralen Rezeptors bestätigte. In mit AraC behandelten Proben (Abbildung 13 B) war wie erwartet zu keinem Zeitpunkt Bindungsaktivität nachweisbar. Ein sehr ähnliches Ergebnis lieferte die Analyse in HaCat Zellen.



**Abbildung 14: Expression und Bindungsaktivität des MVA IL-1βR nach Infektion von HaCat-Zellen.** (A) Expression in infizierten, unbehandelten Zellen. (B) Expression nach zusätzlicher Zugabe von AraC. HaCat-Zellen wurden mit einer  $moi$  von 5 infiziert und die Überstände nach verschiedenen Zeitpunkten abgenommen und mit rmIL-1β versetzt. Vorhandene Bindungsaktivität wurde durch ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

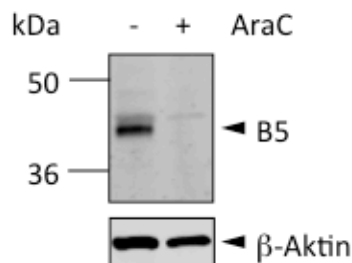
Ohne AraC zeigten MVA und MVA  $\Delta$ IL-1βR rev infizierte Zellen Bindungsaktivität nach 8 und 24 Stunden (Abbildung 14 A), während mit AraC keine Bindungsaktivität detektierbar war (Abbildung 14 B). Trotz unterschiedlicher Expressionsstärke des IL-1βR in MVA und MVA  $\Delta$ IL-1βR rev waren bezüglich der Bindungsaktivität also keine Unterschiede ersichtlich. Zudem konnte das Fehlen der Bindungsaktivität für IL-1β in MVA  $\Delta$ IL-1βR eindeutig nachgewiesen werden.

### 3.3. Einfluss des viralen IL-1β-Rezeptors auf die Induktion und Sekretion von IL-1β in murinen Zellen *in vitro*

Der Einfluss des viralen IL-1β-Rezeptors auf die Fähigkeit muriner, Antigen-präsentierender und phagozytischer Zellen IL-1β zu sekretieren, wurde in myeloiden dendritischen Zellen (engl. *myeloid dendritic cells*, mDC) und knochenmarksabgeleiteten Makrophagen (engl. *bone marrow derived macrophages*, BMDM) untersucht. Zunächst wurde allerdings anhand von mDC analysiert, ob der virale Lebenszyklus in murinen Zellen hämatopoetischen Ursprungs vollständig durchlaufen wird und späte Proteine synthetisiert werden können.

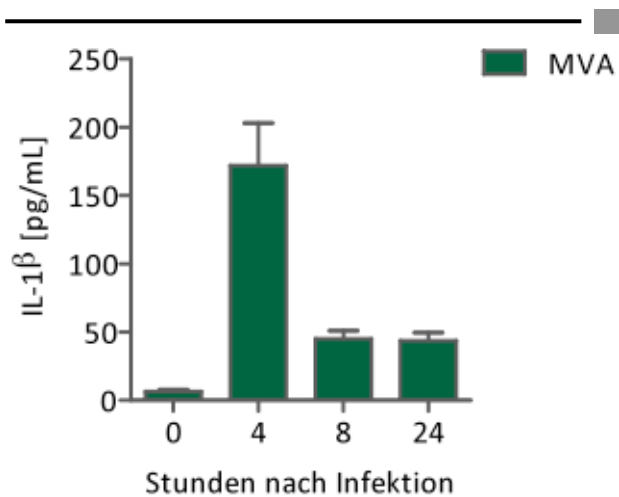
### 3.3.1. Induktion von IL-1 $\beta$ und Rolle des IL-1 $\beta$ R in knochenmarksabgeleiteten myeloiden dendritischen Zellen

Die Analyse der viralen Genexpression in mDC erfolgte durch Infektion und anschließendem Nachweis des späten Proteins B5 im Zellysat. Hierzu wurden mDC mit MVA entsprechend einer moi von 5 infiziert, 24 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend wie unter 2.2.3.1 beschrieben mit 1-fach SDS-Lysispuffer Proteinlysate hergestellt. Diese wurden elektrophoretisch aufgetrennt (vgl. 2.2.3.3), auf eine Membran übertragen (vgl. 2.2.3.6.2) und durch Fluoreszenzdetektion analysiert (vgl. 2.2.3.7.1).



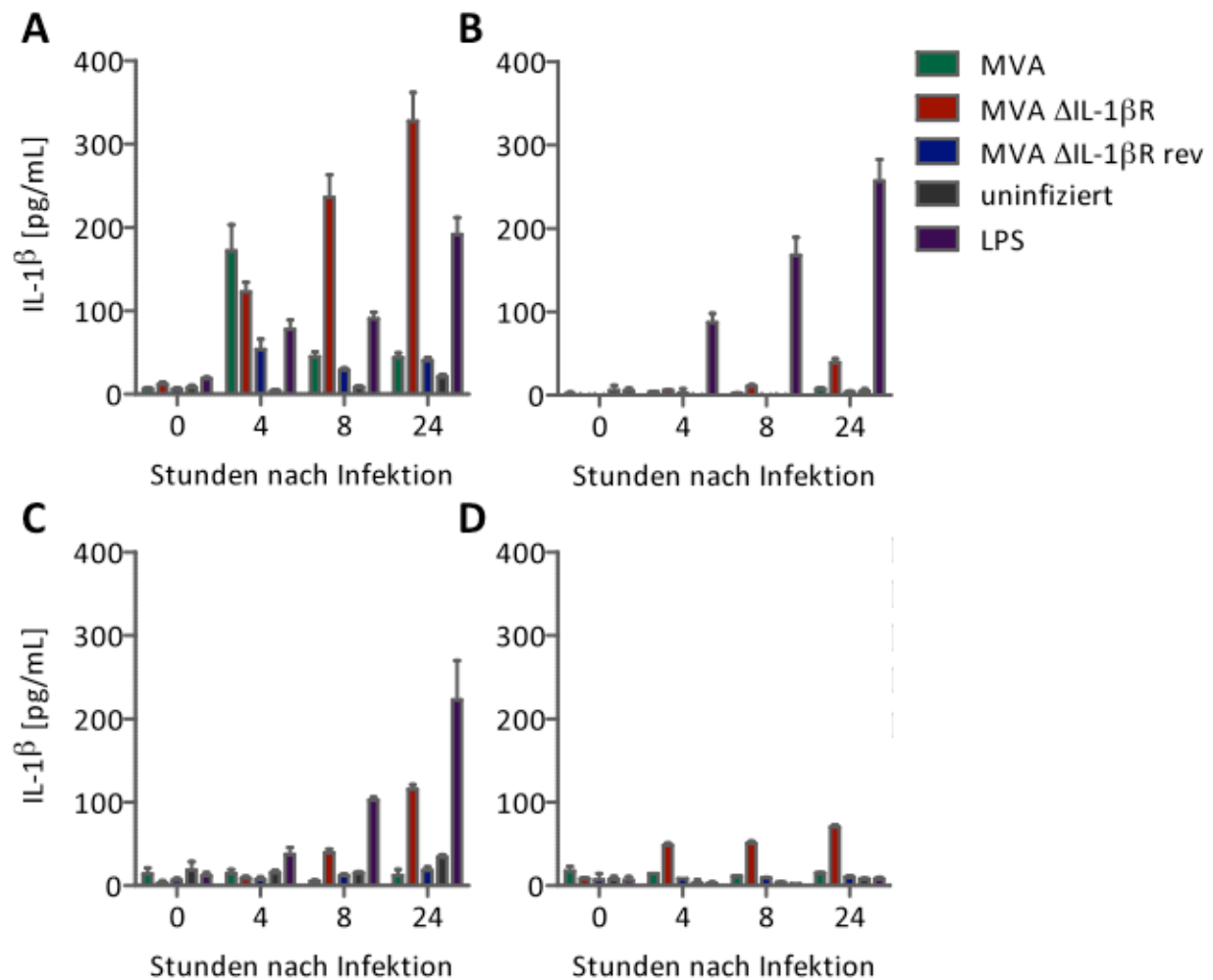
**Abbildung 15: Überprüfung der viralen Proteinexpression in mDC nach Infektion mit MVA.** Mit GM-CSF aus Knochenmark differenzierte mDC (mit und ohne AraC-Behandlung) wurden für 24 Stunden mit MVA (moi = 5) infiziert, lysiert und die Proteine durch Elektrophorese und Transfer auf eine Membran analysiert. Die Detektion von B5 erfolgte mit einem spezifischen Antiserum. Als Kontrolle der Proteinmenge diente der Nachweis von  $\beta$ -Aktin.

In Zellen ohne AraC-Behandlung war das B5-Protein deutlich nachweisbar (Abbildung 15), so dass von einem vollständigen viralen Lebenszyklus in murinen Zellen hämatopoetischen Ursprungs ausgegangen werden konnte. In zur Kontrolle mit AraC behandelten mDC konnte dagegen erwartungsgemäß kein B5-Protein detektiert werden. Nachdem die späte Genexpression in mDC nachgewiesen war und damit von der Expression des IL-1 $\beta$ R ausgegangen werden konnte, wurde zunächst analysiert, ob MVA in der Lage ist, IL-1 $\beta$ -Sekretion zu induzieren. Zu diesem Zweck wurden mDC mit MVA entsprechend einer moi von 5 infiziert und nach 0, 4, 8 und 24 Stunden die Zellkulturüberstände abgenommen und mittels ELISA auf das Vorhandensein von IL-1 $\beta$  analysiert. Wie Abbildung 16 zeigt, erfolgte tatsächlich nach Infektion mit MVA eine Sekretion von IL-1 $\beta$ .



**Abbildung 16: Induktion von IL-1β nach Infektion von murinen mDC mit MVA.** Mit GM-CSF aus Knochenmark differenzierte mDC wurden mit MVA (moi = 5) infiziert und nach verschiedenen Zeitpunkten der IL-1β-Gehalt im Kulturüberstand durch ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert ± SEM aus zwei unabhängigen Experimenten.

Bereits vier Stunden nach Infektion war eine starke Sekretion des Zytokins zu beobachten, die allerdings bereits nach acht Stunden wieder um das Vierfache zurückging. Vermutlich war dieser Rückgang auf die einsetzende Expression des IL-1βR zurückzuführen. Um die Rolle des IL-1βR auf die Induktion endogenen IL-1βs zu untersuchen und auch Erkenntnisse über die Beteiligung des IL-1β-Signalweges zu erlangen, wurden Experimente in mDC, abgeleitet aus verschiedenen Mausstämmen mit Defekten in der IL-1β-Signaltransduktion, durchgeführt. *In vitro* differenzierte mDC aus B6, MyD88<sup>-/-</sup>, MyD88<sup>-/-</sup>Trif<sup>-/-</sup> und Casp-1<sup>-/-</sup> *knockout*-Mäusen wurden mit MVA, MVA ΔIL-1βR und MVA ΔIL-1βR rev mit einer moi von 5 infiziert und nach 0, 4, 8 und 24 Stunden der IL-1β Gehalt im Überstand bestimmt.



**Abbildung 17: IL-1 $\beta$ -Konzentration nach Infektion von murinen mDC mit MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev.** Mit GM-CSF aus Knochenmark differenzierte mDC aus (A) B6, (B) MyD88<sup>-/-</sup>, (C) Casp-1<sup>-/-</sup> und (D) MyD88<sup>-/-</sup>TRIF<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden mit MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev (moi = 5) infiziert und nach verschiedenen Zeitpunkten der IL-1 $\beta$ -Gehalt im Kulturüberstand durch ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM aus zwei unabhängigen Experimenten. Als Positivkontrolle diente die Stimulation mit 1 $\mu$ g/mL LPS.

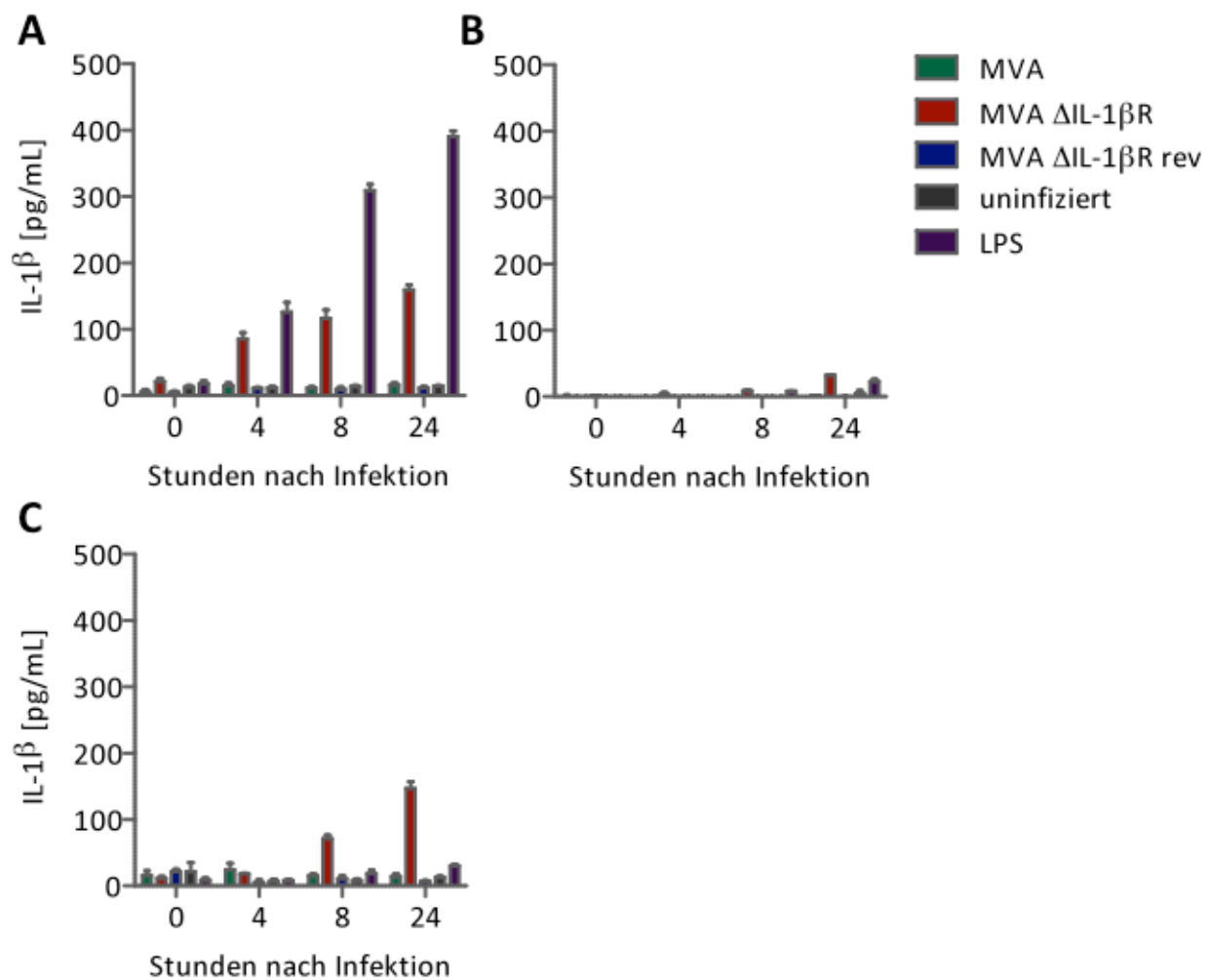
In mDC, die sich von B6-Mäusen ableiteten, wurde, wie bereits in Abbildung 16 beobachtet, 4 Stunden nach Infektion eine Induktion von IL-1 $\beta$  durch MVA festgestellt (Abbildung 17 A). Eine Induktion war nach vier Stunden ebenfalls, wenn auch in etwas geringerem Maße in MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev infizierten Zellen zu beobachten. Hingegen war nach acht Stunden die sekretierte Menge IL-1 $\beta$  in MVA und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev infizierten Zellen bereits wieder stark abgesunken, während in MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R infizierten Zellen die IL-1 $\beta$ -Konzentration weiter anstieg. Nach 24 Stunden änderte sich die IL-1 $\beta$ -Menge für MVA und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev nicht mehr. Für MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R erreichte sie bis zu 350pg/mL. Das zeigt, dass nach viraler Infektion eine stetig ansteigende IL-1 $\beta$ -Sekretion induziert wird. Erst durch die Expression des viralen IL-1 $\beta$ R wird IL-1 $\beta$  ab ca. 8 Stunden nach Infektion abgefangen. In

---

mDC, die sich von MyD88<sup>-/-</sup> ableiteten, konnte bei keinem der Viren eine Induktion von IL-1 $\beta$  durch die virale Infektion beobachtet werden (Abbildung 17 B). Lediglich die Positivkontrolle führte zu einer Sekretion. Dies galt auch für aus Casp-1<sup>-/-</sup>-Mäusen stammende mDC (Abbildung 17 C), wobei hier auch die Infektion mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R zur Sekretion geringer Mengen IL-1 $\beta$  in der Größenordnung von bis zu 120pg/mL führte. In mDC aus MyD88<sup>-/-</sup>Trif<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde schließlich nur bei MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R infizierten Zellen eine geringe Sekretion von maximal 80pg/mL IL-1 $\beta$  gemessen (Abbildung 17 D).

### 3.3.2. Induktion von IL-1 $\beta$ und Rolle des IL-1 $\beta$ R in knochenmarksabgeleiteten Makrophagen

Obige Analyse wurde für phagozytische Zellen wiederholt. BMDM aus B6, MyD88<sup>-/-</sup>Trif<sup>-/-</sup> und Casp-1<sup>-/-</sup> *knockout*-Mäusen wurden mit MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev mit einer moi von 5 infiziert und nach 0, 4, 8 und 24 Stunden der IL-1 $\beta$  Gehalt im Überstand bestimmt.



**Abbildung 18: Induktion von IL-1 $\beta$  nach Infektion von murinen BMDM mit MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev.** Mit M-CSF aus Knochenmark differenzierte BMDM aus (A) B6, (B) MyD88<sup>-/-</sup>TRIF<sup>-/-</sup> und (C) Casp-1<sup>-/-</sup> Mäusen wurden mit MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev (moi = 5) infiziert und nach verschiedenen Zeitpunkten der IL-1 $\beta$ -Gehalt im Kulturüberstand durch ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM aus zwei unabhängigen Experimenten. Als Positivkontrolle diente die Stimulation mit 1 $\mu$ g/mL LPS.

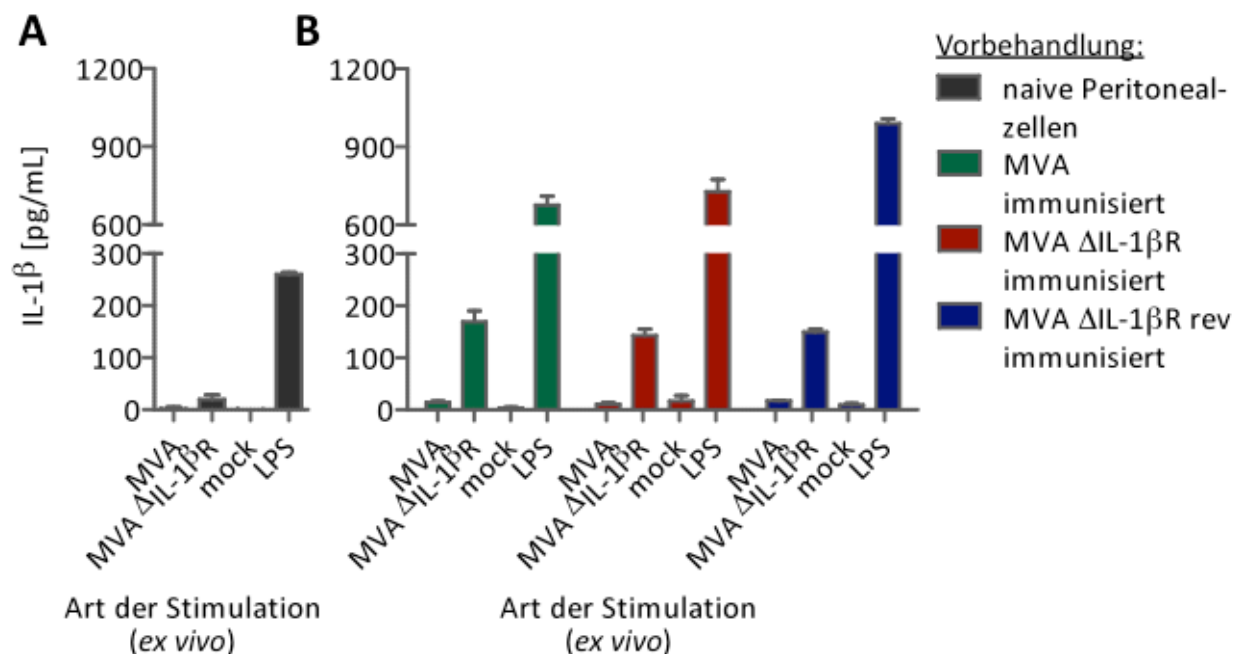
Nach Infektion von BMDM aus B6-Mäusen wurde im Gegensatz zu mDC keine Sekretion von IL-1 $\beta$  nach Infektion mit MVA oder MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev nach vier Stunden detektiert (Abbildung 18 A). MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R führte dagegen bereits 4 Stunden nach Infektion zur Sekretion von IL-1 $\beta$  bis zu einer maximalen Konzentration von etwa 200pg/mL nach 24 Stunden. Somit wird nach viraler Infektion eine stetig ansteigende IL-1 $\beta$ -Sekretion induziert. Durch die Expression des viralen IL-1 $\beta$ R wird IL-1 $\beta$  nach Infektion mit MVA bzw. MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev abgefangen. Wurden aus MyD88<sup>-/-</sup>-Mäusen abgeleitete BMDM infiziert bzw. stimuliert, so konnte in keinem der verschiedenen Infektionsansätze IL-1 $\beta$  detektiert werden (Abbildung 18 B). Die Infektion von Casp-1<sup>-/-</sup>-abgeleiteten BMDM führte im Falle von MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R zur Sekretion



von etwas niedrigeren Mengen IL-1 $\beta$  im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Abbildung 18 C). Alle anderen Viren und LPS verursachten keine Sekretion.

### 3.3.3. Induktion von IL-1 $\beta$ in *ex vivo* rekultivierten Zellen einer Peritoneallavage

In einem weiteren Experiment sollte analysiert werden, ob direkt aus Mäusen isolierte und *ex vivo* infizierte Zellen ebenfalls in der Lage sind, nach Infektion mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R IL-1 $\beta$  zu sekretieren. Außerdem wurde analysiert, ob Vorstimulation dieser Zellen durch Immunisierung der Maus vor der Entnahme der Zellen einen Einfluss auf die IL-1 $\beta$ -Sekretion hat. Dazu wurden Zellen aus dem Peritoneum der Mäuse, die einen großen Anteil Makrophagen aufweisen, mittels einer Lavage isoliert und nach Rekultivierung infiziert. Je 5 B6-Mäuse wurden intraperitoneal mit PBS oder  $1 \cdot 10^8$  PFU MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R bzw. MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev immunisiert und nach 6 Tagen wie unter 2.2.7.1 beschrieben getötet und die Peritonealzellen isoliert und kultiviert. Die Zellen wurden mit MVA oder MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R mit einer moi von 5 infiziert und nach 24 Stunden der IL-1 $\beta$  Gehalt im Überstand bestimmt.



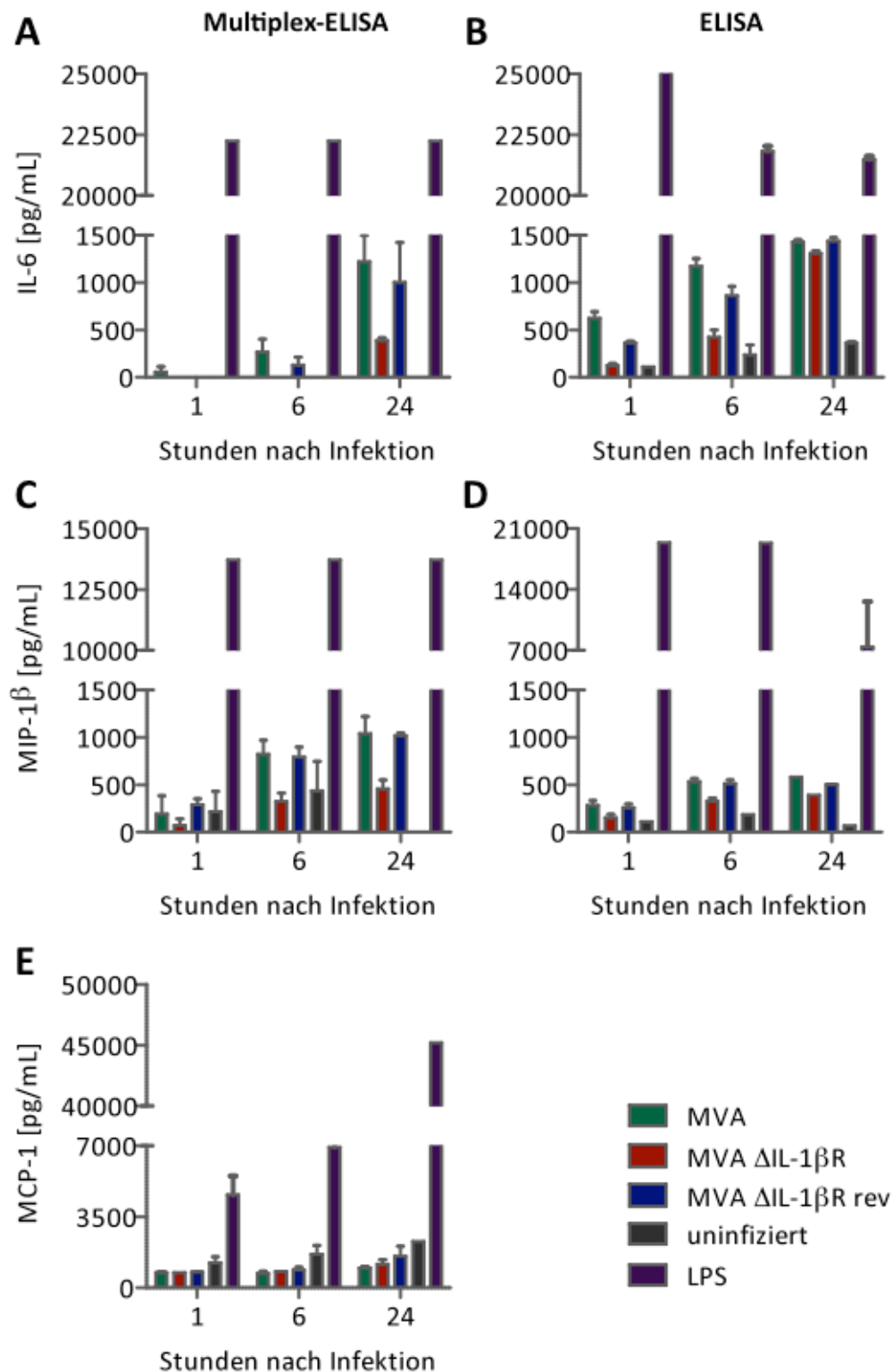
**Abbildung 19: Induktion von IL-1 $\beta$  nach *ex vivo* Infektion von murinen Peritonealzellen mit MVA und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R.** Peritonealzellen aus (A) PBS-immunisierten B6-Mäusen und (B) immunisierten B6-Mäusen wurden mit MVA und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R (moi = 5) infiziert und nach 24 Stunden der IL-1 $\beta$ -Gehalt im Überstand durch ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM. Als Positivkontrolle diente die Stimulation mit 1 $\mu$ g/mL LPS.

---

Bereits nach Analyse der Überstände infizierter Peritonealzellen aus PBS-immunisierten Mäusen zeigte sich, dass auch in diesen Zellen Infektion mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R zu einer Sekretion von IL-1 $\beta$  führt. Im Gegensatz zu MVA wurde in der Deletionsmutante 20pg/mL IL-1 $\beta$  detektiert (Abbildung 19 A), was allerdings außerhalb der Messgrenzen des verwendeten ELISAs liegt. Jedoch war dieser Effekt in Zellen aus immunisierten Mäusen noch viel ausgeprägter. Unabhängig davon, mit welchem Virus die vorherige Immunisierung der Mäuse erfolgte, wurde eine IL-1 $\beta$ -Konzentration von etwa 150pg/mL nach Infektion mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R erreicht (Abbildung 19 B). Für MVA war dies nicht der Fall. Folglich konnten die in Abschnitt 3.3.2 dargestellten Ergebnisse *ex vivo* bestätigt werden, wobei eine vorherige Stimulation der Zellen durch Immunisierung die Sekretion von IL- $\beta$  nach Infektion der Peritonealzellen mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R begünstigte.

#### 3.3.4. Induktion von weiteren Zytokinen in knochenmarksabgeleiteten, myeloiden dendritischen Zellen

Für IL-1 $\beta$  ist beschrieben, dass es weitere Zytokine, insbesondere IL-6 induzieren kann (Janeway, 2005). Daher wurde im Folgenden die Induktion weiterer, vor allem pro-inflammatorischer Zytokine nach Infektion von mDCs mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R untersucht. Hierzu wurde ein Multiplex-ELISA für IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-12p70, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , KC, MIP-1 $\beta$ , MCP-1, IL-18, IP-10, IL-2 und IL-10 angewendet. mDC wurden wie unter 3.3.1 beschrieben infiziert und je 25 $\mu$ L des zellfreien Kulturüberstandes in die Analyse eingesetzt. Die Analyse erfolgte 1, 6 und 24 Stunden nach Infektion. Die Ergebnisse des Multiplex-ELISA wurden, wenn erforderlich, durch konventionellen ELISA bestätigt.



**Abbildung 20: Induktion weiterer Zytokine nach Infektion von murinen mDC mit MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev.** Mit GM-CSF aus Knochenmark differenzierte mDC aus B6-Mäusen wurden mit MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev (moi = 5) infiziert und nach verschiedenen Zeitpunkten der (A-B) IL-6-Gehalt, (C-D) MIP-1 $\beta$ -Gehalt und (E) der MCP-1-Gehalt im Überstand durch Multiplex- und konventionellen ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM. Als Positivkontrolle diente die Stimulation mit 1 $\mu$ g/mL LPS.

Von den 12 analysierten Zytokinen wurden KC, IL-18, IP-10, IL-6, MIP-1 $\beta$  und MCP-1 in gegenüber uninfizierten Zellen erhöhten Konzentration nach Infektion detektiert. Für alle

---

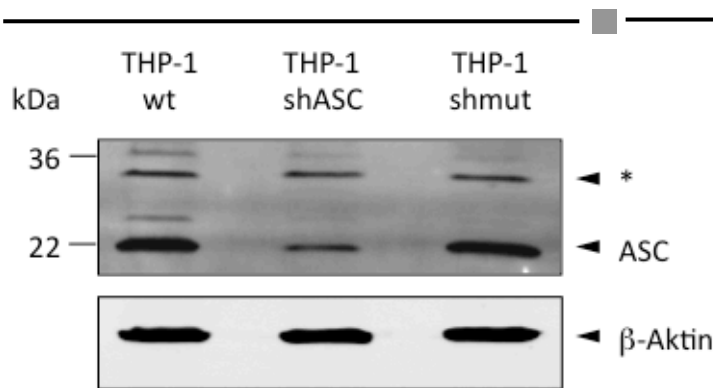
genannten Zytokine wurde die Zunahme der Konzentration bis zum Zeitpunkt von 24 Stunden beobachtet. Unterschiede für die Infektion mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R wurden bei IL-6 und MIP-1 $\beta$  festgestellt (Abbildung 20). IL-6 schien nach Infektion mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R in geringerem Maße im Vergleich zum Wildtyp induziert zu werden (Abbildung 20 A). Diese Beobachtung ließ sich jedoch nur eingeschränkt durch die Analyse im konventionellen ELISA bestätigen (Abbildung 20 B). Das Gleiche galt auch für MIP-1 $\beta$  (Abbildung 20 C und D). MCP-1 war nach 24 Stunden leicht erhöht im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 20 E), jedoch nicht im Vergleich zur Revertante.

### 3.3.5. Einfluss des viralen IL-1 $\beta$ -Rezeptors auf die Induktion und Sekretion von IL-1 $\beta$ in humanen Zellen *in vitro*

Zuletzt sollte der Einfluss des IL-1 $\beta$ R nach Infektion humaner Zellen untersucht werden, auch im Hinblick auf die Anwendung der Deletionsmutante als potentielles Vektorvakzin. Für die Analysen wurde die monozytäre, humane Zelllinie THP-1 verwendet, von der auch eine *knock-down*-Linie verfügbar war, in der die für die Sekretion von IL-1 $\beta$  essentielle NLRP3-Inflammasom-Komponente ASC mittels stabil integrierter shRNA (THP-1 shASC) herunter reguliert war.

#### 3.3.5.1. Induktion von IL-1 $\beta$ in stimulierten THP-1 Zellen

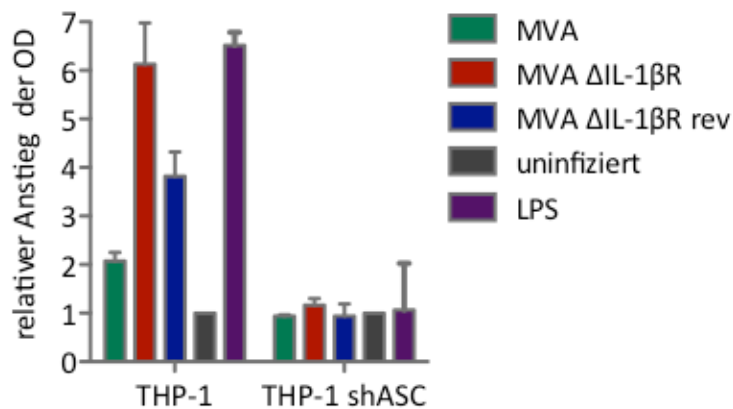
Zunächst wurde die Expression des ASC-Proteins in wildtypischen und shASC THP-1 mittels eines spezifischen Antikörpers im *Western Blot* überprüft. Hierzu wurden aus der jeweiligen Stammkultur  $1 \cdot 10^6$  Zellen entnommen, mit 1-fach SDS-Lysispuffer lysiert und die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Übertragen der Proteine auf eine Membran wurden die Banden durch fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper detektiert.



**Abbildung 21: Verifizierung des ASC-knock-down in der THP-1 shASC Kontrollzelllinie.**  $1 \cdot 10^6$  Zellen wurden lysiert und durch *Western-Blot* analysiert. Die Detektion erfolgte mit einem ASC-spezifischen Antikörper. THP-1 shmut mit mutierter shASC dienten als Kontrolle. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin. \* = unspezifische Bindung an zelluläres Protein.

In Wildtyp THP-1-Zellen und in der Kontrolle mit mutierter shRNA (THP-1 shmut) war deutlich eine Expression von ASC auf der erwarteten Höhe von 22kDa zu erkennen. Hingegen fiel diese Bande in der *knock-down* Zelllinie THP-1 shASC deutlich schwächer aus (Abbildung 21).

Im darauf folgenden Versuch wurden THP-1 und THP-1 shASC-Zellen zwecks Analyse der IL-1 $\beta$ -Sekretion mit PMA vorstimuliert, infiziert und anschließend die IL-1 $\beta$ -Konzentration im Zellkulturüberstand mittels HEK Blue IL-1 $\beta$ -Reporterzellen bestimmt (vgl. 2.2.6.2). Hierzu wurden die THP-1-Zellen in einer 96er Zellkulturplatte mit einer Zelldichte von  $1,8 \cdot 10^5$  Zellen/Kammer ausgesät und acht Stunden in Kulturmedium mit 7,8ng/mL PMA vorstimuliert. Anschließend wurde mit MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev mit einer moi von 5 infiziert und die Überstände nach 16 Stunden bei 37°C abgenommen. Eine Vorstimulation mit PMA war notwendig, da unstimulierte THP-1 in einem Vorexperiment nach Infektion keine Sekretion von IL-1 $\beta$  zeigten.



**Abbildung 22: Induktion von IL-1 $\beta$  nach Infektion von PMA-stimulierten THP-1 Zellen mit MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev.** THP-1- bzw. THP-1 shASC-Zellen wurden 8 Stunden mit 7,8ng/mL PMA vorstimuliert und anschließend infiziert (moi = 5). Nach 16 Stunden wurden die Überstände auf HEK Blue IL-1 $\beta$ -Reporterzellen transferiert und nach Substratzugabe die IL-1 $\beta$ -Konzentration durch Ermittlung der OD bestimmt. Die OD ist relativ zu uninferierten THP-1-Zellen angegeben. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM. Als Positivkontrolle diente die Stimulation mit 1 $\mu$ g/mL LPS.

Der Reporterassay ergab, dass nach Infektion vorstimulierter THP-1-Zellen mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R etwa die 2-3-fache Menge IL-1 $\beta$  im Vergleich zu Wildtyp-MVA induziert wurde (Abbildung 22). Darüber hinaus war diese Induktion, wie auch die durch LPS in THP-1 shASC-Zellen nicht mehr zu beobachten.

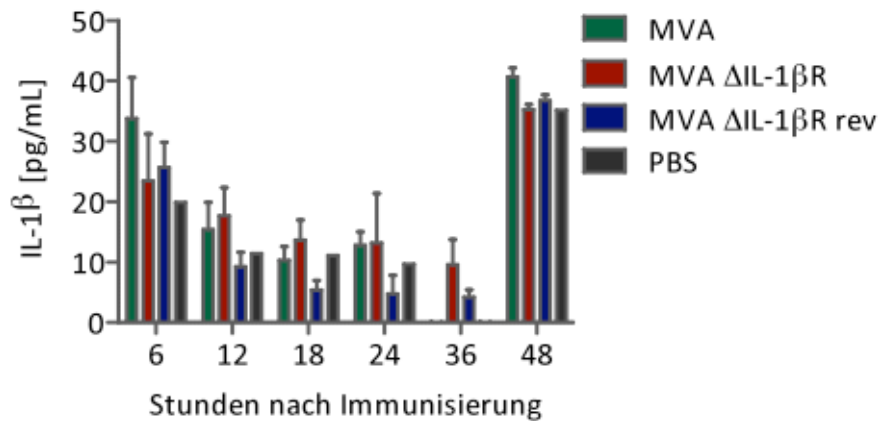
### 3.4. Einfluss des viralen IL-1 $\beta$ -Rezeptors *in vivo*

Der nächste Schritt, der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen war die Analyse der MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R-Deletionsmutante im Mausmodell. Es sollte untersucht werden, ob *in vivo* ebenfalls eine vermehrte Sekretion von IL-1 $\beta$  nach Immunisierung mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R erfolgt und ob hieraus die differentielle Regulation weiterer Zytokine resultiert. Darüber hinaus wurden Antikörper- und T-Zell-Antworten untersucht, um eine möglichst vollständige Charakterisierung der Immunantwort nach Immunisierung mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R zu erreichen.

#### 3.4.1. Induktion von IL-1 $\beta$ und anderen Zytokinen *in vivo*

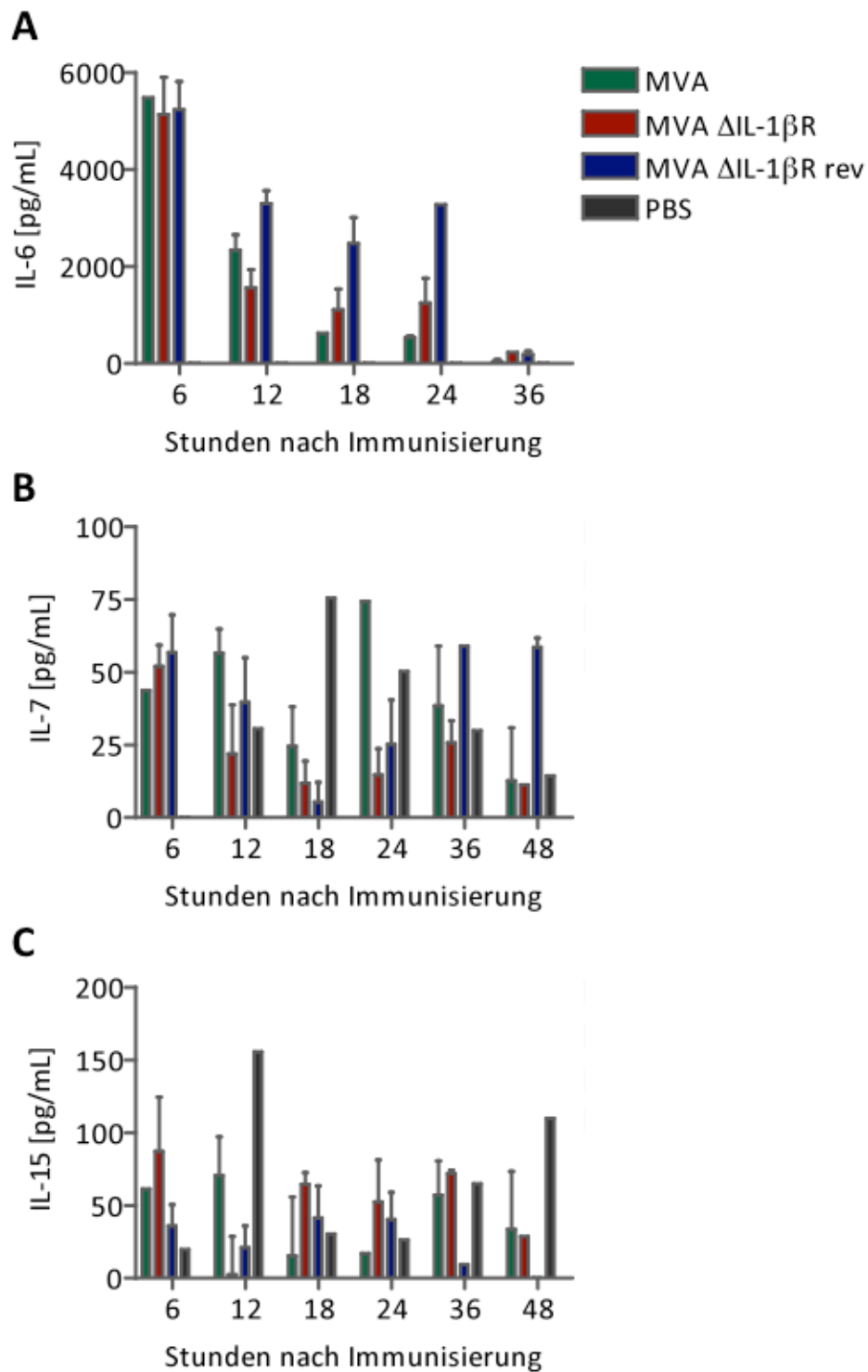
Zunächst sollte geklärt werden, ob die Konzentration von IL-1 $\beta$  auch *in vivo* nach Immunisierung mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R im Vergleich zum Wildtyp erhöht war. Hierzu wurden je 3

B6-Mäuse mit PBS oder  $1 \cdot 10^8$  PFU MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R bzw. MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev intraperitoneal immunisiert und nach 6, 12, 18, 24, 36 und 48 Stunden die IL-1 $\beta$ -Konzentration im Serum durch ELISA bestimmt.



**Abbildung 23: Induktion von IL-1 $\beta$  nach Immunisierung von B6-Mäusen mit MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev.** B6-Mäuse wurden intraperitoneal mit PBS,  $1 \cdot 10^8$  PFU MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R bzw. MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev immunisiert und nach verschiedenen Zeitpunkten Serum entnommen und die Konzentration von IL-1 $\beta$  mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM.

Da alle gemessenen Werte an der Nachweisgrenze von 31,3 pg/mL oder darunter liegen, sind die beobachteten Messwerte nicht gesichert. Aus der Messung kann somit keine Aussage über systemisch vorliegendes IL-1 $\beta$  getroffen werden (Abbildung 23). Um diese Fragestellung näher zu beleuchten, wurden aus den gleichen Serumproben weitere Zytokine bestimmt: IL-6, das durch IL-1 $\beta$  induzierbar ist, sowie IL-7 und IL-15, die eine Rolle für die Homöostase von Gedächtnis-T-Zellen besitzen und für die Befunde von Staib *et al.*, 2005) verantwortlich sein könnten.



**Abbildung 24: Induktion anderer Zytokine nach Immunisierung von B6-Mäusen mit MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev.** B6-Mäuse wurden intraperitoneal mit PBS,  $1 \cdot 10^8$  PFU MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R bzw. MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev immunisiert und nach verschiedenen Zeitpunkten Serum entnommen und die Konzentration von (A) IL-6, (B) IL-7 und (C) IL-15 mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM.

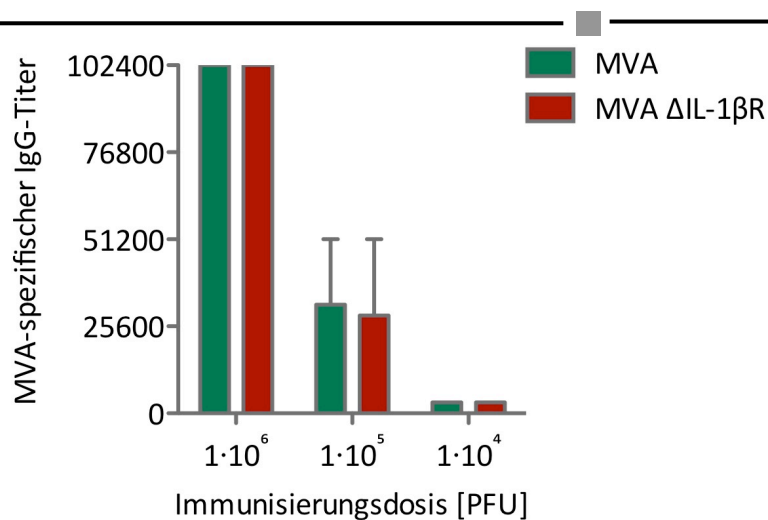
Die Analyse der Serumproben auf IL-6 ergab, dass durch MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev bereits 6 Stunden nach Immunisierung Mengen von  $\geq 5000$ pg/mL IL-6 induziert wurden (Abbildung 24 A). Insgesamt gesehen, nahm die IL-6-Konzentration nachfolgend



kontinuierlich ab und erreichte 36 Stunden nach Immunisierung ein Minimum, an dem kaum noch IL-6 detektierbar war. Jedoch war die Abnahmerate nicht für alle Viren gleich. Während die IL-6-Konzentration in MVA und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R immunisierten Mäusen bereits nach 12 Stunden nur noch weniger als die Hälfte des 6 Stunden-Wertes betrug, fiel die IL-6 Konzentration im Serum von MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev immunisierten Mäusen erst zwischen 24 und 36 Stunden entscheidend ab. Insgesamt gesehen gab es keine Unterschiede in der IL-6-Konzentration zwischen dem IL-1 $\beta$ -induzierenden MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und den beiden anderen Viren. Die Analyse der Serumproben auf IL-7 und IL-15 ergab ähnlich wie die Analyse auf IL-1 $\beta$  kein eindeutiges Ergebnis (Abbildung 24 B und C). Unter Beachtung der Nachweisgrenzen von 31,3 bzw. 125pg/mL lässt sich keine Aussage zu den beiden Zytokinen treffen, insbesondere wenn man die uneinheitlichen Tendenzen zwischen den einzelnen Viren betrachtet. Die Ergebnisse der ELISAs legen nahe, dass zu den analysierten Zeitpunkten kein IL-7 und IL-15 im Serum vorhanden war. Des Weiteren wurden die Seren analog den mDC-Überständen (vgl. 3.3.4) durch Multiplex-ELISA analysiert. Jedoch traten bei keiner dieser Analysen Unterschiede zwischen den einzelnen Viren auf, weshalb die Ergebnisse an dieser Stelle nicht näher diskutiert werden.

#### 3.4.2. Induktion von Antikörpern

Zusätzlich zu den von Staib *et al.*, 2005) festgestellten Befunden bezüglich der T-Zell-Antwort und dem Schutz gegen eine letale Infektion mit VACV erschien es sinnvoll, die Antikörperantwort zu analysieren. Hierzu wurden je 2 B6-Mäuse mit verschiedenen Infektionsdosen MVA oder MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R intravenös immunisiert. Da relativ geringe Virusdosen verwendet wurden, erfolgte die Immunisierung i.v. um eine gleichmäßige Verteilung im Organismus zu erreichen. Nach 10 Wochen erfolgte eine zweite Immunisierung. Hierbei erhielten alle Tiere  $1 \cdot 10^6$  PFU MVA, da lediglich eine Restimulation erfolgen sollte und der Stimulus, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, identisch sein sollte. Fünf Tage später wurden die MVA-spezifischen Antikörpertiter im Serum der Mäuse wie unter 2.2.6.1.4 beschrieben analysiert.

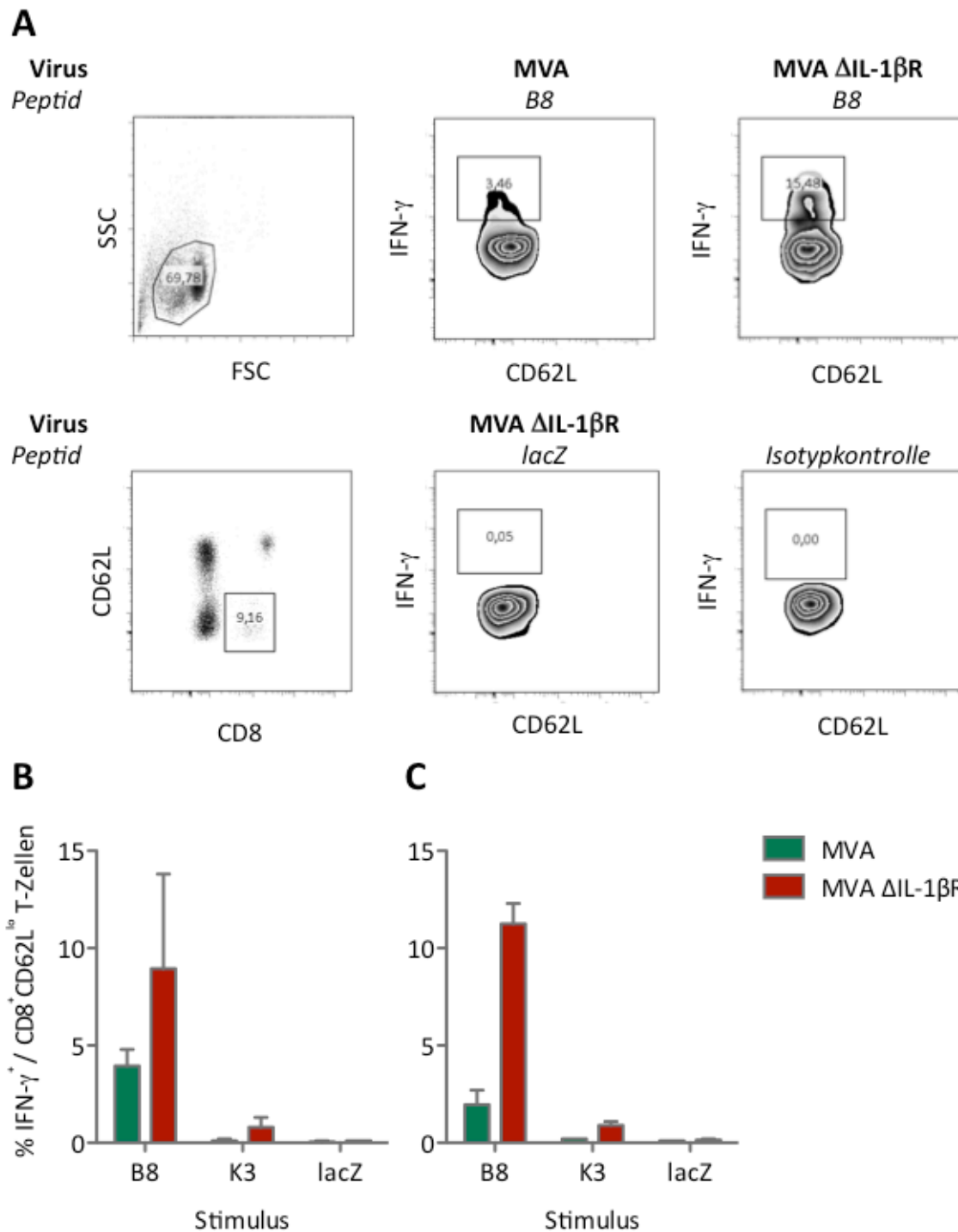


**Abbildung 25: Induktion von spezifischem IgG nach Immunisierung von B6-Mäusen mit MVA und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R.** B6-Mäuse wurden mit  $1 \cdot 10^6$ ,  $1 \cdot 10^5$  und  $1 \cdot 10^4$  PFU MVA oder MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R intravenös immunisiert, nach 10 Wochen mit  $1 \cdot 10^6$  PFU MVA geboostet und fünf Tage später die Serum-Antikörpertiter durch ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM.

Mit der höchsten Virusdosis induzierten beide Viren einen IgG-Titer von ca.  $1 \cdot 10^5$  (Abbildung 25). Auch für die beiden niedrigeren Dosen wurden zwischen den Viren nahezu identische Titer von ca.  $2,5 \cdot 10^4$  bzw.  $3 \cdot 10^3$  bestimmt. Offensichtlich beeinflusste die Deletion des IL-1 $\beta$ R die Antikörperantwort nicht.

### 3.4.3. Voranalyse der T-Zell-Antwort in C57BL/6N-Mäusen

Zusätzlich zur Untersuchung der Zytokin- und Antikörperantwort, wurde auch die T-Zell-Antwort analysiert. Hierzu wurde zunächst ein Vorexperiment zur Dosisfindung nach i.v.-Applikation mit verschiedenen Virusdosen durchgeführt. Darüber hinaus diente der Versuch zur Bestätigung der bereits veröffentlichten Daten (Staub *et al.*, 2005) im für diese Arbeit gewählten Immunisierungsmodell. Je 2 B6-Mäuse wurden mit  $1 \cdot 10^6$  oder  $1 \cdot 10^5$  PFU MVA oder MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R intravenös immunisiert. Nach 10 Wochen erfolgte ein zweite Immunisierung mit  $1 \cdot 10^6$  PFU MVA. Fünf Tage später wurde die T-Zell-Antwort durch intrazelluläre Zytokinfärbung von isolierten Milzzellen (vgl. 2.2.4.4) gegen Interferon- $\gamma$  wie unter 2.2.6.4 beschrieben durchgeführt. Hierbei wurden ein Peptid des immundominanten CD8<sup>+</sup>-Epitops des B8-Proteines, sowie ein Peptid des subdominanten CD8<sup>+</sup>-Epitops des K3-Proteins zur Restimulation verwendet. Die unspezifische Stimulation mit einem lacZ-Peptid diente als Kontrolle.



**Abbildung 26: Intrazellulärer Nachweis von IFN- $\gamma$  in Splenozyten aus mit verschiedenen Dosen MVA und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R immunisierten Mäusen.** B6-Mäuse wurden mit  $1 \cdot 10^6$  oder  $1 \cdot 10^5$  PFU MVA oder MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R intravenös. immunisiert. Nach 10 Wochen erfolgte eine zweite Immunisierung mit  $1 \cdot 10^6$  PFU MVA intravenös. Fünf Tage später wurde eine intrazelluläre IFN- $\gamma$ -Färbung von Milzzellen durchgeführt. (A) beispielhafte Darstellung von FACS-Diagrammen für  $1 \cdot 10^6$  PFU, (B) Gesamtauswertung für  $1 \cdot 10^6$  PFU, (C) Gesamtauswertung für  $1 \cdot 10^5$  PFU. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM.

Die durch durchflußzytometrische Bestimmung erhaltenen Daten wurden mit der mitgelieferten Gerätesoftware BD FACS DIVA ausgewertet und mit dem Programm FlowJo graphisch aufbereitet (Abbildung 26 A). Zunächst wurde die Lymphozytenpopulation im

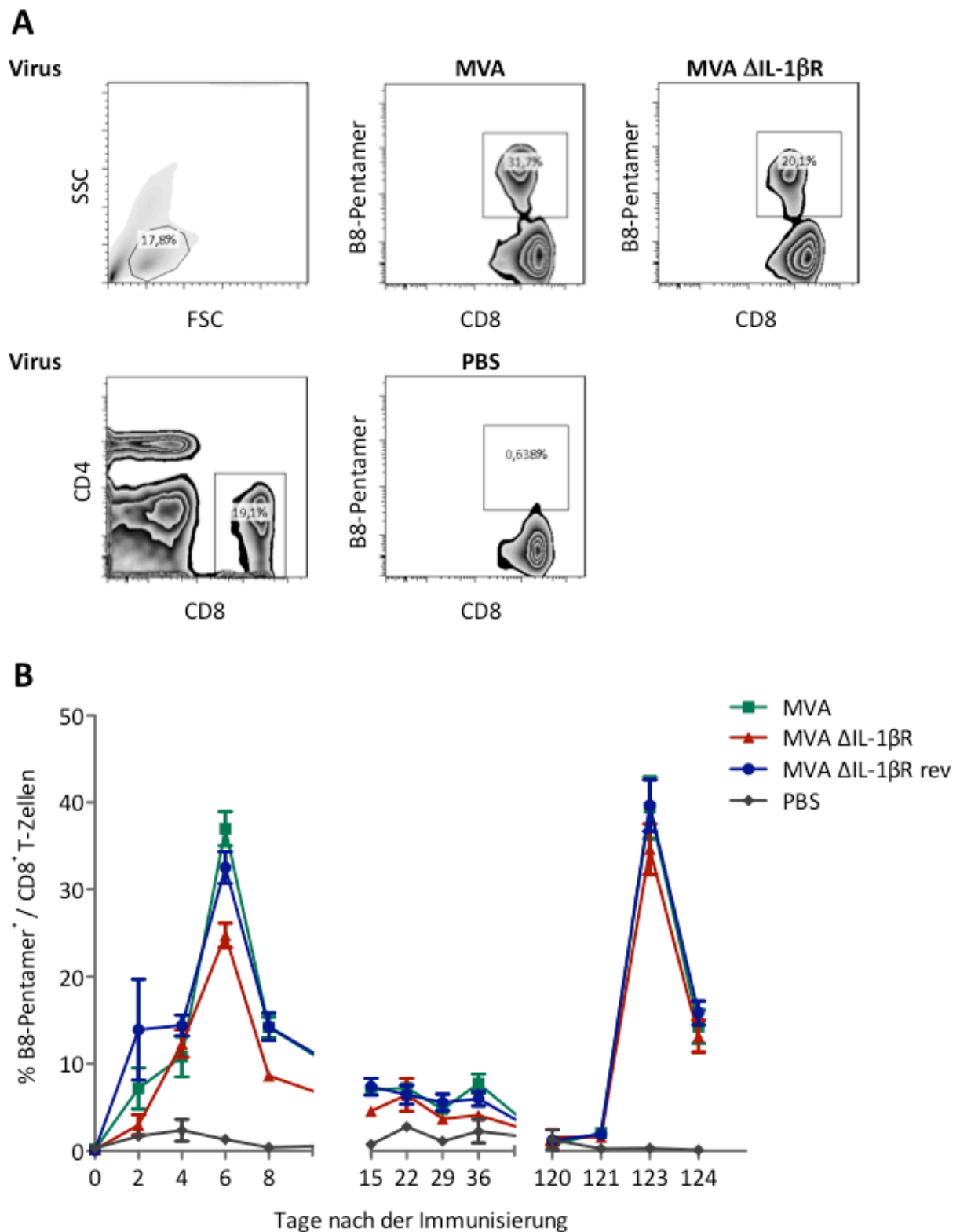
FSC/SSC-Graphen selektiert. Anschließend wurden aktivierte CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>lo</sup> T-Zellen ausgewählt und die darin enthaltene Menge an IFN- $\gamma$ -positiven Zellen quantifiziert. Exemplarisch sind in Abbildung 26 A die Daten von Tieren dargestellt, die mit  $1 \cdot 10^6$  PFU immunisiert wurden. Im Vergleich zu MVA induzierte die Immunisierung mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R mehr als drei Mal so viel IFN- $\gamma$ -positive CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die spezifisch für das MVA B8-Epitop sind, während die Negativkontrolle lacZ und die Isotypkontrolle in diesem Experiment erwartungsgemäß negativ blieben. Abbildung 26 B zeigt die zusammenfassende Darstellung für die Immunisierung mit  $1 \cdot 10^6$  PFU. Sowohl Restimulation mit B8-Peptid, als auch mit K3-Peptid führten im Falle von MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R-immunisierten Mäusen zu etwa dreifach höheren IFN- $\gamma$ -Konzentrationen im Vergleich zur Immunisierung mit MVA. Dieser Effekt war sogar noch etwas ausgeprägter für die Immunisierung mit  $1 \cdot 10^5$  PFU (Abbildung 26 C). Für die folgenden Experimente wurde dennoch mit einer Dosis von  $1 \cdot 10^6$  PFU i.v. immunisiert, da ein Tier in der mit  $10^6$  PFU MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R immunisierten Gruppe keinerlei Immunantwort zeigte und die Menge an IFN- $\gamma$ -positiven Zellen theoretisch noch höher gewesen wäre.

#### 3.4.4. Induktion von spezifischen T-Zellen in der Akut- und Gedächtnisphase

Die Induktion von spezifischen T-Zellen sollte nicht nur für die Gedächtnisphase, sondern auch von der Akutphase beginnend, in einer Zeitkinetik untersucht werden und mit der Anzahl spezifischer T-Zellen in der Milz verglichen werden. Hierfür wurden nach erfolgter Immunisierung periphere T-Zellen mittels eines spezifischen MHC Klasse I-B8-Pentamers nachgewiesen. Darüber hinaus wurde der Phänotyp der induzierten T-Zellen hinsichtlich Gedächtnis-T-Zell-Markern, sowie einem Apoptosemarker charakterisiert.

##### 3.4.4.1. Kinetik der peripheren, MVA-spezifischen T-Zell-Antwort

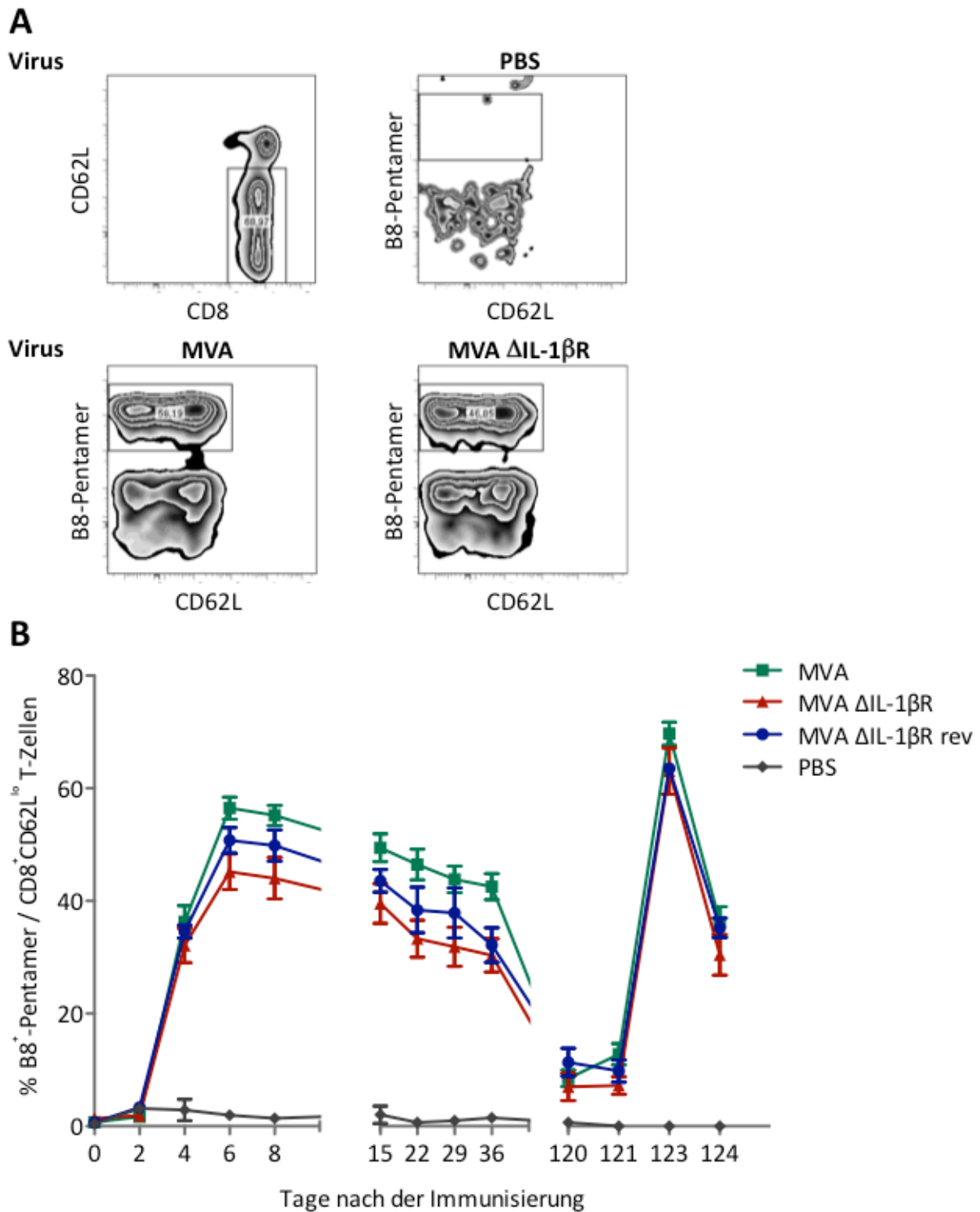
Für die Analyse der MVA-spezifischen T-Zell-Antwort wurden je 6 B6-Mäuse mit PBS oder  $1 \cdot 10^6$  PFU MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev intravenös immunisiert und zu den angegebenen Zeitpunkten 20 $\mu$ L Vollblut für die Analysen entnommen. 4 Monate später erfolgte zur Analyse der Gedächtnis-T-Zell-Antwort eine weitere Immunisierung mit  $1 \cdot 10^6$  PFU MVA.



**Abbildung 27: Induktion B8-spezifischer T-Zellen im Blut in der Akut- und Gedächtnisphase nach Immunisierung von B6-Mäusen mit MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev bezogen auf die Gesamtzahl der CD8<sup>+</sup> Zellen.** B6-Mäuse wurden mit PBS,  $1 \cdot 10^6$  PFU MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev intravenös. immunisiert. Nach 4 Monaten erfolgte ein zweite Immunisierung mit  $1 \cdot 10^6$  PFU MVA intravenös. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde eine B8-Pentamerfärbung peripherer Blutzellen durchgeführt. (A) exemplarische Auswertung der Rohdaten, (B) grafische Darstellung aller Daten. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM.

---

Die durch durchflusszytometrische Bestimmung erhaltenen Daten wurden mit der mitgelieferten Gerätesoftware BD FACS DIVA ausgewertet und mit dem Programm FlowJo graphisch aufbereitet (Abbildung 27 A). Lymphozyten wurden im FSC/SSC-Graphen selektiert und anschließend in CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen aufgeteilt. Die CD8<sup>+</sup>-Fraktion wurde dann auf das Vorhandensein B8-Pentamer-positiver Zellen analysiert. Die exemplarische Darstellung je eines Tieres für PBS, MVA und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R zeigte, dass unimmunisierte Mäuse keine oder nur sehr wenige MVA-spezifische T-Zellen besitzen, während in immunisierten Tieren 6 Tage nach der Immunisierung, am Maximum der Primärantwort, 25-35% aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen MVA-spezifisch waren. Dabei tendierten MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R-immunisierte Tiere mit durchschnittlich 25% zu etwas geringeren T-Zell-Antworten im Vergleich zum Wildtyp-Virus. Der Verlauf der T-Zell-Antwort war für alle verwendeten Viren sehr ähnlich (Abbildung 27 B). Nach dem Maximum am Tag 6 fiel die Anzahl der spezifischen T-Zellen in allen immunisierten Tieren rasch auf unter 10% ab und veränderte sich auch in der anschließenden vierwöchigen Beobachtungsphase nicht mehr entscheidend. Die zweite Immunisierung führte zu einer noch stärkeren, spezifischen T-Zell-Antwort mit einem Maximum von etwa 40% für alle drei Viren vier Tage nach der Applikation. Zu diesem Zeitpunkt waren keine wesentlichen Unterschiede mehr in der T-Zellantwort gegen die verschiedenen Viren zu verzeichnen. Da sich in dieser Analyse keine entscheidenden Unterschiede zwischen MVA und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R feststellen ließen, wurden die gleichen Daten zusätzlich im Hinblick auf die Aktivierung der T-Zellen anhand des Markers CD62L analysiert.



**Abbildung 28: Induktion B8-spezifischer T-Zellen im Blut in der Akut- und Gedächtnisphase nach Immunisierung von B6-Mäusen mit MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev bezogen auf die Zahl der aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen.** B6-Mäuse wurden mit PBS,  $1 \cdot 10^6$  PFU MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev intravenös immunisiert. Nach 4 Monaten erfolgte eine zweite Immunisierung mit  $1 \cdot 10^6$  PFU MVA intravenös. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde eine B8-Pentamerfärbung peripherer, MVA-spezifischer Blutzellen durchgeführt. (A) exemplarische Auswertung der Rohdaten, (B) grafische Darstellung aller Daten. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM.

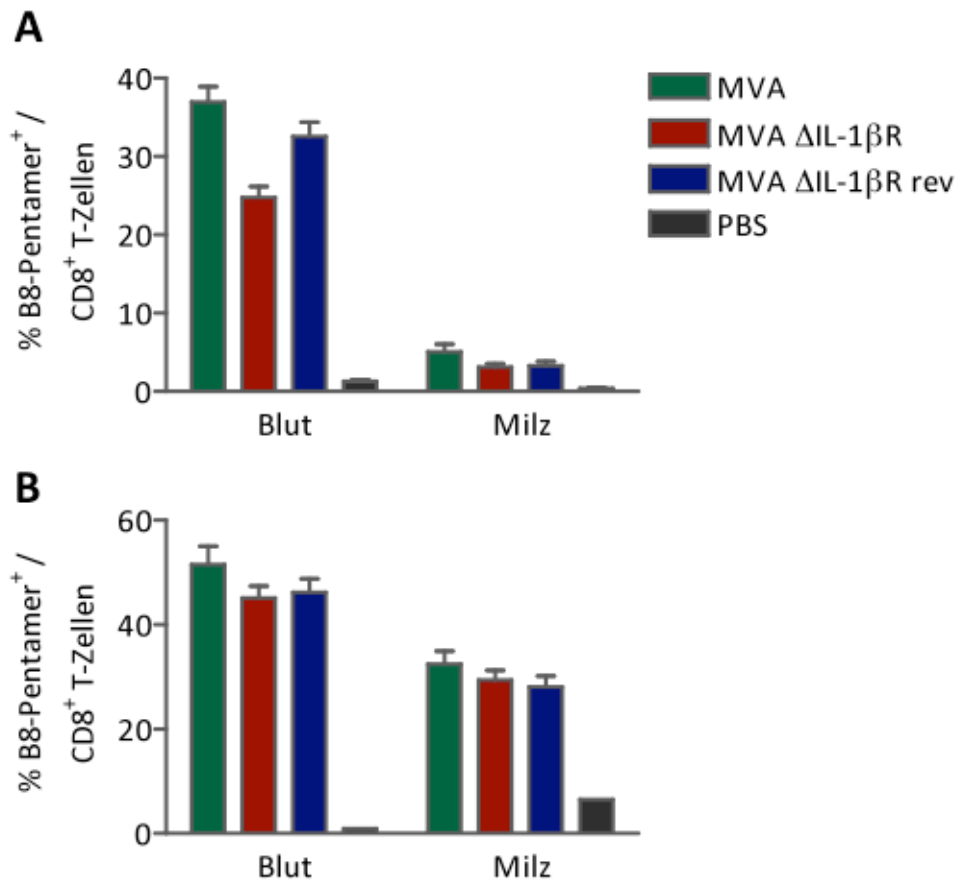
---

Hierzu wurden zusätzlich zum obenstehenden Vorgehen die CD8<sup>+</sup> Zellen auf niedrige Expression des T-Zell-Aktivierungsmarkers CD62L selektiert und dann auf das Vorhandensein B8-Pentamer-positiver Zellen analysiert (Abbildung 28 A). Zum Maximum der Primärantwort an Tag 6 zeigten in etwa 50% der aktivierten CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>lo</sup> T-Zellen einen MVA-spezifischen Phänotyp. Dieser Anteil lag für MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R-immunisierte Tiere leicht unter denen für MVA. Dieser Wert fiel in der nachfolgenden, vierwöchigen Beobachtungsphase für alle Viren gleichermaßen auf etwa 40% ab und erreichte vier Monate nach der ersten Immunisierung ein Minimum von etwa 10% (Abbildung 28 B). Die zweite Immunisierung führte zu einem noch höheren Anteil aktivierter, spezifischer T-Zellen mit einem Maximum von über 60% für alle drei Viren vier Tage nach der Applikation. Somit lag der Anteil MVA-spezifischer, aktivierter T-Zellen bei allen Viren insgesamt höher als für lediglich spezifische T-Zellen. Insgesamt ergaben sich jedoch ähnlich Abbildung 27 keine Unterschiede in der T-Zellantwort zwischen MVA und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R.

#### 3.4.4.2. Vergleich spezifischer T-Zellen in sekundären, lymphoiden Organen und in der Peripherie

Für die Beurteilung von MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R war allerdings nicht nur die T-Zell-Antwort im peripheren Blut, sondern auch in sekundären lymphatischen Organen wie der Milz von Interesse. Deshalb wurde die MVA-spezifische T-Zell-Antwort an diesen beiden Orten vergleichend analysiert. Das Immunisierungsschema entsprach für diesen Versuch dem unter 3.4.4.1 angegebenen. Für die Analyse wurden an den Tagen 6 und 123 des Versuches Milzen entnommen und die Zellen wie unter 2.2.4.4 beschrieben präpariert. Von der Zellpräparation wurden  $1 \cdot 10^6$  Zellen mit B8-Pentamer laut Angaben unter 2.2.6.5 gefärbt. Die Zuordnung der einzelnen Zellpopulationen erfolgte ebenfalls wie unter 3.4.4.1 beschrieben.



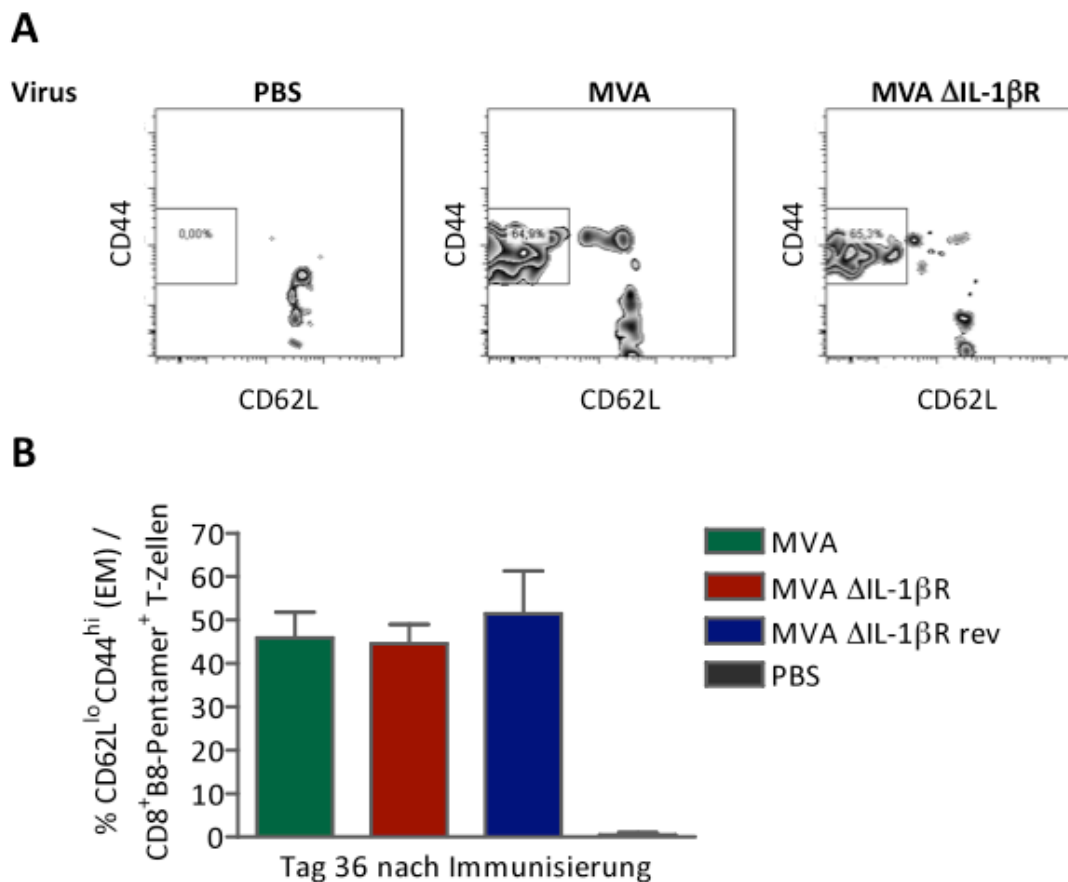


**Abbildung 29: Induktion B8-spezifischer T-Zellen in der Milz und im Blut nach Immunisierung von B6-Mäusen mit MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev.** (A) T-Zellantwort in der Akutphase 6 Tage nach Immunisierung (B) in der Gedächtnisphase 123 Tage nach Immunisierung. B6-Mäuse wurden mit PBS,  $1 \cdot 10^6$  PFU MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev intravenös immunisiert. Nach 4 Monaten erfolgte eine zweite Immunisierung mit  $1 \cdot 10^6$  PFU MVA intravenös. An Tag 6 und 123 wurden Blut- und Milzzellen isoliert und eine B8-Pentamerfärbung MVA-spezifischer Zellen durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM.

Wie bereits im vorherigen Abschnitt beobachtet (vgl. Abbildung 27 und Abbildung 28), wurden durch die Immunisierung mit MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev am Tag 6 nach Applikation im Blut etwa 30% CD8<sup>+</sup>B8-Pentamer<sup>+</sup> T-Zellen induziert, wobei MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R etwas unter dem Niveau von MVA und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev lag (Abbildung 29 A). Im Vergleich hierzu waren die korrespondierenden Werte in der Milz sehr viel geringer und lagen für alle Viren bei etwa 5%. Dieser Unterschied war am Tag 123, nach der zweiten Immunisierung, viel weniger stark ausgeprägt (Abbildung 29 B). Der Anteil spezifischer T-Zellen lag bei etwa 50% im Blut und 30% in der Milz, unabhängig vom verwendeten Virus. Da diese Analyse jedoch nur anhand des Analysenzeitpunktes Rückschlüsse auf den Anteil dedizierter, spezifischer Gedächtnis-T-Zellen zulässt, wurden diese im Folgenden mit Hilfe weiterer Marker analysiert.

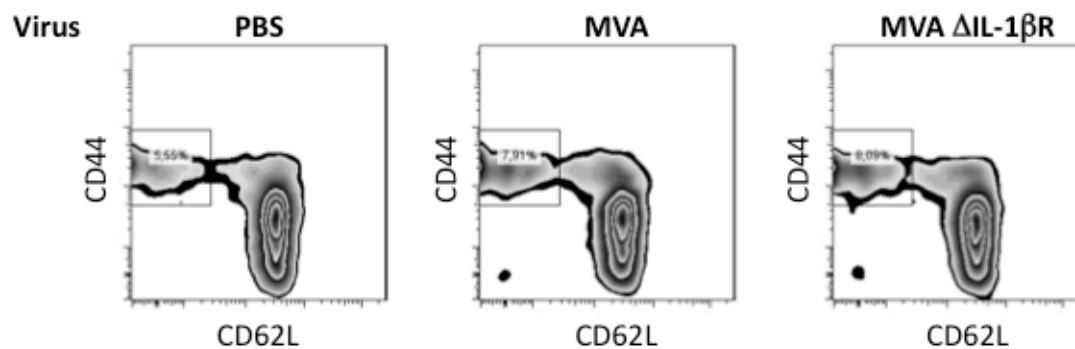
3.4.4.3. Induktion von spezifischen Gedächtnis-T-Zellen

Gedächtnis-T-Zellen werden in Effektor-Gedächtnis-T-Zellen, die überwiegend peripher vorkommen und zentrale Gedächtnis-T-Zellen in sekundären, lymphatischen Organen unterteilt. Sie zeichnen sich durch eine bestimmte Kombination der Oberflächenmoleküle CD62L und CD44 aus. Zentrale Gedächtnis-T-Zellen haben einen CD62L<sup>hi</sup>CD44<sup>hi</sup> Phänotyp, während Effektor-Gedächtnis-T-Zellen neben ihrem spezifischen T-Zell-Rezeptor einen CD62L<sup>lo</sup>CD44<sup>hi</sup> Phänotyp zeigen. Deshalb wurde im Rahmen der vorherigen Immunisierungsexperimente am Tag 36 nach der ersten Immunisierung, also zu einem Zeitpunkt an dem die Ausbildung von Gedächtnis-T-Zellen bereits sicher angenommen werden konnte, zusätzlich diese Zellpopulation analysiert. Dabei erfolgte die Zuordnung der Zellpopulationen in der durchflusszytometrischen Analyse zunächst wie unter 3.4.4.1 dargestellt.

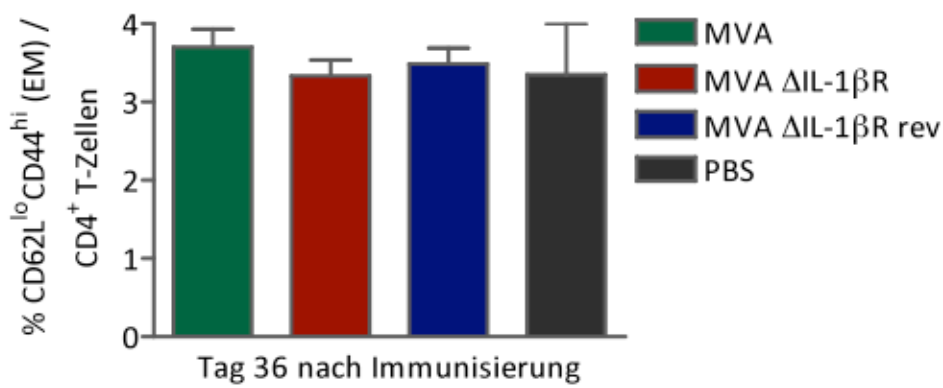


**Abbildung 30: Induktion B8-spezifischer CD8<sup>+</sup>-Gedächtnis-T-Zellen nach Immunisierung von B6-Mäusen mit MVA, MVA ΔIL-1βR und MVA ΔIL-1βR rev.** B6-Mäuse wurden mit PBS, 1·10<sup>6</sup> PFU MVA, MVA ΔIL-1βR und MVA ΔIL-1βR rev intravenös immunisiert. 36 Tage nach Immunisierung wurde eine B8-Pentamerfärbung peripherer, MVA-spezifischer Blutzellen durchgeführt und zusätzlich CD8<sup>+</sup>-Effektor-Gedächtnis-T-Zellen bestimmt. (A) exemplarische Auswertung der Rohdaten, (B) grafische Darstellung aller Daten. Dargestellt sind Mittelwert ± SEM.

**A**



**B**

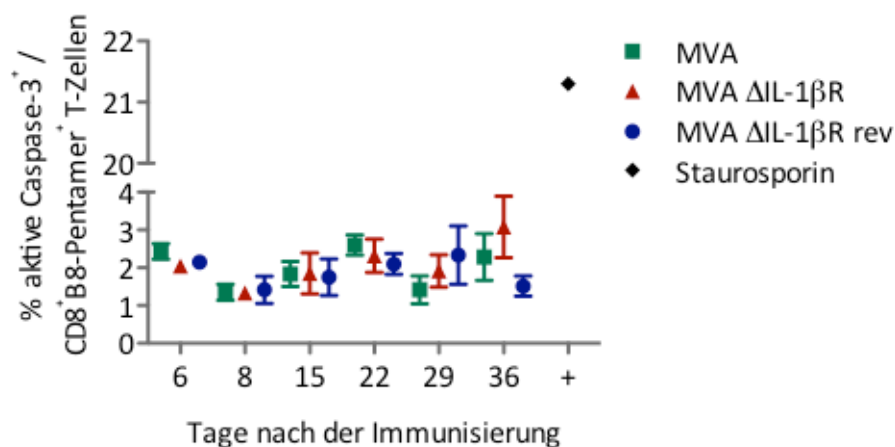


**Abbildung 31: Induktion von CD4<sup>+</sup>-Gedächtnis-T-Zellen nach Immunisierung von B6-Mäusen mit MVA, MVA ΔIL-1βR und MVA ΔIL-1βR rev.** B6-Mäuse wurden mit PBS, 1·10<sup>6</sup> PFU MVA, MVA ΔIL-1βR und MVA ΔIL-1βR rev intravenös immunisiert. 36 Tage nach Immunisierung wurde die Anzahl der CD4<sup>+</sup> Effektor-Gedächtnis-T-Zellen bestimmt. (A) exemplarische Auswertung der Rohdaten, (B) grafische Darstellung aller Daten. Dargestellt sind Mittelwert ± SEM.

Anschließend wurden für die CD8<sup>+</sup>B8-Pentamer<sup>+</sup> und auch die Gesamt-CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Marker CD44 und CD62L näher betrachtet (Abbildung 30 A und Abbildung 31 A). Bei der Untersuchung der CD8<sup>+</sup>B8<sup>+</sup> T-Zellen zeigte sich, dass für MVA, MVA ΔIL-1βR und MVA ΔIL-1βR rev jeweils etwa die Hälfte der spezifischen T-Zellen einen Effektor-Gedächtnis-Phänotyp aufwiesen (Abbildung 30 B). Im Gegensatz dazu war der Anteil von Effektor-Gedächtnis-T-Zellen an der gesamten CD4<sup>+</sup> T-Zell-Population etwa 3% und zwar unabhängig davon ob und mit welchem Virus die Mäuse immunisiert wurden (Abbildung 31 B). Da bislang keine Pentamere für CD4<sup>+</sup> Epitope aus MVA zur Verfügung standen, konnte die Analyse der spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht durchgeführt werden. Dennoch wurde festgestellt, dass MVA, MVA ΔIL-1βR und MVA ΔIL-1βR rev sich bezüglich der Induktion von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> Effektor-Gedächtnis-T-Zellen kaum unterschieden.

3.4.5. Einfluss des viralen IL-1 $\beta$ -Rezeptors auf die Apoptoserate von T-Zellen

Da die Kontraktion von T-Zellen durch deren Apoptoserate mitbestimmt wird, bestand die Möglichkeit, dass Unterschiede zwischen den Immunisierungen mit den einzelnen Viren eventuell darin zu suchen sind, dass unterschiedliche Apoptoseraten der spezifischen T-Zellen vorliegen. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde im Rahmen der vorgenannten Experimente auch aktive Caspase-3 als Apoptosemarker für die T-Zellen bestimmt. Ab Tag 6 bis zum Tag 36 nach Immunisierung wurde für periphere, spezifische CD8<sup>+</sup>B8<sup>+</sup> T-Zellen analysiert, ob in dieser Hinsicht Unterschiede bestehen. Dabei erfolgte die Zuordnung der Zellpopulation in der durchflusszytometrischen Analyse zunächst wie unter 3.4.4.1 dargestellt. Anschließend wurde für die CD8<sup>+</sup>B8-Pentamer<sup>+</sup> T-Zellen der Anteil aktive Caspase-3-positiver T-Zellen bestimmt.

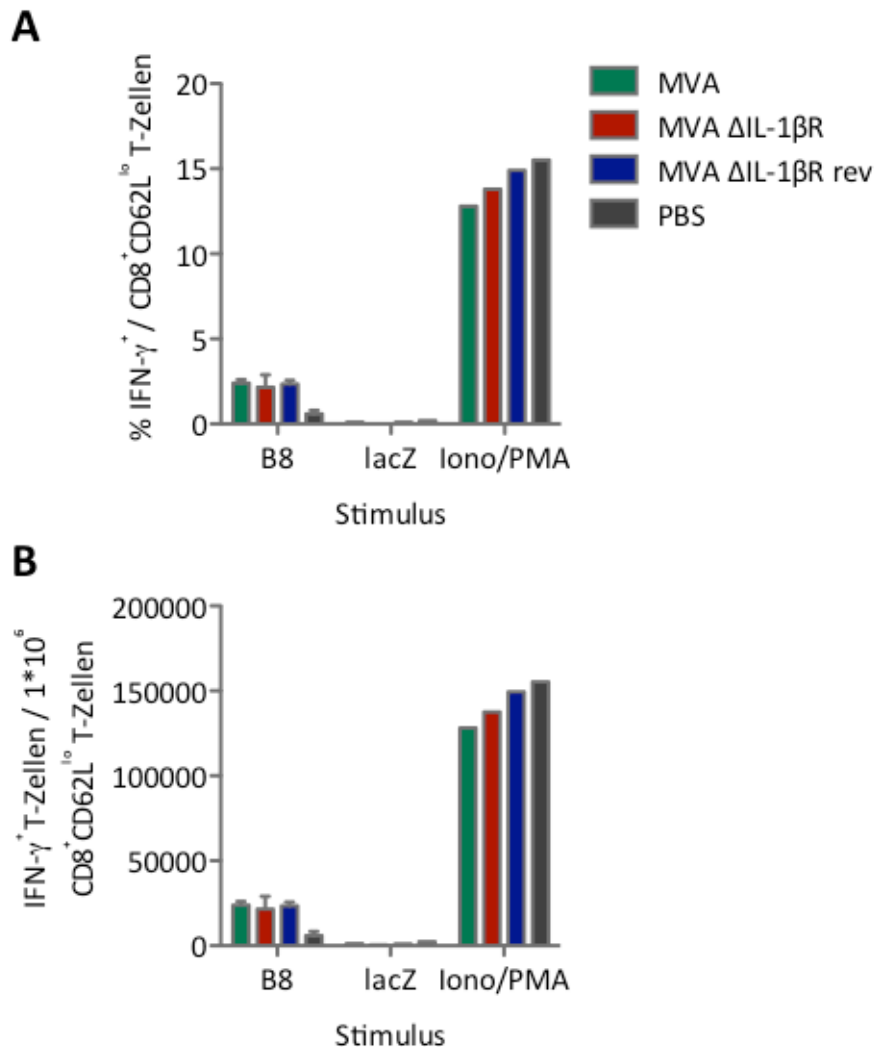


**Abbildung 32: Anteil apoptotischer, B8-spezifischer CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Blut nach Immunisierung von B6-Mäusen mit MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev.** B6-Mäuse wurden mit  $1 \cdot 10^6$  PFU MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev intravenös immunisiert. 36 Tage nach Immunisierung wurde eine B8-Pentamerfärbung peripherer, MVA-spezifischer Blutzellen durchgeführt und zusätzlich aktive-Caspase-3-positiv T-Zellen bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM. + = Als Positivkontrolle wurden Zellen 4 Stunden mit 1 $\mu$ M Staurosporin behandelt.

Die Behandlung der Zellen mit Staurosporin induzierte etwa 20% apoptotische CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 32). Hingegen war der Anteil apoptotischer, spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in immunisierten Mäusen über die gesamte Versuchsdauer sehr gering und lag bei 2-3%. MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R unterschied sich hierbei nicht von Wildtyp und Revertante, was darauf hindeutet, dass offensichtlich die Kontraktion der MVA-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Immunisierung mit MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev in gleichem Maße abläuft.

3.4.6. Einfluss des viralen IL-1 $\beta$ -Rezeptors auf die Zytotoxizität spezifischer T-Zellen

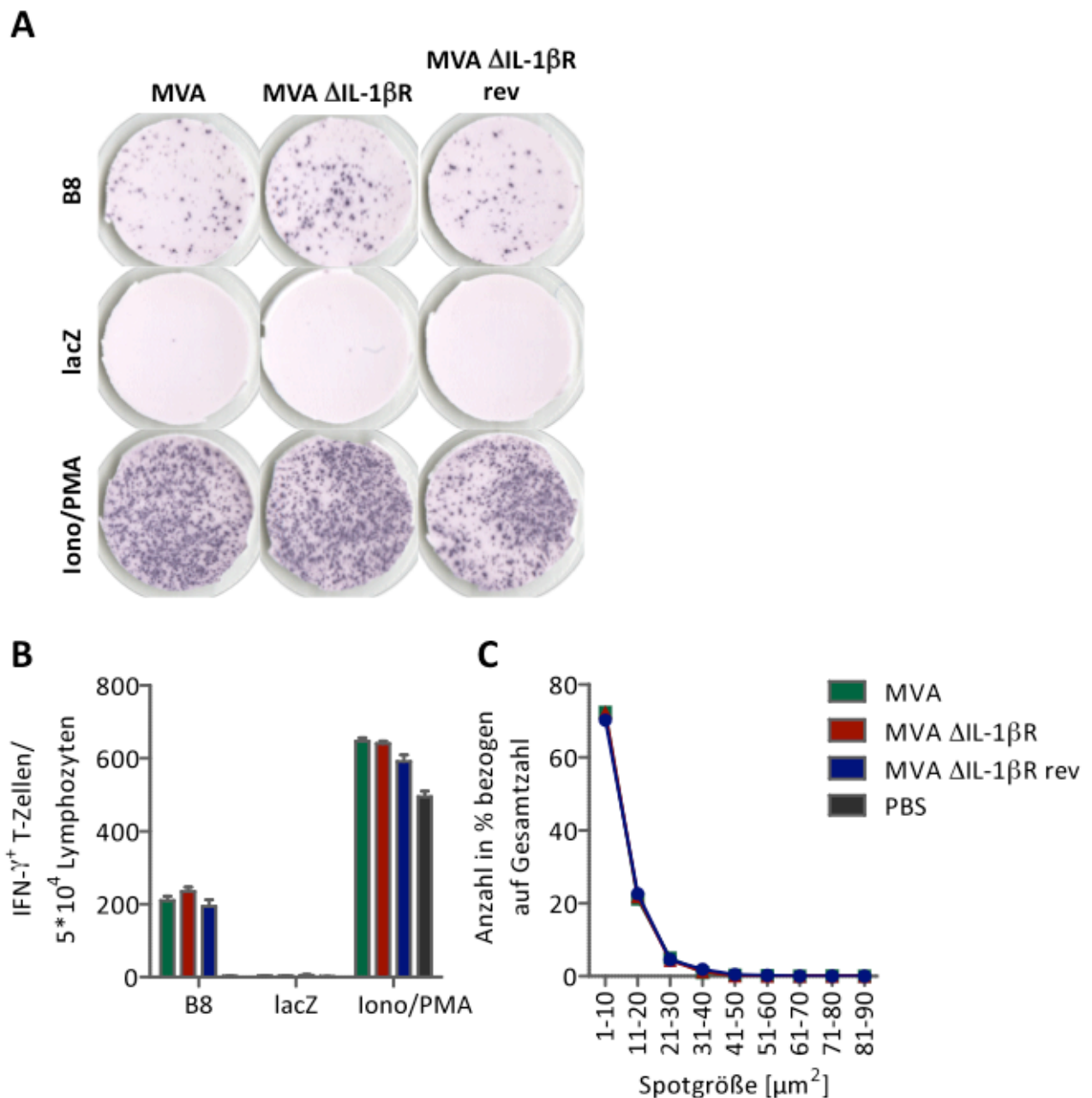
Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die IL-1 $\beta$ -Induktion durch MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R die Zytotoxizität der nach Immunisierung gebildeten T-Zellen beeinflusst. Dazu wurde der Anteil zytotoxischer, Interferon- $\gamma$ -sekretierender T-Zellen nochmals eingehend bestimmt. Zu diesem Zweck erfolgte nach dem Ende der vorstehenden Versuche an Tag 124 die Isolation von Milzzellen und Blutzellen aus den immunisierten Mäusen (vgl. 2.2.4.4 und 2.2.4.5). Die Milzzellen aller Tiere wurden durch IFN- $\gamma$  ICS analysiert (vgl. 2.2.6.4) und von je zwei Tieren wurden Milz- und Blutzellen durch IFN- $\gamma$  ELISPOT untersucht (vgl. 2.2.6.3).



**Abbildung 33: Relativer (A) und absoluter Anteil (B) IFN- $\gamma$  sekretierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Immunisierung von B6-Mäusen mit MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev.** B6-Mäuse wurden mit PBS,  $1 \cdot 10^6$  PFU MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev intravenös immunisiert. Nach 4 Monaten erfolgte ein zweite Immunisierung mit  $1 \cdot 10^6$  PFU MVA intravenös. Fünf Tage später wurden Milzzellen isoliert und ein ICS für IFN- $\gamma$  durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM.

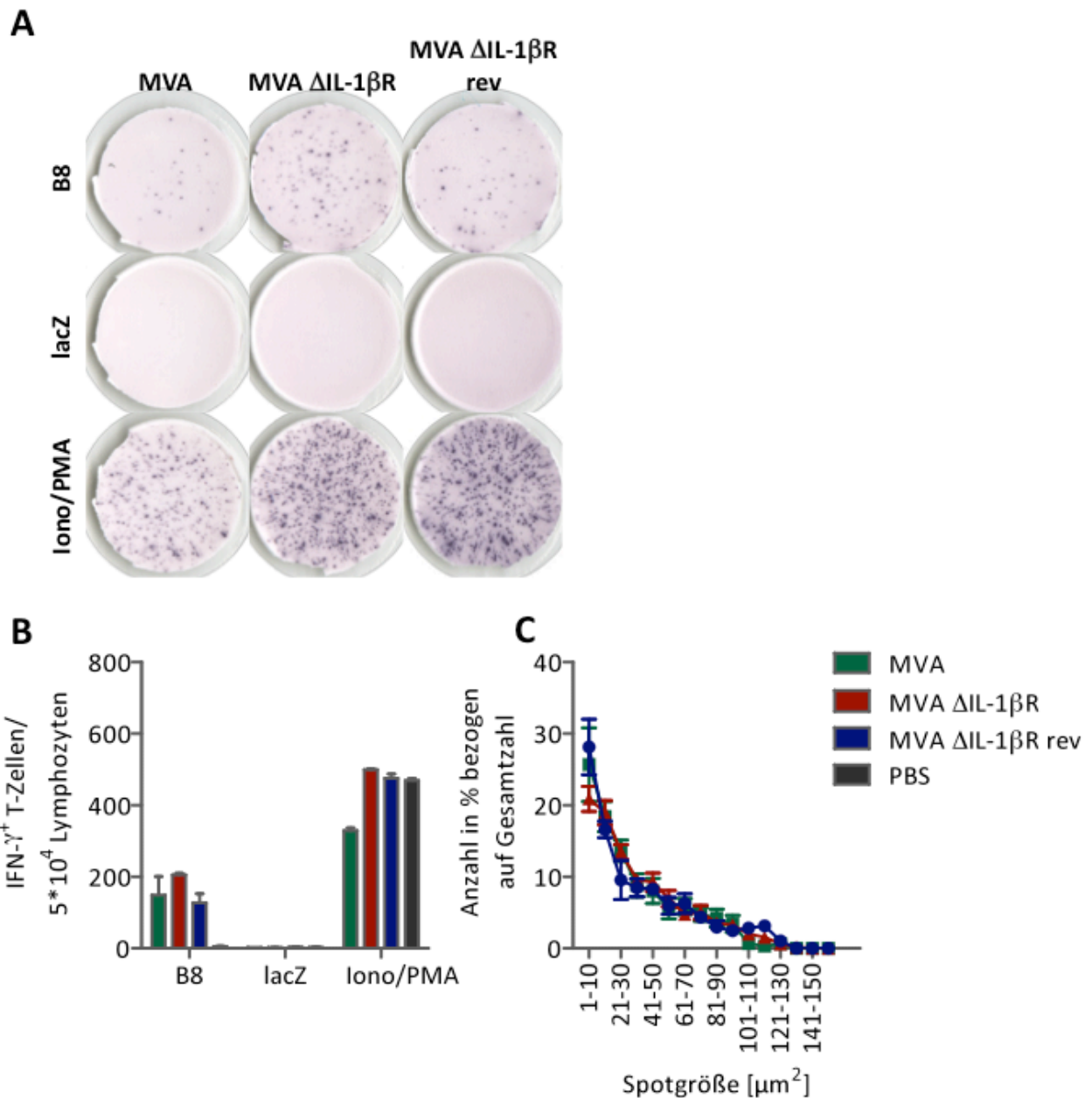
---

Die Zuordnung der Zellpopulationen erfolgte wie unter 3.4.3 dargestellt. Um den Einfluss von möglicherweise unterschiedlichen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Anteilen an der Gesamtzellpräparation auszuschließen, wurde zusätzlich eine absolute Quantifizierung vorgenommen. Relative (Abbildung 33 A) und absolute Quantifizierung (Abbildung 33 B) lieferten identische Ergebnisse und werden deshalb an dieser Stelle zusammen erläutert. MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev induzierten nahezu identische Anteile IFN- $\gamma$  sekretierender T-Zellen von etwa 3% bzw  $2,5 \cdot 10^4$  Zellen. Hierbei war die Schwankungsbreite in MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R-immunisierten Mäusen insgesamt größer, wie an der gezeigten Standardabweichung zu erkennen ist. Die Kontrollen lacZ und Iono/PMA zeigten das erwartete negative bzw. positive Ergebnis. Da keine wesentlichen Unterschiede in der Anzahl zytotoxischer T-Zellen beobachtet wurden, wurde nachfolgend auch noch die sekretierte Menge IFN- $\gamma$  pro Zelle durch ELISPOT bestimmt.



**Abbildung 34: ELISPOT IFN- $\gamma$  sekretierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Milzen nach Immunisierung von B6-Mäusen mit MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev.** B6-Mäuse wurden mit PBS,  $1 \cdot 10^6$  PFU MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev intravenös immunisiert. Nach 4 Monaten erfolgte ein zweite Immunisierung mit  $1 \cdot 10^6$  PFU MVA intravenös. Fünf Tage später wurden Milzzellen isoliert und ein ELISPOT für IFN- $\gamma$  durchgeführt. (A) Darstellung eines exemplarischen Ergebnisses, (B) graphische Darstellung der Gesamt-Spotzahlen, (C) graphische Darstellung der Spotgrößen. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM.

In Abbildung 34 A ist ein exemplarisches Ergebnis für die Analyse aus Milzzellen dargestellt. Rein visuell scheinen die Spots bei Zellen aus MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R-immunisierten Mäusen mehr und etwas größer zu sein. Der Unterschied, wenn auch geringfügig, konnte durch quantitative Auswertung aller Proben (Abbildung 34 B) bestätigt werden. In der grafischen Auswertung der Spotgröße ließen sich jedoch die beobachteten Unterschiede nicht wiederfinden (Abbildung 34 C).



**Abbildung 35: ELISPOT IFN- $\gamma$  sekretierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Blut nach Immunisierung von B6-Mäusen mit MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev.** B6-Mäuse wurden mit PBS,  $1 \cdot 10^6$  PFU MVA, MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev intravenös immunisiert. Nach 4 Monaten erfolgte eine zweite Immunisierung mit  $1 \cdot 10^6$  PFU MVA intravenös. Fünf Tage später wurden Blutzellen isoliert und ein ELISPOT für IFN- $\gamma$  durchgeführt. (A) Darstellung eines exemplarischen Ergebnisses, (B) graphische Darstellung der Gesamt-Spotzahlen, (C) graphische Darstellung der Spotgrößen. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM.

Auch für Zellen aus Blut ließ sich visuell bei einzelnen Tieren ein Unterschied in Quantität und Größe der Spots erkennen (Abbildung 35 A). Dieser Unterschied bestätigte sich nach grafischer Auswertung aller Proben hinsichtlich Anzahl (Abbildung 35 B), jedoch nicht hinsichtlich der sekretierten Menge IFN- $\gamma$  pro einzelner Zelle. Insgesamt gesehen lieferte die ELISPOT-Analyse von spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Blut und Milz dennoch erste Hinweise auf



---

Unterschiede nach Immunisierung mit MVA bzw. MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R, sowohl bezüglich Spotanzahl als auch Spotgröße.

---

## 4. DISKUSSION

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R sich in seinen immunologischen Eigenschaften deutlich von wildtypischem MVA unterscheidet. Wichtig ist, dabei festzuhalten, dass die Deletionsmutante in Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten keinerlei Wachstumsdefizienz aufweist (siehe Abbildung 11, Alcamì und Smith, 1992, Staib *et al.*, 2005) und über das erwartete Proteinexpressionsmuster verfügt (siehe Abbildung 10 und Abbildung 12). Darüber hinaus ist die Avirulenz von MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R auch nach intravenöser Applikation nach wie vor gegeben. Übereinstimmend mit vorherigen Analysen, die andere Applikationswege verwendeten, wurden keine Anzeichen einer Erkrankung bei immunisierten Tieren festgestellt (Staib *et al.*, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass der Interleukin-1 $\beta$  Rezeptor von MVA die IL-1 $\beta$ -Induktion *in vitro* und *in vivo* moduliert und vorhandenes Zytokin inaktiviert. Dies ging *in vivo* mit einer veränderten CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellantwort einher.

### 4.1. Das IL-1 $\beta$ Rezeptor-Homolog von MVA bindet rekombinantes und endogenes IL-1 $\beta$

Aufgrund der Sequenzunterschiede zwischen dem IL-1 $\beta$ R aus VACV und aus MVA, wurden zunächst die Bindungseigenschaften des MVA IL-1 $\beta$ R für IL-1 $\beta$  untersucht. Sowohl nach Infektion muriner als auch humaner Zellen wurde eine Synthese des IL-1 $\beta$ R durch dessen Bindung an rekombinantes IL-1 $\beta$  nachgewiesen. In einer kinetischen Analyse wurde acht Stunden nach Infektion das Maximum der Bindungsaktivität für rekombinantes, murines IL-1 $\beta$  festgestellt, in Übereinstimmung mit der Klassifizierung des IL-1 $\beta$ R als spätes Protein (siehe Abbildung 13 und Abbildung 14). Für den VACV IL- $\beta$ R sind ebenfalls bislang Bindungsaktivitäten mit rekombinantem IL-1 $\beta$  gezeigt (Alcamì und Smith, 1992). Darüber hinaus konnte Bindungsaktivität für durch die Infektion mit MVA induziertes, endogenes IL-1 $\beta$  nachgewiesen werden (siehe Abbildung 16). Die Anlagerung des MVA IL-1 $\beta$ R an endogenes IL-1 $\beta$  wurde inzwischen durch weitere Studien bestätigt (Delaloye *et al.*, 2009). Bezüglich der Bindungsaktivität für IL-1 $\beta$  haben die Sequenzunterschiede im IL-1 $\beta$ R zwischen MVA und VACV also keinen Einfluss. Für das VACV-Protein wurden zudem bereits Bindungsaffinitäten ermittelt. Möglicherweise sind diese aufgrund der identischen Spezifität

---

und dem geringen Sequenunterschied zum VACV IL-1 $\beta$ R auf MVA IL-1 $\beta$ R übertragbar (Alcami und Smith, 1992).

#### **4.2. MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R induziert IL-1 $\beta$ nach Infektion Antigen-präsentierender und phagozytischer Zellen**

Im Gegensatz zu den geschilderten Resultaten mit MVA führte die Infektion von mDCs, BMDM und THP-1 mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R zu einer Sekretion von IL-1 $\beta$ , die jeweils 24 Stunden nach Infektion ihr Maximum erreichte. Auch die Infektion von Peritonealzellen mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R resultierte in einer Freisetzung von IL-1 $\beta$  in den Zellkulturüberstand. Die Infektion von murinen mDCs mit MVA induzierte hingegen nur eine vorübergehende Sekretion von IL-1 $\beta$ . Eine Induktion von IL-1 $\beta$  nach Infektion von murinen BMDM mit MVA wurde in keinem Fall beobachtet (siehe Abbildung 18). Dass die hier dargestellten Effekte spezifisch durch die Deletion des IL-1 $\beta$ R verursacht wurden, konnte durch die jeweiligen Ergebnisse für MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev bestätigt werden, die denen des Wildtyps entsprachen. Somit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Deletion des IL-1 $\beta$ R aus MVA die physiologische Konzentration von IL-1 $\beta$  erhöht.

Der für MVA beobachtete Befund steht im Widerspruch zu bereits publizierten Daten, laut denen 24 Stunden nach Infektion von BMDM bis zu 3ng/mL IL-1 $\beta$  im Zellkulturüberstand detektiert werden konnte (Delaloye *et al.*, 2009). Jedoch wurden in diesen Untersuchungen mit LPS vorstimulierte Zellen verwendet, was die Sekretion von IL-1 $\beta$  nach Infektion um ein vielfaches steigert. Dass das in dieser Studie verwendete Modell mit LPS ein artifizielles ist, wird ferner dadurch bestätigt, dass in der gleichen Publikation gezeigt wird, dass MVA nach Immunisierung von Balb/c-Mäusen in der Peritonealflüssigkeit lediglich 80pg/mL IL-1 $\beta$  induziert. Dieser Wert liegt weitaus näher an den in Abbildung 19 gezeigten Daten, wo MVA nach Reinfektion von Peritonealzellen eine IL-1 $\beta$ -Konzentration von etwa 10-20ng/mL hervorrief. Dies lässt vermuten, dass im murinen System die Infektion von mDCs mit MVA zu einer vermehrten IL-1 $\beta$ -Sekretion führt, während dies in Makrophagen (BMDM, Peritonealmakrophagen) kaum der Fall zu sein scheint. Ähnliches gilt für die von Delaloye *et al.*, 2009) gezeigten Daten in humanen THP-1-Zellen. Dort wurden die Zellen 24 Stunden mit 0,5mM PMA (ca.  $3 \cdot 10^8$ ng/mL) vorstimuliert und eine IL-1 $\beta$ -Sekretion nach Infektion mit MVA

---

festgestellt. Zwar wurden die Zellen in eigenen Experimenten wie in Abbildung 22 gezeigt ebenfalls mit PMA vorstimuliert, um eine IL-1 $\beta$ -Sekretion zu erhalten, allerdings mit deutlich niedrigerer Konzentration von 7,8ng/mL und lediglich für 8h. Somit wurde für MVA keine Sekretion von IL-1 $\beta$  in humanen THP-1-Zellen nachgewiesen, da induziertes IL-1 $\beta$  sehr wahrscheinlich durch den viralen Rezeptor abgefangen wurde.

Um die genauen Mechanismen der Induktion von IL-1 $\beta$  durch MVA und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R zu analysieren wurden zusätzlich zu wildtypischen mDC und BMDM auch Zellen aus Mäusen mit verschiedenen Defizienzen im IL-1 $\beta$ -Induktionsweg verwendet. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde publiziert, dass das NLRP3-Inflammasom und auch TLR2-TLR6-Komplexe, deren Signalweiterleitung über MyD88 läuft, an der Erkennung von MVA beteiligt sind (Delaloye *et al.*, 2009). Auf Grundlage dieser Vorinformationen wurden Zellen aus MyD88<sup>-/-</sup>, MyD88<sup>-/-</sup> Trif<sup>-/-</sup> und Casp-1<sup>-/-</sup>-Mäusen verwendet. mDC aus allen drei Deletionsmutanten zeigten nach Infektion mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R eine deutlich reduzierte Sekretion von IL-1 $\beta$ , die in MyD88<sup>-/-</sup> und MyD88<sup>-/-</sup>Trif<sup>-/-</sup>-Zellen stärker als in Casp-1<sup>-/-</sup>-Zellen ausgeprägt war (siehe Abbildung 17). Folglich tragen sowohl die MyD88-Signaltransduktion nach TLR-Aktivierung als auch Caspase-1 als Bestandteil des NLRP3-Inflammasoms zur Sekretion von IL-1 $\beta$  nach Infektion mit MVA bzw. MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R bei. Die verbliebene Sekretion von IL-1 $\beta$  in Casp-1<sup>-/-</sup>-Zellen erklärt sich eventuell dadurch, dass die Zelle weitere Mechanismen zur Produktion von reifem IL-1 $\beta$  besitzt, beispielsweise weitere Proteasen (Mayer-Barber *et al.*, 2010; Stehlik, 2009). Auch in BMDM war die Sekretion von IL-1 $\beta$  nach Infektion mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R in MyD88<sup>-/-</sup>Trif<sup>-/-</sup> und Casp-1<sup>-/-</sup>-Deletionsmutanten reduziert. Die vergleichsweise schwache Ausprägung des Effekts in Casp-1<sup>-/-</sup>-Zellen ist möglicherweise ebenfalls auf alternative IL-1 $\beta$ -Prozessierungswege zurückzuführen. Weitere Hinweise auf eine Beteiligung von Inflammasomen und damit auch Caspase-1 an der Induktion von IL-1 $\beta$  durch MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R lieferte der Befund, dass die Herunterregulation von ASC als Komponente des NLRP3-Inflammasoms in humanen Zellen dazu führte, dass nur noch eine sehr geringe Menge IL-1 $\beta$  nach Infektion mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R detektiert werden konnte (siehe Abbildung 22). Zudem sind sowohl Caspase-1, als auch ASC zusätzlich Bestandteile des kürzlich entdeckten AIM2-Inflammasoms (Burckstummer *et al.*, 2009; Fernandes-Alnemri *et al.*, 2009; Hornung *et al.*, 2009). Die oben geschilderten Daten könnten also auch auf eine zusätzliche Beteiligung des AIM2-Inflammasoms hindeuten. In der Tat wurde dies zwischenzeitlich bereits für VACV gezeigt (Hornung *et al.*, 2009; Rathinam *et al.*, 2010) und es existiert die Hypothese, dass das

---

NLRP3-Inflammasom vorwiegend vakziniavirale RNA erkennt, während das AIM2-Inflammasom eher für die DNA-Erkennung zuständig ist (Kanneganti, 2010). Möglicherweise ist die Induktion von IL-1 $\beta$  durch MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R also sowohl durch das NLRP3-Inflammasom als auch durch das AIM2-Inflammasom bedingt.

Über die Bedeutung von IL-1 $\beta$  im Kontext vakziniaviraler Infektion ist nach heutigem Kenntnisstand verhältnismäßig wenig bekannt. Allerdings existieren Berichte, dass IL-1 $\beta$  die Reifung von dendritischen Zellen beeinflusst (Guo *et al.*, 2003). In der gleichen Studie wird gezeigt, dass die Depletion von IL-1 $\beta$  mittels neutralisierender Antikörper die Reifung der dendritischen Zellen inhibiert. Somit könnte der virale IL-1 $\beta$ R die Reifung dendritischer Zellen in gleicher Art und Weise beeinflussen. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass IL-1 $\beta$  in der Lage ist, die Expression von MHC-Molekülen zu beeinflussen und somit zu einer verbesserten Antigenpräsentation beizutragen (Chang *et al.*, 1994, Vassiliadis *et al.*, 1997). Abbildung 36 zeigt ein Modell der möglichen Vorgänge nach Infektion von dendritischen Zellen mit MVA und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R im Vergleich. MVA tritt in die Zelle ein (1) und die virale DNA-Replikation und Transkription setzen ein (2). Die mRNA für den viralen IL-1 $\beta$ R wird translatiert und das reife Protein sekretiert (3). Gleichzeitig wird MVA durch die Zelle erkannt, was zu einer Aktivierung von MyD88 führt (4). Dieses bewirkt mittelbar die Translokation von NF $\kappa$ B in den Nukleus und die Transkription proinflammatorischer Zytokine, unter anderem auch pro-IL-1 $\beta$  (5). Virale RNA wird durch das NLRP3-Inflammasom (7) und virale DNA durch das AIM2-Inflammasom (6) erkannt. Beides führt zur Freisetzung von aktiver Caspase-1 (8). Diese überführt in der Zelle vorhandenes pro-IL-1 $\beta$  in die reife Form (9), woraufhin aktives IL-1 $\beta$  sekretiert wird. Dieses kann entweder durch den viralen IL-1 $\beta$ R neutralisiert werden (10), oder an den zellulären IL-1RI der gleichen Zelle oder einer Nachbarzelle binden (11). Die Rezeptorbindung führt MyD88-vermittelt zur Transkription der pro-IL-1 $\beta$  mRNA (12). Des Weiteren wird die Expression von MHC-Molekülen induziert (13). Zusammenfassend wird nach Infektion von dendritischen Zellen mit MVA IL-1 $\beta$  induziert, wovon jedoch vergleichsweise viel durch den viralen IL-1 $\beta$ R neutralisiert wird. In der Folge wird die Transkription von pro-IL-1 $\beta$  und MHC kaum stimuliert. Im Gegensatz hierzu wird das durch Infektion mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R induzierte IL-1 $\beta$  nicht abgefangen, so dass Transkription und Translation von IL-1 $\beta$  stimuliert werden. Zusätzlich befinden sich auf der Zelloberfläche vermutlich mehr MHC-Moleküle, was zu einer verbesserten Antigenpräsentation führen kann. In künftigen Experimenten könnte diese Hypothese durch die vergleichende

---

Bestimmung der Transkriptmenge von pro-IL-1 $\beta$ -, sowie MHC-Klasse I und II-Molekülen nach Infektion MVA bzw. MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R überprüft werden. Zusätzlich ist eine Expressionsanalyse für MHCs denkbar.

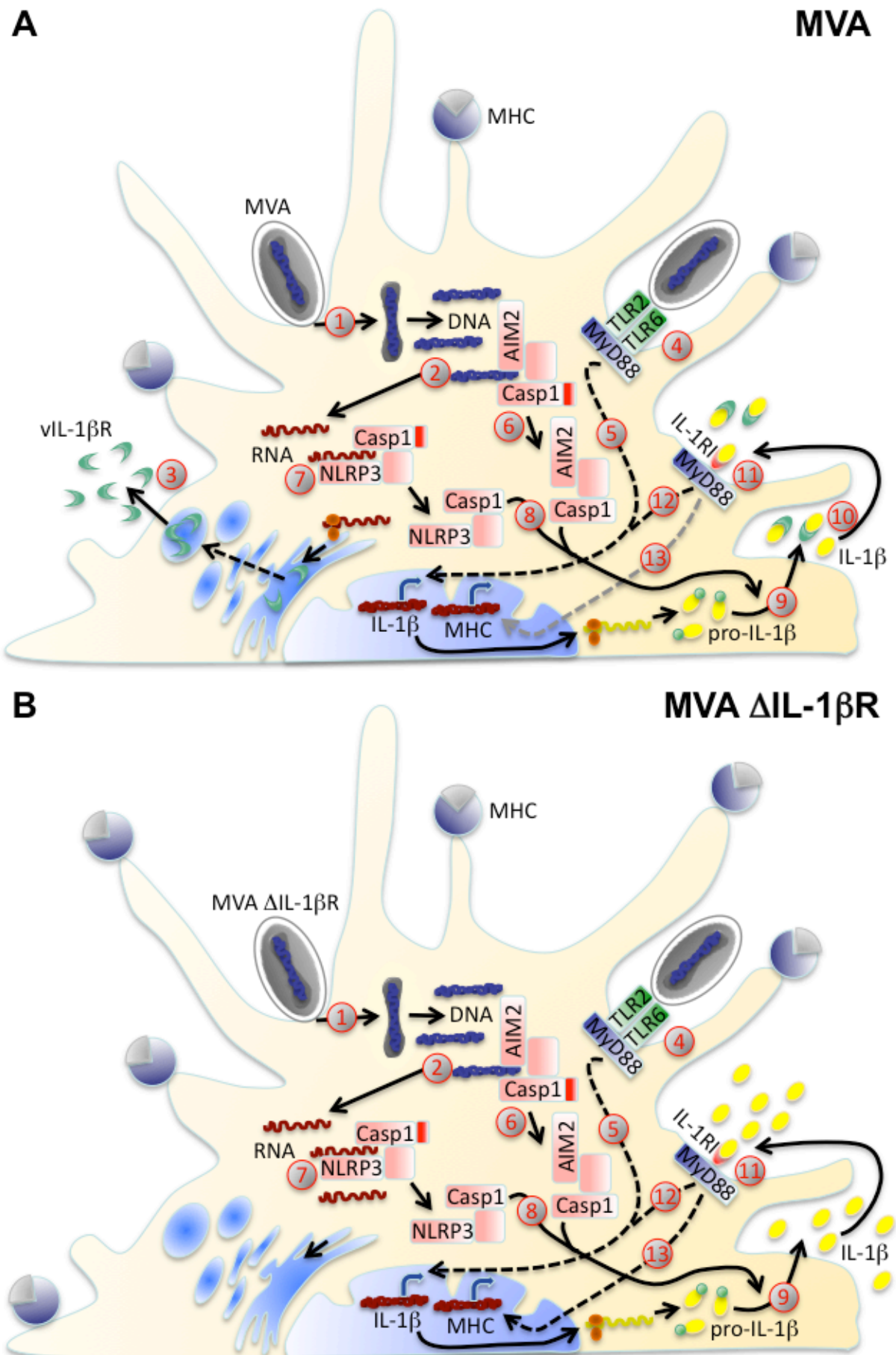


Abbildung 36: Vergleichendes Modell der Vorgänge in dendritischen Zellen nach Infektion mit (A) MVA und (B) MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R. Nähere Erläuterungen zur Abbildung im Text.

---

### 4.3. Die Induktion von IL-1 $\beta$ durch MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R hat keinen Einfluss auf die Sekretion weiterer proinflammatorischer Zytokine

Um die Mechanismen, die aufgrund der vermehrten IL-1 $\beta$ -Induktion durch MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R zu der beschriebenen Verbesserung der Gedächtnis-T-Zellantwort führen zu klären, wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* weitere Zytokine analysiert. Da IL-1 $\beta$  *in vivo* nicht nachweisbar war, war diese Vorgehensweise eine weitere Möglichkeit, IL-1 $\beta$  indirekt nachzuweisen (siehe Abbildung 23). Ein geeignetes Zytokin für den indirekten Nachweis von IL-1 $\beta$  ist IL-6, da bereits wenige Pikogramm IL-1 $\beta$  genügen, um IL-6-Konzentrationen im Nanogramm-Bereich zu induzieren (Dinarello, 2010; Janeway, 2005). In der Tat konnten 24 Stunden nach Infektion von mDCs bis zu 1500pg/mL IL-6 im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden (siehe Abbildung 20). Darüber hinaus konnte trotz der Tatsache, dass IL-1 $\beta$  nicht im Serum von immunisierten Mäusen nachweisbar war, in den gleichen Seren bereits 6 Stunden nach Immunisierung über 5000pg/mL IL-6 detektiert werden (siehe Abbildung 24). Somit wurde die Induktion von IL-1 $\beta$  sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* durch Analyse von IL-6 indirekt bestätigt. Allerdings wurden lediglich geringe Unterschiede zwischen MVA und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R beobachtet, d.h. die erhöhte IL-1 $\beta$ -Konzentration nach Infektion/Immunisierung mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R resultierte nicht in einer erhöhten Konzentration von IL-6. Die gemessene Konzentration von IL-6 war nach Behandlung mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R sogar leicht geringer als für MVA. Möglicherweise existieren für IL-6 Feedback-Mechanismen, die für diese Beobachtung verantwortlich gemacht werden können. Des Weiteren zeigen kürzlich publizierte Analysen die Induktion weiterer Zytokine nach Infektion mit MVA. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei dieser Zytokine analysiert, um festzustellen, ob die veränderte IL-1 $\beta$ -Konzentration nach Deletion des IL-1 $\beta$ R einen Effekt auf diese Induktion ausübt. Zum Einen erfolgte die Bestimmung von MCP-1, dessen Expression nach Infektion mehr als zehnfach ansteigt und zum Anderen wurde MIP-1 $\beta$  analysiert, das ebenfalls durch MVA induziert wird (Lehmann *et al.*, 2009). Letzteres ist insbesondere im Zusammenhang mit den bereits veröffentlichten Vordaten zur verbesserten Gedächtnis-Immunantwort nach Immunisierung mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R interessant (Staub *et al.*, 2005), da die Sekretion von MIP-1 $\beta$  vermehrt durch CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen erfolgt (Walker und Slifka, 2010). Beide Zytokine wurden nach Infektion von mDC mit MVA und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R gleichermaßen induziert. MCP-1 in vergleichbarer Menge, zu bereits publizierten Daten und



---

MIP-1 $\beta$  in einer Konzentration von etwa 1500pg/mL 24 Stunden nach Infektion im Zellkulturüberstand. Jedoch scheint die Deletion des IL-1 $\beta$ R hier keinen Einfluss zu haben. Nach Infektion mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R wurden sogar geringere Mengen MIP-1 $\beta$  festgestellt. Im Hinblick auf die Gedächtnis-Immunantwort erfolgte außerdem die Bestimmung der Konzentration von IL-7 und IL-15. IL-7, IL-15 sowie IL-2 binden an zelluläre Rezeptoren des  $\gamma$ -Zytokinrezeptorentyps. Die Verwendung dieser Rezeptorklasse tritt gehäuft bei Zytokinen auf, die die T-Zellantwort regulieren und für Proliferation, Homöostase und die Bildung von Gedächtnis-T-Zellen verantwortlich sind (Ma *et al.*, 2006). Der Einfluss von IL-2 auf die Proliferation von T-Zellen ist inzwischen sehr gut untersucht und beschrieben (Janeway, 2005), während die Funktion von IL-7 und IL-15 weiterhin Gegenstand aktueller Forschung ist. IL-7 wird von Knochenmarks-, Milz-, Thymus- und epidermalen Keratinozytenzellen, jedoch nicht von T-Zellen sekretiert (Costello *et al.*, 1993; Dalloul *et al.*, 1992; Murray *et al.*, 1989; Sakata *et al.*, 1990; Wolf und Cohen, 1992). Mehrere Studien zeigen einen Einfluss auf die Differenzierung zu und die Homöostase von Gedächtnis-T-Zellen (Nanjappa *et al.*, 2008; Osborne *et al.*, 2007; Schluns *et al.*, 2000; Schluns und Lefrancois, 2003; Surh *et al.*, 2006). IL-7 wird eine Schlüsselfunktion in der Homöostase peripherer T-Zellen zugeschrieben (Fry und Mackall, 2002). IL-15 wird vorwiegend von Monozyten und Makrophagen produziert und ist in den meisten Fällen sogar in der Lage, IL-2 funktionell zu ersetzen (Carson und Caligiuri, 1998; Doherty *et al.*, 1996). Mehrere Studien belegen einen entscheidenden Einfluss auf die Bildung und Homöostase von Gedächtnis-T-Zellen (Liu *et al.*, 2002; Lodolce *et al.*, 2002a; Lodolce *et al.*, 2002b). Aufgrund dieser Daten und der von Staib *et al.*, 2005) beobachteten Effekte wurde die Induktion von IL-7 und IL-15 nach Immunisierung von Mäusen mit MVA und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R untersucht. Beide Zytokine konnten im Serum detektiert werden, jedoch lagen die gemessenen Werte unter den jeweiligen Nachweisgrenzen der ELISA-Assays (siehe Abbildung 24). Möglicherweise könnte hier die Analyse von IL-7 und IL-15 zu späteren Zeitpunkten und in verschiedenen Geweben weiteren Aufschluss geben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zudem untersucht, ob weitere proinflammatorische Zytokine nach Infektion/Immunisierung mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R differentiell im Vergleich zu MVA reguliert sind. Jedoch konnte mittels der durchgeführten Multiplex- und Membranarray-Analysen kein untersuchtes Zytokin als Kandidat für solch eine differentielle Regulation identifiziert werden. Entweder die betreffenden Zytokine waren nicht durch die verwendeten Methoden

---

abgedeckt d.h. andere als die untersuchten Zytokine oder Chemokine spielen eine Rolle oder aber die Deletion des MVA IL-1 $\beta$ R übt unmittelbar einen Einfluss auf die T-Zellantwort aus.

#### **4.4. Die Deletion des MVA IL-1 $\beta$ Rezeptors beeinflusst die Gedächtnis-T-Zellantwort nach Immunisierung von Mäusen**

In einem ersten Experiment zur T-Zellantwort nach Immunisierung von Mäusen mit MVA bzw. MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R sollte herausgefunden werden, bei welcher Immunisierungsdosis eventuell auftretende Unterschiede am deutlichsten erkennbar sind und ob eine intravenöse Virusapplikation zu anderen Ergebnissen führt als bereits publiziert (Staib *et al.*, 2005). Die genannte Studie mit C57BL/6N-Mäusen so dass für die Analyse der T-Zellantworten in der vorliegenden Arbeit ebenfalls C57BL/6N-Mäuse verwendet wurden. Da bei geringeren Virusdosierungen Verteilungseffekte die induzierte Immunantwort stark beeinflussen können, wurde das Virus i.v. und nicht i.p. appliziert. Zudem stellte die i.v.-Applikation im verwendeten Modell für die kinetische Analyse der T-Zellantwort die etablierte Methode dar. Die Gedächtnis-T-Zellantwort wurde bereits 3 Monate nach der Immunisierung analysiert. Die Restimulation in der Gedächtnisphase erfolgte *in vivo* durch eine zweite Immunisierung und eine möglichst starke Expansion und Aktivierung der gebildeten T-Zellen zu erreichen und somit deren Nachweis zu erleichtern. Bereits eine verabreichte Dosis von  $10^5$  PFU führte zur Induktion einer robusten Gedächtnis-T-Zellantwort, die durch den intrazellulären Nachweis von IFN- $\gamma$  in MVA-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 26). Darüber hinaus war die Gedächtnis-T-Zellantwort in MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R-immunisierten Tieren etwa 2-3 Mal höher als in MVA-immunisierten Tieren. Somit konnten in diesem Experiment die Daten von Staib *et al.*, 2005) bestätigt werden und es wurde der Nachweis erbracht, dass MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R bereits in geringen Dosen in der Lage ist, im Vergleich zu MVA erhöhte Gedächtnis-T-Zellantworten hervorzurufen. Um diese Daten zu erweitern und zu vertiefen wurde mittels MHC-Klasse I-Pentameren eine Kinetik der spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort im Blut von immunisierten Mäusen erstellt. Im Gegensatz zu den Daten aus der Dosisfindungsstudie (Abbildung 26) konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen MVA und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R nachgewiesen werden. In der akuten Phase der Immunantwort lag diese für MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R sogar leicht unter der für MVA, während sich in der Gedächtnisphase beide Virusvarianten identisch verhielten (Abbildung 27). Dieser

---

Befund war unabhängig davon, ob alle spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen oder lediglich die aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen analysiert wurden (Abbildung 28). Ebenso zeigte die vergleichende Analyse von Blut und Milz keinerlei Unterschiede (Abbildung 29). Eine Wiederholung des Versuches aus Abbildung 26 unter Verwendung größerer Versuchsgruppen und einer Dosis von 10<sup>6</sup> PFU Virus zeigte, dass der Unterschied zwischen MVA und MVA ΔIL-1βR wesentlich geringer war und lediglich einzelne Tiere eine verbesserte Gedächtnis-T-Zellantwort aufwiesen. Ein Grund hierfür können zum einen technische Schwierigkeiten bei der Durchführung des ICS sein, es ist aber auch möglich, dass die Anzahl der T-Zellen tatsächlich ähnlich ist, die produzierte Menge IFN-γ pro Zelle im Falle von MVA ΔIL-1βR aber größer ist. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde die Sekretion von IFN-γ durch spezifische T-Zellen in der Gedächtnisphase in Blut und Milz mittels ELISPOT analysiert. Die erhöhte Produktion von IFN-γ in MVA ΔIL-1βR-immunisierten Tieren konnte bestätigt werden, wenn auch die Unterschiede vergleichsweise gering ausfielen (siehe Abbildung 34 B und Abbildung 35 B). Zusätzlich waren bei einigen MVA ΔIL-1βR-immunisierten Tieren makroskopisch größere Spots zu erkennen, was eine erhöhte Sekretion von IFN-γ pro Zelle bedeutet (siehe Abbildung 34 A und Abbildung 35 A). Statistisch signifikant war dieser Unterschied jedoch nicht, wie Abbildung 34 C und Abbildung 35 C zeigen. Eine vermehrte Bildung von IFN-γ pro Zelle könnte auf einen Einfluss des durch MVA ΔIL-1βR induzierten IL-1β auf die Zytotoxizität und somit auf die Leistungsfähigkeit der spezifischen T-Zellen hindeuten. Insgesamt muss weiterhin von einer verbesserten Gedächtnis-T-Zellantwort nach Immunisierung mit MVA ΔIL-1βR ausgegangen werden, da in der vorliegenden Arbeit entweder gleichwertige oder bessere Gedächtnis-T-Zellantworten gefunden wurden und die Daten durch die Studien von Staib *et al.*, 2005) und Cottingham *et al.*, 2008) unterstützt werden. Somit stellt sich die Frage, wie die verbesserte Gedächtnis-T-Zellantwort zustande kommt. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurde zunächst die Anzahl der spezifischen CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen bestimmt. Diese war sowohl bei MVA als auch MVA ΔIL-1βR auf hohem Niveau, allerdings kaum unterschiedlich zwischen den beiden Virusvarianten (siehe Abbildung 30). Unter dem Aspekt, dass CD4<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung einer langlebigen Pockenimmunität einnehmen (Amara *et al.*, 2004), wurde zusätzlich die CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation analysiert. Allerdings war die Analyse spezifischer CD4<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen nicht möglich, da bisher keine etablierte Nachweismethode hierfür existiert. Somit beschränkte sich die Analyse auf die Gesamtzahl, bei der allerdings keine

---

Unterschiede zwischen MVA und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R festgestellt wurden (siehe Abbildung 31). Ein weiterer, möglicher Einflussfaktor auf die Anzahl der Gedächtnis-T-Zellen im Kontext viraler Infektionen ist die Apoptose von Gedächtnis-T-Zellen (Bahl *et al.*, 2010). Die Analyse der Apoptoserate spezifischer CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen erfolgte mittels aktiver Caspase-3-Färbung. Insgesamt waren die detektierten Apoptoseraten sehr gering und zwischen den Virusvarianten nahezu identisch (siehe Abbildung 32). Offenbar liegen der verbesserten CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort nach Immunisierung mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R also andere Mechanismen zu Grunde. Wie bereits unter 4.2 dargestellt, besteht die Möglichkeit, dass die vermehrte Sekretion von IL-1 $\beta$  zu einer Hochregulation von MHC-Molekülen in antigenpräsentierenden Zellen und in der Folge zu einer gesteigerten Antigenpräsentation führt. In der Tat wurde bereits gezeigt, dass Ausmaß und Zeitpunkt der Stimulation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen einen entscheidenden Einfluss auf die Bildung einer VACV-spezifischen Gedächtnis-T-Zellpopulation haben (Quigley *et al.*, 2007). Dies gilt insbesondere, da Effektor-T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen zeitgleich in der Akutphase der Infektion und nicht sequentiell angelegt werden (Laouar *et al.*, 2008). Entscheidend ist jedoch auch, dass die gebildeten Gedächtnis-T-Zellen weiterhin überleben. Die hierzu notwendige Stimulation erfolgt durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Amara *et al.*, 2004). Als Mediator dieser Stimulation wurde kürzlich das Zytokin IL-21 vorgeschlagen (Novy *et al.*, 2011), das in T-Zellen durch IL-1 $\beta$  induzierbar ist (Sutton *et al.*, 2009). Hinzu kommt, dass aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu naiven Zellen größere Mengen des Typ I IL-1R exprimieren und somit empfindlicher für IL-1 $\beta$  sind (Luqman *et al.*, 1992). Zudem wirkt IL-1 $\beta$  als positiver Regulator von Expansion und Differenzierung auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Ben-Sasson *et al.*, 2009). Abbildung 37 zeigt ein vergleichendes Modell zur T-Zellantwort nach Immunisierung mit MVA bzw. MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R. Zunächst erfolgt die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen (1) und CD4<sup>+</sup> T-Zellen (2) durch antigenpräsentierende Zellen. Die Aktivierung hat die Differenzierung der naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu zytotoxischen Effektor-T-Zellen (3) und zeitgleich zu Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (4) zur Folge. Aufgrund einer möglichen, besseren Antigenpräsentation und daraus resultierender, stärkerer Stimulation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen wird nach Immunisierung mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R ein größerer Pool Effektor-Gedächtnis-T-Zellen gebildet. Naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen differenzieren ebenfalls zu Effektor T-Zellen (5). Die vermehrte Bildung von IL-1 $\beta$  nach Immunisierung mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R (6) induziert die Sekretion von IL-21 in den aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen (7). Das produzierte IL-21 wirkt sich positiv auf das Überleben der CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen aus (8). Erfolgt nun eine Restimulation in der

---

Gedächtnisphase der Immunantwort (9), wird in MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R immunisierten Tieren eine stärkere Reaktion ausgelöst, als in MVA immunisierten Tieren (10). Zusammenfassend bewirkt die vermehrte Bildung von IL-1 $\beta$  nach Immunisierung mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R also vermutlich eine verbesserte Antigenpräsentation, die direkt einen Einfluss auf die CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellpopulation hat. Zusätzlich könnte die Einwirkung von IL-1 $\beta$  auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen deren Expansion und die Sekretion von IL-21 bewirken, welches sich positiv auf das Überleben der CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellpopulation auswirkt. Künftige Untersuchungen könnten diese Annahmen durch Bestimmung der IL-21-Konzentration und die Identifizierung und Anwendung geeigneter CD4<sup>+</sup>-Epitope für die MHC-Multimeranalysen Nach Immunisierung mit MVA bzw. MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R überprüfen.

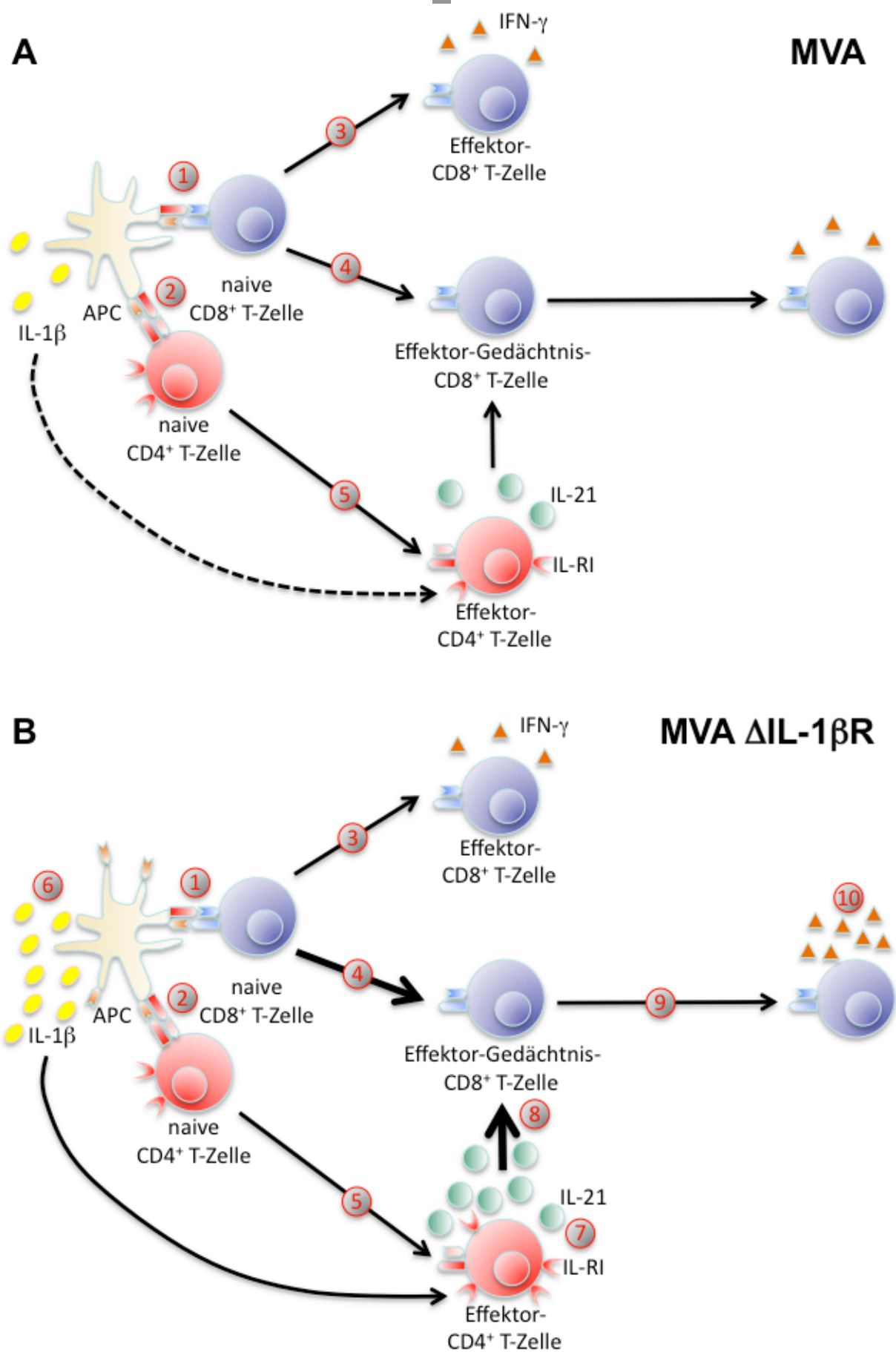


Abbildung 37: Vergleichendes Modell zur T-Zellantwort nach Immunisierung mit (A) MVA bzw. (B) MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R. Nähere Erläuterungen im Text.

---

#### 4.5. Eignung von MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R als Impfstoff

Prinzipiell wäre durch die Deletion des IL-1 $\beta$ R von MVA denkbar gewesen, dass nach Immunisierung IL-1 $\beta$  systemisch auftritt, was zu Inflammation und Fieber hätte führen können. IL-1 $\beta$  war jedoch systemisch nicht nachweisbar und es traten keine Anzeichen von Krankheit nach der Immunisierung auf. Offenbar bleibt die Freisetzung von IL-1 $\beta$  nach Immunisierung mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R lokal begrenzt und führt zu einer Adjuvanz-ähnlichen Wirkung. Eine solche Wirkung wurde bereits unter Verwendung von rekombinantem IL-1 $\beta$  bei der Verabreichung von Influenza-Vakzinen beobachtet (Kayamuro *et al.*, 2010). Den Vorteil der Deletion des IL-1 $\beta$ R für MVA-Vakzine belegt des Weiteren die Tatsache, dass die Deletionsmutante besser gegen eine letale Infektion mit VACV Western Reserve schützt (Staib *et al.*, 2005). Jedoch sollte die Deletion des IL-1 $\beta$ R auch für die Verwendung von MVA als Vektorimpfstoff ernsthaft in Betracht gezogen werden. In einer aktuellen Studie wurde der IL-1 $\beta$ R zusammen mit dem Immunmodulator A41L in einem MVA-basierten HIV-1 Impfstoff deletiert. Dies führte zu einer signifikanten Verbesserung der HIV-spezifischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten (Garcia-Arriaza *et al.*, 2010). MVA-Vektorvakzine werden bereits jetzt schon gegen eine Vielzahl von Erkrankungen präklinisch und klinisch erfolgreich erprobt. Allerdings haben einige dieser Studien auch enttäuschende Resultate geliefert (Gomez *et al.*, 2008). Deshalb könnte für die Zukunft die Verwendung von MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R als Basis von Vektorvakzinen eine gangbare Alternative sein, um die Immunantwort gegen das verabreichte Antigen weiter zu verbessern, indem durch die Induktion einer begrenzten, inflammatorischen Zytokinproduktion die adaptive Immunantwort positiv beeinflusst wird. Gegebenenfalls könnten zusätzliche Immunmodulatoren deletiert und die resultierende Immunantwort mittels eines eingebrachten Modellantigens analysiert werden. Somit würden weitere Grundlagen für eine künftige Verwendung von MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R als Vektorimpfstoff geschaffen.

---

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

MVA ist ein attenuiertes Vakziniavirus, das durch wiederholte Passagierung von Chorioallantoisvirus Ankara auf Hühnerembryofibroblasten gewonnen wurde. Es ist bis auf wenige Ausnahmen nicht mehr in der Lage, in Säugerzellen zu replizieren, zeigt aber dennoch eine vollständige virale Proteinexpression und induziert nach Immunisierung eine zu VACV vergleichbare Immunantwort. Aus diesem Grund wurde es bereits als Impfstoff gegen die menschliche Pockenerkrankung eingesetzt, ohne hierbei die bei den klassischen Impfviren beobachtbaren Nebenwirkungen hervorzurufen. Das Genom von MVA enthält jedoch noch Immunmodulatoren, deren Deletion Ansatzpunkt für die weitere Verbesserung des Impfstoffes sein kann. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Deletionsmutante untersucht, bei der das Gen für den Interleukin-1 $\beta$  Rezeptor (IL-1 $\beta$ R) deletiert ist (MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R). Es konnte nachgewiesen werden, dass der IL-1 $\beta$ R in murinen als auch in humanen Zellen exprimiertes IL-1 $\beta$  bindet und somit inaktiviert. Des Weiteren wurde gefunden, dass MVA in der Lage ist, IL-1 $\beta$  in antigenpräsentierenden Zellen zu induzieren, welches aber durch die Neutralisierung aufgrund des IL-1 $\beta$ R nur transient nachzuweisen war. Im Gegensatz dazu induzierte MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R eine anhaltende und um ein Vielfaches erhöhte Sekretion an IL-1 $\beta$ . Untersuchungen in antigenpräsentierenden Zellen aus *knock-out* Mäusen, die verschiedene Defizienzen in den Signalwegen zur IL-1 $\beta$ -Induktion trugen, zeigten, dass die Sekretion von IL-1 $\beta$  von Caspase-1 abhängig war, welches wahrscheinlich aus der vorgeschalteten Aktivierung der NLRP3- und/oder AIM2-Inflammasomen resultierte. Interessanterweise wurden auch Caspase-1 unabhängige Mechanismen beobachtet, die auf eine Inflammasom-unabhängige IL-1 $\beta$ -Induktion hinweisen könnten. In Bezug auf die Immunaktivierung führte die vermehrte Sekretion von IL-1 $\beta$  durch MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R vermutlich zu einer verbesserten Antigenpräsentation, die die nachfolgende T-Zellantwort beeinflusste. In Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Daten wurde nach Immunisierung mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R eine effektivere Gedächtnis-T-Zellantwort festgestellt, deren Charakteristika und zu Grunde liegenden Mechanismen hier untersucht wurden. Jedoch konnten weder Unterschiede in weiteren pro-inflammatorischen Zytokinmustern noch im Verlauf insbesondere der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Aktivierung und -erhaltung zwischen MVA und MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R beobachtet werden. Als mögliche weitere Ursache für die veränderte Gedächtnis-T-



Zellantwort könnte daher eine vermehrte Stimulation durch antigenpräsentierende Zellen und eine IL-21-vermittelte bessere Unterstützungsfunktion der CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Frage kommen. Zusammenfassend konnten hier neue molekulare Mechanismen, die zur Induktion von IL-1 $\beta$  nach einer MVA-Infektion führen, aufgedeckt werden. Darüber hinaus existieren bereits erste Hinweise auf einen Vorteil der Deletion des IL-1 $\beta$ R für MVA-basierte Vektorimpfstoffe. Die vorliegende Arbeit hat weitere Daten erhoben, die das Erzielen verbesserter Immunantworten nach Immunisierung mit MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R unterstützen, woraus sich neue Ansätze für die Entwicklung MVA-basierter Impfstoffe ergeben könnten.

---

## 6. LITERATURANGABEN

- 1 (2010). Roche Lab FAQ. P. Labaere, D. Eisel, U.W. Hoffmann-Rohrer, B. Kruchen, A. Plaschke-Schlütter, und H. Steffen, eds.
- 2 Acres, B., und Bonnefoy, J.Y. (2008). Clinical development of MVA-based therapeutic cancer vaccines. *Expert.Rev.Vaccines*. 7, 889-893.
- 3 Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K., und Akira, S. (1998). Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity*. 9, 143-150.
- 4 Alcami, A., und Smith, G.L. (1992). A soluble receptor for interleukin-1 beta encoded by vaccinia virus: a novel mechanism of virus modulation of the host response to infection. *Cell* 71, 153-167.
- 5 Alcami, A., und Smith, G.L. (1996). A mechanism for the inhibition of fever by a virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11029-11034.
- 6 Altenburger, W., Suter, C.P., und Altenburger, J. (1989). Partial deletion of the human host range gene in the attenuated vaccinia virus MVA. *Arch.Virol*. 105, 15-27.
- 7 Amara, R.R., Nigam, P., Sharma, S., Liu, J., und Bostik, V. (2004). Long-lived poxvirus immunity, robust CD4 help, and better persistence of CD4 than CD8 T cells. *J Virol* 78, 3811-3816.
- 8 Antoine, G., Scheiflinger, F., Dorner, F., und Falkner, F.G. (1998). The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology* 244, 365-396.
- 9 Atkins, E. (1984). Fever: the old and the new. *J Infect Dis* 149, 339-348.

- 
- 10 Auron, P.E., Webb, A.C., Rosenwasser, L.J., Mucci, S.F., Rich, A., Wolff, S.M., und Dinarello, C.A. (1984). Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* *81*, 7907-7911.
  - 11 Bahl, K., Huebner, A., Davis, R.J., und Welsh, R.M. (2010). Analysis of apoptosis of memory T cells and dendritic cells during the early stages of viral infection or exposure to toll-like receptor agonists. *J Virol* *84*, 4866-4877.
  - 12 Baltathakis, I., Alcantara, O., und Boldt, D.H. (2001). Expression of different NF-kappaB pathway genes in dendritic cells (DCs) or macrophages assessed by gene expression profiling. *J Cell Biochem* *83*, 281-290.
  - 13 Beattie, E., Paoletti, E., und Tartaglia, J. (1995). Distinct patterns of IFN sensitivity observed in cells infected with vaccinia K3L- and E3L- mutant viruses. *Virology* *210*, 254-263.
  - 14 Ben-Sasson, S.Z., Hu-Li, J., Quiel, J., Cauchetaux, S., Ratner, M., Shapira, I., Dinarello, C.A., und Paul, W.E. (2009). IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 7119-7124.
  - 15 Blanchard, T.J., Alcami, A., Andrea, P., und Smith, G.L. (1998). Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine. *J Gen Virol* *79* ( Pt 5), 1159-1167.
  - 16 Broyles, S.S. (2003). Vaccinia virus transcription. *J.Gen.Virol.* *84*, 2293-2303.
  - 17 Burckstummer, T., Baumann, C., Bluml, S., Dixit, E., Durnberger, G., Jahn, H., Planyavsky, M., Bilban, M., Colinge, J., Bennett, K.L., und Superti-Furga, G. (2009). An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat Immunol* *10*, 266-272.

- 
- 18 Carroll, M.W., und Moss, B. (1997). Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line. *Virology* 238, 198-211.
- 19 Carson, W., und Caligiuri, M.A. (1998). Interleukin-15 as a potential regulator of the innate immune response. *Braz J Med Biol Res* 31, 1-9.
- 20 Carter, G.C., Law, M., Hollinshead, M., und Smith, G.L. (2005). Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans. *J.Gen.Virol.* 86, 1279-1290.
- 21 Carter, G.C., Rodger, G., Murphy, B.J., Law, M., Krauss, O., Hollinshead, M., und Smith, G.L. (2003). Vaccinia virus cores are transported on microtubules. *J.Gen.Virol.* 84, 2443-2458.
- 22 Chang, C.H., Furue, M., und Tamaki, K. (1994). Selective regulation of ICAM-1 and major histocompatibility complex class I and II molecule expression on epidermal Langerhans cells by some of the cytokines released by keratinocytes and T cells. *Eur J Immunol* 24, 2889-2895.
- 23 Chang, H.W., Watson, J.C., und Jacobs, B.L. (1992). The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, 4825-4829.
- 24 Chung, C.S., Hsiao, J.C., Chang, Y.S., und Chang, W. (1998). A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate. *J.Virol.* 72, 1577-1585.
- 25 Clark, R.H., Kenyon, J.C., Bartlett, N.W., Tschärke, D.C., und Smith, G.L. (2006). Deletion of gene A41L enhances vaccinia virus immunogenicity and vaccine efficacy. *J.Gen.Virol.* 87, 29-38.

- 
- 26 Costello, R., Brailly, H., Mallet, F., Mawas, C., und Olive, D. (1993). Interleukin-7 is a potent co-stimulus of the adhesion pathway involving CD2 and CD28 molecules. *Immunology* 80, 451-457.
- 27 Cottingham, M.G., Andersen, R.F., Spencer, A.J., Saurya, S., Furze, J., Hill, A.V., und Gilbert, S.C. (2008). Recombination-mediated genetic engineering of a bacterial artificial chromosome clone of modified vaccinia virus Ankara (MVA). *PLoS One* 3, e1638.
- 28 Crawford, K., Stark, A., Kitchens, B., Sternheim, K., Pantazopoulos, V., Triantafellow, E., Wang, Z., Vasir, B., Larsen, C.E., Gabuzda, D., *et al.* (2003). CD2 engagement induces dendritic cell activation: implications for immune surveillance and T-cell activation. *Blood* 102, 1745-1752.
- 29 Dalloul, A., Laroche, L., Bagot, M., Mossalayi, M.D., Fourcade, C., Thacker, D.J., Hogge, D.E., Merle-Beral, H., Debre, P., und Schmitt, C. (1992). Interleukin-7 is a growth factor for Sezary lymphoma cells. *J Clin Invest* 90, 1054-1060.
- 30 Damon, I.K. (2007). Poxviruses. In *Fields Virology*, D.M. Knipe, und P.M. Howley, eds.
- 31 Davies, M.V., Chang, H.W., Jacobs, B.L., und Kaufman, R.J. (1993). The E3L and K3L vaccinia virus gene products stimulate translation through inhibition of the double-stranded RNA-dependent protein kinase by different mechanisms. *J.Virol.* 67, 1688-1692.
- 32 de Saint-Vis, B., Fugier-Vivier, I., Massacrier, C., Gaillard, C., Vanbervliet, B., Ait-Yahia, S., Banchereau, J., Liu, Y.J., Lebecque, S., und Caux, C. (1998). The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *J Immunol* 160, 1666-1676.
- 33 Delaloye, J., Roger, T., Steiner-Tardivel, Q.G., Le Roy, D., Knaup Reymond, M., Akira, S., Petrilli, V., Gomez, C.E., Perdiguero, B., Tschopp, J., *et al.* (2009). Innate immune

- 
- sensing of modified vaccinia virus Ankara (MVA) is mediated by TLR2-TLR6, MDA-5 and the NALP3 inflammasome. *PLoS Pathog* 5, e1000480.
- 34 Dinarello, C.A. (2010). IL-1: discoveries, controversies and future directions. *Eur J Immunol* 40, 599-606.
- 35 Doherty, T.M., Seder, R.A., und Sher, A. (1996). Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages. *J Immunol* 156, 735-741.
- 36 Drexler, I., Staib, C., und Sutter, G. (2004). Modified vaccinia virus Ankara as antigen delivery system: how can we best use its potential? *Curr.Opin.Biotechnol.* 15, 506-512.
- 37 Esteban, M., und Metz, D.H. (1973). Early virus protein synthesis in vaccinia virus-infected cells. *J.Gen.Virol.* 19, 201-206.
- 38 Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.W., Datta, P., Wu, J., und Alnemri, E.S. (2009). AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* 458, 509-513.
- 39 Frischknecht, F., Moreau, V., Rottger, S., Gonfloni, S., Reckmann, I., Superti-Furga, G., und Way, M. (1999). Actin-based motility of vaccinia virus mimics receptor tyrosine kinase signalling. *Nature* 401, 926-929.
- 40 Froggatt, G.C., Smith, G.L., und Beard, P.M. (2007). Vaccinia virus gene F3L encodes an intracellular protein that affects the innate immune response. *J Gen Virol* 88, 1917-1921.
- 41 Fry, T.J., und Mackall, C.L. (2002). Interleukin-7: from bench to clinic. *Blood* 99, 3892-3904.

- 
- 42 Garcia-Arriaza, J., Najera, J.L., Gomez, C.E., Sorzano, C.O., und Esteban, M. (2010). Immunogenic profiling in mice of a HIV/AIDS vaccine candidate (MVA-B) expressing four HIV-1 antigens and potentiation by specific gene deletions. *PLoS One* 5, e12395.
- 43 Gardella, S., Andrei, C., Costigliolo, S., Olcese, L., Zocchi, M.R., und Rubartelli, A. (2000). Secretion of bioactive interleukin-1beta by dendritic cells is modulated by interaction with antigen specific T cells. *Blood* 95, 3809-3815.
- 44 Gavin, M.A., Gilbert, M.J., Riddell, S.R., Greenberg, P.D., und Bevan, M.J. (1993). Alkali hydrolysis of recombinant proteins allows for the rapid identification of class I MHC-restricted CTL epitopes. *J.Immunol.* 151, 3971-3980.
- 45 Gleissner, C.A., Shaked, I., Little, K.M., und Ley, K. (2010). CXC chemokine ligand 4 induces a unique transcriptome in monocyte-derived macrophages. *J Immunol* 184, 4810-4818.
- 46 Gomez, C.E., Najera, J.L., Krupa, M., und Esteban, M. (2008). The poxvirus vectors MVA and NYVAC as gene delivery systems for vaccination against infectious diseases and cancer. *Curr.Gene Ther.* 8, 97-120.
- 47 Guo, Z., Zhang, M., An, H., Chen, W., Liu, S., Guo, J., Yu, Y., und Cao, X. (2003). Fas ligation induces IL-1beta-dependent maturation and IL-1beta-independent survival of dendritic cells: different roles of ERK and NF-kappaB signaling pathways. *Blood* 102, 4441-4447.
- 48 Hiller, G., und Weber, K. (1985). Golgi-derived membranes that contain an acylated viral polypeptide are used for vaccinia virus envelopment. *J.Virol.* 55, 651-659.
- 49 Hochstein-Mintzel, V., Hanichen, T., Huber, H.C., und Stickl, H. (1975). [An attenuated strain of vaccinia virus (MVA). Successful intramuscular immunization against vaccinia and variola (author's transl)]. *Zentralbl.Bakteriol.Orig.A* 230, 283-297.

- 
- 50 Hollinshead, M., Rodger, G., van, E.H., Law, M., Hollinshead, R., Vaux, D.J., und Smith, G.L. (2001). Vaccinia virus utilizes microtubules for movement to the cell surface. *J.Cell Biol.* 154, 389-402.
- 51 Hornung, V., Ablasser, A., Charrel-Dennis, M., Bauernfeind, F., Horvath, G., Caffrey, D.R., Latz, E., und Fitzgerald, K.A. (2009). AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 458, 514-518.
- 52 Hsiao, J.C., Chung, C.S., und Chang, W. (1999). Vaccinia virus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of intracellular mature virions to cells. *J.Virol.* 73, 8750-8761.
- 53 Janeway, C. (2005). *Immunobiology : the immune system in health and disease*, 6th edn (New York: Garland Science).
- 54 Joklik, W.K. (1964). The intracellular uncoating of Poxvirus DNA. II. The molecular basis of the uncoating process. *J.Mol.Biol.* 8, 277-288.
- 55 Joklik, W.K. (1968). Vaccinia virus deoxyribonucleic acid: a genome replicating in the cytoplasm. *Res.Publ.Assoc.Res.Nerv.Ment.Dis.* 44, 87-101.
- 56 Kampgen, E., Koch, F., Heufler, C., Eggert, A., Gill, L.L., Gillis, S., Dower, S.K., Romani, N., und Schuler, G. (1994). Understanding the dendritic cell lineage through a study of cytokine receptors. *J Exp Med* 179, 1767-1776.
- 57 Kanneganti, T.D. (2010). Central roles of NLRs and inflammasomes in viral infection. *Nat Rev Immunol* 10, 688-698.
- 58 Kanneganti, T.D., Body-Malapel, M., Amer, A., Park, J.H., Whitfield, J., Franchi, L., Taraporewala, Z.F., Miller, D., Patton, J.T., Inohara, N., und Nunez, G. (2006). Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *J Biol Chem* 281, 36560-36568.



- 
- 59 Kates, J.R., und McAuslan, B.R. (1967). Poxvirus DNA-dependent RNA polymerase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 58, 134-141.
- 60 Kayamuro, H., Yoshioka, Y., Abe, Y., Arita, S., Katayama, K., Nomura, T., Yoshikawa, T., Kubota-Koketsu, R., Ikuta, K., Okamoto, S., *et al.* (2010). Interleukin-1 family cytokines as mucosal vaccine adjuvants for induction of protective immunity against influenza virus. *J Virol* 84, 12703-12712.
- 61 Khaldoyanidi, S., Moll, J., Karakhanova, S., Herrlich, P., und Ponta, H. (1999). Hyaluronate-enhanced hematopoiesis: two different receptors trigger the release of interleukin-1beta and interleukin-6 from bone marrow macrophages. *Blood* 94, 940-949.
- 62 Kluczyk, A., Siemion, I.Z., Szewczuk, Z., und Wieczorek, Z. (2002). The immunosuppressive activity of peptide fragments of vaccinia virus C10L protein and a hypothesis on the role of this protein in the viral invasion. *Peptides* 23, 823-834.
- 63 Kuida, K., Lippke, J.A., Ku, G., Harding, M.W., Livingston, D.J., Su, M.S., und Flavell, R.A. (1995). Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 267, 2000-2003.
- 64 Laouar, A., Manocha, M., Haridas, V., und Manjunath, N. (2008). Concurrent generation of effector and central memory CD8 T cells during vaccinia virus infection. *PLoS One* 3, e4089.
- 65 Larregina, A.T., Morelli, A.E., Kolkowski, E., Sanjuan, N., Barboza, M.E., und Fainboim, L. (1997). Pattern of cytokine receptors expressed by human dendritic cells migrated from dermal explants. *Immunology* 91, 303-313.

- 
- 66 Law, M., Carter, G.C., Roberts, K.L., Hollinshead, M., und Smith, G.L. (2006). Ligand-induced and nonfusogenic dissolution of a viral membrane. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103, 5989-5994.
- 67 Lehmann, M.H., Kastenmuller, W., Kandemir, J.D., Brandt, F., Suezer, Y., und Sutter, G. (2009). Modified vaccinia virus ankara triggers chemotaxis of monocytes and early respiratory immigration of leukocytes by induction of CCL2 expression. *J Virol* 83, 2540-2552.
- 68 Lichtman, A.H., Chin, J., Schmidt, J.A., und Abbas, A.K. (1988). Role of interleukin 1 in the activation of T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 9699-9703.
- 69 Lin, C.L., Chung, C.S., Heine, H.G., und Chang, W. (2000). Vaccinia virus envelope H3L protein binds to cell surface heparan sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection in vitro and in vivo. *J.Virol.* 74, 3353-3365.
- 70 Liu, K., Catalfamo, M., Li, Y., Henkart, P.A., und Weng, N.P. (2002). IL-15 mimics T cell receptor crosslinking in the induction of cellular proliferation, gene expression, and cytotoxicity in CD8+ memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6192-6197.
- 71 Lodolce, J., Burkett, P., Koka, R., Boone, D., Chien, M., Chan, F., Madonia, M., Chai, S., und Ma, A. (2002a). Interleukin-15 and the regulation of lymphoid homeostasis. *Mol Immunol* 39, 537-544.
- 72 Lodolce, J.P., Burkett, P.R., Koka, R.M., Boone, D.L., und Ma, A. (2002b). Regulation of lymphoid homeostasis by interleukin-15. *Cytokine Growth Factor Rev* 13, 429-439.
- 73 Lowenthal, J.W., und MacDonald, H.R. (1986). Binding and internalization of interleukin 1 by T cells. Direct evidence for high- and low-affinity classes of interleukin 1 receptor. *J Exp Med* 164, 1060-1074.

- 
- 74 Luft, T., Jefford, M., Luetjens, P., Hochrein, H., Masterman, K.A., Maliszewski, C., Shortman, K., Cebon, J., und Maraskovsky, E. (2002). IL-1 beta enhances CD40 ligand-mediated cytokine secretion by human dendritic cells (DC): a mechanism for T cell-independent DC activation. *J Immunol* 168, 713-722.
- 75 Luqman, M., Greenbaum, L., Lu, D., und Bottomly, K. (1992). Differential effect of interleukin 1 on naive and memory CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 22, 95-100.
- 76 Ma, A., Koka, R., und Burkett, P. (2006). Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu Rev Immunol* 24, 657-679.
- 77 Mayer-Barber, K.D., Barber, D.L., Shenderov, K., White, S.D., Wilson, M.S., Cheever, A., Kugler, D., Hieny, S., Caspar, P., Nunez, G., *et al.* (2010). Caspase-1 independent IL-1beta production is critical for host resistance to mycobacterium tuberculosis and does not require TLR signaling in vivo. *J Immunol* 184, 3326-3330.
- 78 Mayr, A., Bachmann, P.A., Bibrack, B., und Wittmann, G. (1974). *Virologische Arbeitsmethoden Band I.*
- 79 Mayr, A., Hochstein-Mintzel, V., und Stickel, H. (1975). Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes MVA. *Infection* 3, 6-14.
- 80 Mayr, A., Stickl, H., Muller, H.K., Danner, K., und Singer, H. (1978). [The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defence mechanism (author's transl)]. *Zentralbl.Bakteriol.B* 167, 375-390.
- 81 Meng, X., Jiang, C., Arsenio, J., Dick, K., Cao, J., und Xiang, Y. (2009). Vaccinia virus K1L and C7L inhibit antiviral activities induced by type I interferons. *J.Virol.* 83, 10627-10636.

- 
- 82 Mercer, J., und Helenius, A. (2008). Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* 320, 531-535.
- 83 Meyer, H., Sutter, G., und Mayr, A. (1991). Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J.Gen.Virol.* 72 ( Pt 5), 1031-1038.
- 84 Moss, B. (2007). Poxviridae: The Viruses and Their Replication. In *Fields Virology*, D.M. Knipe, und P.M. Howley, eds.
- 85 Moss, B., und Earl, P.L. (2001). Overview of the vaccinia virus expression system. *Curr Protoc Protein Sci Chapter 5*, Unit5 11.
- 86 Moss, B., und Salzman, N.P. (1968). Sequential protein synthesis following vaccinia virus infection. *J.Virol.* 2, 1016-1027.
- 87 Munyon, W., Paoletti, E., und Grace, J.T., Jr. (1967). RNA polymerase activity in purified infectious vaccinia virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 58, 2280-2287.
- 88 Murray, R., Suda, T., Wrighton, N., Lee, F., und Zlotnik, A. (1989). IL-7 is a growth and maintenance factor for mature and immature thymocyte subsets. *Int Immunol* 1, 526-531.
- 89 Muruve, D.A., Petrilli, V., Zaiss, A.K., White, L.R., Clark, S.A., Ross, P.J., Parks, R.J., und Tschopp, J. (2008). The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature* 452, 103-107.
- 90 Myskiw, C., Arsenio, J., van, B.R., Deschambault, Y., und Cao, J. (2009). Vaccinia virus E3 suppresses expression of diverse cytokines through inhibition of the PKR, NF-kappaB, and IRF3 pathways. *J.Virol.* 83, 6757-6768.

- 
- 91 Nanjappa, S.G., Walent, J.H., Morre, M., und Suresh, M. (2008). Effects of IL-7 on memory CD8 T cell homeostasis are influenced by the timing of therapy in mice. *J Clin Invest* *118*, 1027-1039.
- 92 Neale, S.D., und Athanasou, N.A. (1999). Cytokine receptor profile of arthroplasty macrophages, foreign body giant cells and mature osteoclasts. *Acta Orthop Scand* *70*, 452-458.
- 93 Novy, P., Huang, X., Leonard, W.J., und Yang, Y. (2011). Intrinsic IL-21 signaling is critical for CD8 T cell survival and memory formation in response to vaccinia viral infection. *J Immunol* *186*, 2729-2738.
- 94 Ogilvie, A.C., Hack, C.E., Wagstaff, J., van Mierlo, G.J., Erenberg, A.J., Thomsen, L.L., Hoekman, K., und Rankin, E.M. (1996). IL-1 beta does not cause neutrophil degranulation but does lead to IL-6, IL-8, and nitrite/nitrate release when used in patients with cancer. *J Immunol* *156*, 389-394.
- 95 Osborne, L.C., Dhanji, S., Snow, J.W., Priatel, J.J., Ma, M.C., Miners, M.J., Teh, H.S., Goldsmith, M.A., und Abraham, N. (2007). Impaired CD8 T cell memory and CD4 T cell primary responses in IL-7R alpha mutant mice. *J Exp Med* *204*, 619-631.
- 96 Pennington, T.H., und Follett, E.A. (1974). Vaccinia virus replication in enucleate BSC-1 cells: particle production and synthesis of viral DNA and proteins. *J.Virol.* *13*, 488-493.
- 97 Pruijboom, W.M., van Dijk, A.P., Tak, C.J., Bonta, I.L., Wilson, J.H., und Zijlstra, F.J. (1994). Production of inflammatory mediators by human macrophages obtained from ascites. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* *50*, 183-192.
- 98 Quigley, M., Huang, X., und Yang, Y. (2007). Extent of stimulation controls the formation of memory CD8 T cells. *J Immunol* *179*, 5768-5777.

- 
- 99 Rathinam, V.A., Jiang, Z., Waggoner, S.N., Sharma, S., Cole, L.E., Waggoner, L., Vanaja, S.K., Monks, B.G., Ganesan, S., Latz, E., *et al.* (2010). The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat Immunol* 11, 395-402.
- 100 Reading, P.C., Moore, J.B., und Smith, G.L. (2003). Steroid hormone synthesis by vaccinia virus suppresses the inflammatory response to infection. *J.Exp.Med.* 197, 1269-1278.
- 101 Reading, P.C., und Smith, G.L. (2003). Vaccinia virus interleukin-18-binding protein promotes virulence by reducing gamma interferon production and natural killer and T-cell activity. *J.Virol.* 77, 9960-9968.
- 102 Rehm, K.E., Connor, R.F., Jones, G.J., Yimbu, K., und Roper, R.L. (2010). Vaccinia virus A35R inhibits MHC class II antigen presentation. *Virology* 397, 176-186.
- 103 Rivas, C., Gil, J., Melkova, Z., Esteban, M., und Diaz-Guerra, M. (1998). Vaccinia virus E3L protein is an inhibitor of the interferon (i.f.n.)-induced 2-5A synthetase enzyme. *Virology* 243, 406-414.
- 104 Roberts, K.L., und Smith, G.L. (2008). Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. *Trends Microbiol.* 16, 472-479.
- 105 Roper, R.L. (2006). Characterization of the vaccinia virus A35R protein and its role in virulence. *J Virol* 80, 306-313.
- 106 Sakata, T., Iwagami, S., Tsuruta, Y., Teraoka, H., Tatsumi, Y., Kita, Y., Nishikawa, S., Takai, Y., und Fujiwara, H. (1990). Constitutive expression of interleukin-7 mRNA and production of IL-7 by a cloned murine thymic stromal cell line. *J Leukoc Biol* 48, 205-212.

- 
- 107 Sancho, M.C., Schleich, S., Griffiths, G., und Krijnse-Locker, J. (2002). The block in assembly of modified vaccinia virus Ankara in HeLa cells reveals new insights into vaccinia virus morphogenesis. *J.Virol.* 76, 8318-8334.
- 108 Sanderson, C.M., Hollinshead, M., und Smith, G.L. (2000). The vaccinia virus A27L protein is needed for the microtubule-dependent transport of intracellular mature virus particles. *J.Gen.Virol.* 81, 47-58.
- 109 Schluns, K.S., Kieper, W.C., Jameson, S.C., und Lefrancois, L. (2000). Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 1, 426-432.
- 110 Schluns, K.S., und Lefrancois, L. (2003). Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat Rev Immunol* 3, 269-279.
- 111 Schmelz, M., Sodeik, B., Ericsson, M., Wolffe, E.J., Shida, H., Hiller, G., und Griffiths, G. (1994). Assembly of vaccinia virus: the second wrapping cisterna is derived from the trans Golgi network. *J.Virol.* 68, 130-147.
- 112 Schroder, K., und Tschopp, J. (2010). The inflammasomes. *Cell* 140, 821-832.
- 113 Spriggs, M.K., Hruby, D.E., Maliszewski, C.R., Pickup, D.J., Sims, J.E., Buller, R.M., und VanSlyke, J. (1992). Vaccinia and cowpox viruses encode a novel secreted interleukin-1-binding protein. *Cell* 71, 145-152.
- 114 Stack, J., Haga, I.R., Schroder, M., Bartlett, N.W., Maloney, G., Reading, P.C., Fitzgerald, K.A., Smith, G.L., und Bowie, A.G. (2005). Vaccinia virus protein A46R targets multiple Toll-like-interleukin-1 receptor adaptors and contributes to virulence. *J.Exp.Med.* 201, 1007-1018.

- 
- 115 Staib, C., Drexler, I., Ohlmann, M., Wintersperger, S., Erfle, V., und Sutter, G. (2000). Transient host range selection for genetic engineering of modified vaccinia virus Ankara. *Biotechniques* 28, 1137-1136, 1148.
- 116 Staib, C., Kisling, S., Erfle, V., und Sutter, G. (2005). Inactivation of the viral interleukin 1beta receptor improves CD8+ T-cell memory responses elicited upon immunization with modified vaccinia virus Ankara. *J.Gen.Virol.* 86, 1997-2006.
- 117 Staib, C., Lowel, M., Erfle, V., und Sutter, G. (2003). Improved host range selection for recombinant modified vaccinia virus Ankara. *Biotechniques* 34, 694-696, 698, 700.
- 118 Stehlik, C. (2009). Multiple interleukin-1beta-converting enzymes contribute to inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 60, 3524-3530.
- 119 Stickl, H., und Hochstein-Mintzel, V. (1971). [Intracutaneous smallpox vaccination with a weak pathogenic vaccinia virus ("MVA virus")]. *Munch.Med.Wochenschr.* 113, 1149-1153.
- 120 Stickl, H., Hochstein-Mintzel, V., Mayr, A., Huber, H.C., Schafer, H., und Holzner, A. (1974). [MVA vaccination against smallpox: clinical tests with an attenuated live vaccinia virus strain (MVA) (author's transl)]. *Dtsch.Med.Wochenschr.* 99, 2386-2392.
- 121 Surh, C.D., Boyman, O., Purton, J.F., und Sprent, J. (2006). Homeostasis of memory T cells. *Immunol Rev* 211, 154-163.
- 122 Sutter, G., und Moss, B. (1992). Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, 10847-10851.
- 123 Sutter, G., Ramsey-Ewing, A., Rosales, R., und Moss, B. (1994). Stable expression of the vaccinia virus K1L gene in rabbit cells complements the host range defect of a vaccinia virus mutant. *J.Virol.* 68, 4109-4116.



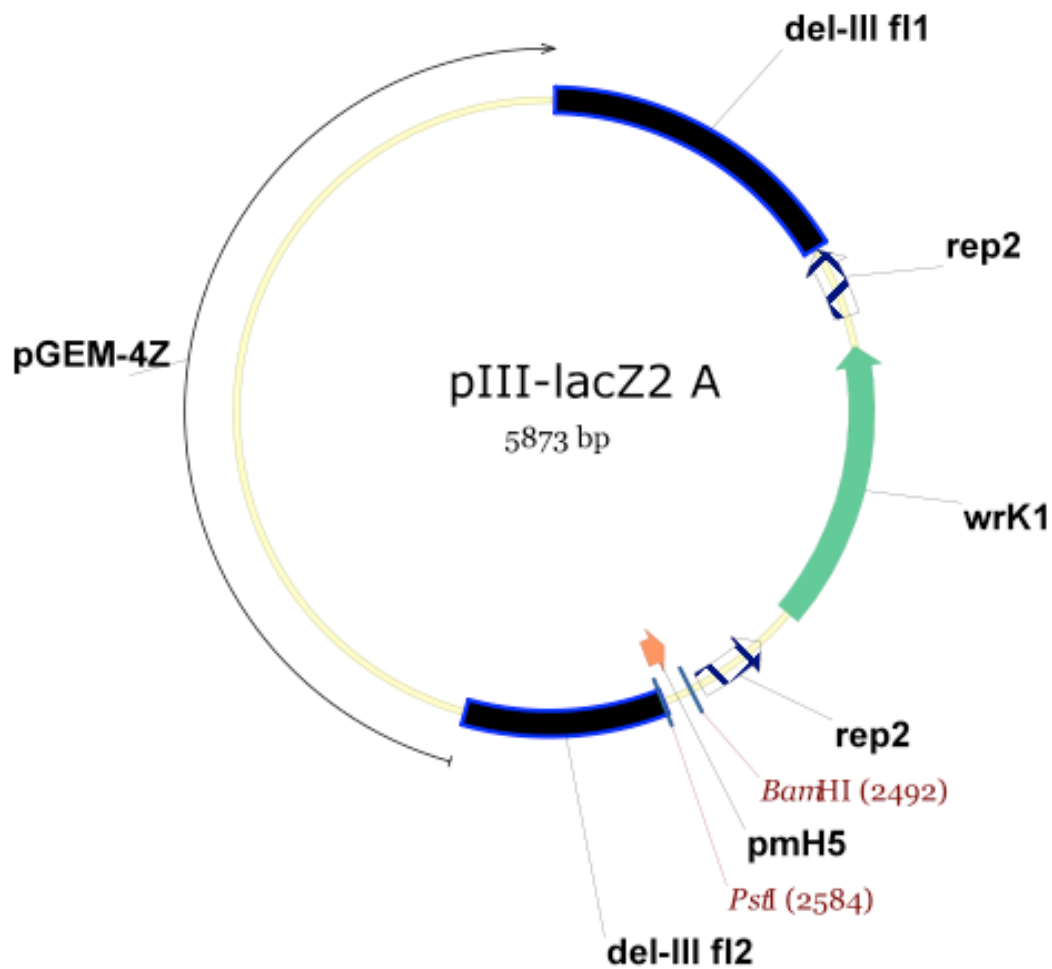
- 
- 124 Sutter, G., und Staib, C. (2003). Vaccinia vectors as candidate vaccines: the development of modified vaccinia virus Ankara for antigen delivery. *Curr. Drug Targets. Infect. Disord.* 3, 263-271.
- 125 Sutton, C.E., Lalor, S.J., Sweeney, C.M., Brereton, C.F., Lavelle, E.C., und Mills, K.H. (2009). Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* 31, 331-341.
- 126 Tewari, A., Buhles, W.C., Jr., und Starnes, H.F., Jr. (1990). Preliminary report: effects of interleukin-1 on platelet counts. *Lancet* 336, 712-714.
- 127 Tooze, J., Hollinshead, M., Reis, B., Radsak, K., und Kern, H. (1993). Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *Eur. J. Cell Biol.* 60, 163-178.
- 128 Townsley, A.C., Weisberg, A.S., Wagenaar, T.R., und Moss, B. (2006). Vaccinia virus entry into cells via a low-pH-dependent endosomal pathway. *J. Virol.* 80, 8899-8908.
- 129 Tschärke, D.C., Karupiah, G., Zhou, J., Palmore, T., Irvine, K.R., Haeryfar, S.M., Williams, S., Sidney, J., Sette, A., Bennink, J.R., und Yewdell, J.W. (2005). Identification of poxvirus CD8+ T cell determinants to enable rational design and characterization of smallpox vaccines. *J. Exp. Med.* 201, 95-104.
- 130 van Eijl, H., Hollinshead, M., und Smith, G.L. (2000). The vaccinia virus A36R protein is a type Ib membrane protein present on intracellular but not extracellular enveloped virus particles. *Virology* 271, 26-36.
- 131 Vassiliadis, S., Soteriadou, K.P., und Papadopoulos, G.K. (1997). IL-1 beta transduces different signals than IL-1 alpha leading to class II antigen expression on beta-insulinoma RIN-5AH cells through specific receptors. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 17, 211-225.

- 
- 132 Waibler, Z., Anzaghe, M., Ludwig, H., Akira, S., Weiss, S., Sutter, G., und Kalinke, U. (2007). Modified vaccinia virus Ankara induces Toll-like receptor-independent type I interferon responses. *J.Virol.* *81*, 12102-12110.
- 133 Walker, J.M., und Slifka, M.K. (2010). Longevity of T-cell memory following acute viral infection. *Adv Exp Med Biol* *684*, 96-107.
- 134 Ward, B.M. (2005). Visualization and characterization of the intracellular movement of vaccinia virus intracellular mature virions. *J.Virol.* *79*, 4755-4763.
- 135 Wesa, A.K., und Galy, A. (2001). IL-1 beta induces dendritic cells to produce IL-12. *Int Immunol* *13*, 1053-1061.
- 136 Willingham, S.B., Allen, I.C., Bergstralh, D.T., Brickey, W.J., Huang, M.T., Taxman, D.J., Duncan, J.A., und Ting, J.P. (2009). NLRP3 (NALP3, Cryopyrin) facilitates in vivo caspase-1 activation, necrosis, and HMGB1 release via inflammasome-dependent and -independent pathways. *J.Immunol.* *183*, 2008-2015.
- 137 Wolf, S.S., und Cohen, A. (1992). Expression of cytokines and their receptors by human thymocytes and thymic stromal cells. *Immunology* *77*, 362-368.
- 138 Wyatt, L.S., Carroll, M.W., Czerny, C.P., Merchlinsky, M., Sisler, J.R., und Moss, B. (1998). Marker rescue of the host range restriction defects of modified vaccinia virus Ankara. *Virology* *251*, 334-342.
- 139 Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., und Akira, S. (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* *301*, 640-643.

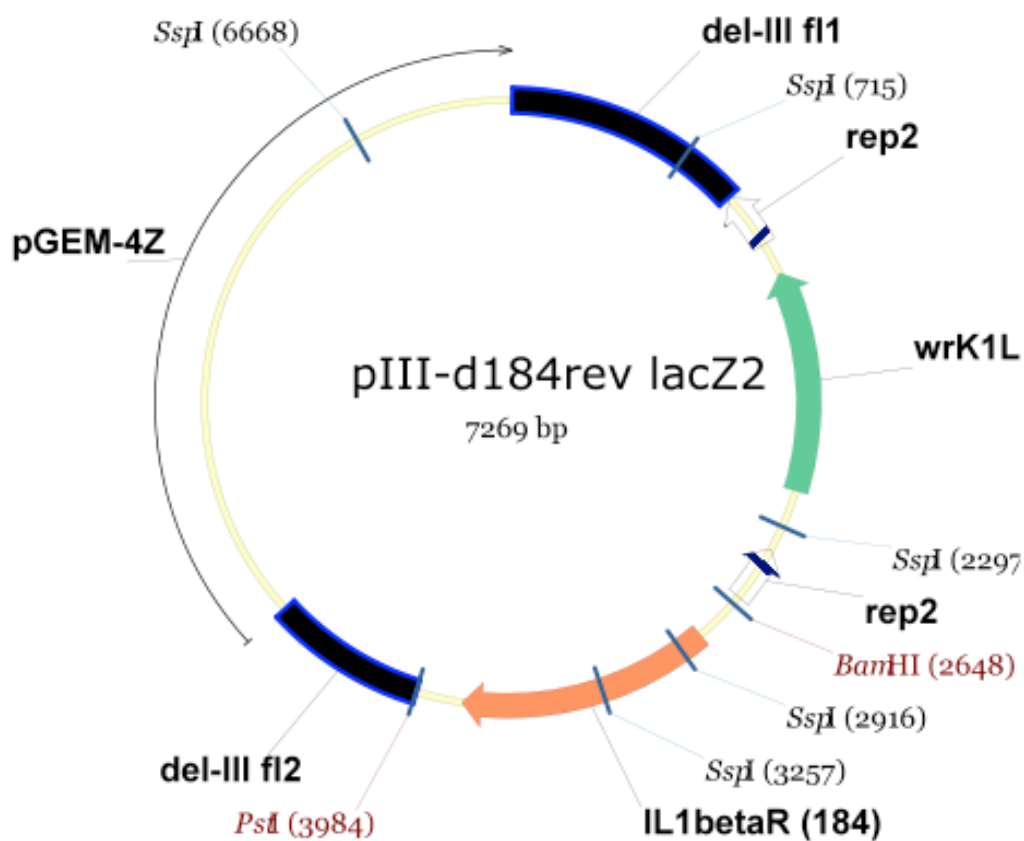
## 7. ANHANG

### 7.1. Plasmide

Folgende Plasmide haben im Rahmen dieser Arbeit Verwendung gefunden:



**Abbildung 38: Karte des Vektors pIII lacZ2 A.** Das Plasmid stammt aus der Arbeitsgruppe Gerd Sutter. fl = Flanke, rep = LacZ-Wiederholung, wrK1L = K1L aus VACV Western Reserve, pmH5 = pmH5-Promotor.



**Abbildung 39: Karte des Vektors pIII lacZ2 A.** Das Plasmid wurde in der vorliegenden Arbeit hergestellt. fl = Flanke, rep = LacZ-Wiederholung, wrK1L = K1L aus VACV Western Reserve, pmH5 = pmH5-Promotor.

## 7.2. Oligonukleotide

**Tabelle 16: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide.**

Bezeichnung	Sequenz	Amplikon [bp]
SZ006 MVA184 Flank for	CGGACTTTGTGCATATGC	409
SZ007 MVA184 Flank rev	GATACCGCAATTACACAAG	409
SZ020 184 <i>Bam</i> HI for	GATCGGATCCCTAGTAACAGTCTGAACGC	1346
SZ021 184 <i>Pst</i> I rev	GATCCTGCAGCACAAGAACATGAGTATGTC	1346
K1Lint1neu	TTGATGACAAGGGAAACACCGCATTG	557
K1Lint2neu	GAGTCTGAGTTCCTTGTTTTTG	557
HLPEI66	TGACGAGCTTCCGAGTTCC	732 (wt)
HLPEI67	GTACCGGCATCTCTAGCAGT	732 (wt)
HLPEI82	ATGGGTATACAGCACGAATTC	446
HLPEI83	CATGGACTCATAATCTCTATAC	446

### 7.3. Abkürzungen

Tabelle 17: Abkürzungsverzeichnis.

Abkürzung	Erläuterung
2-log	2-log DNA-Marker
AP	Alkalische Phosphatase
AraC	Arabinofuranosyl-Cytidin
BMDM	engl. <i>bone marrow derived macrophages</i> , knochenmarksabgeleitete Makrophagen
BSA	engl. <i>bovine serum albumin</i> , Rinderserum-Albumin
c	engl. <i>crescent</i>
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CEF	engl. <i>chicken embryo fibroblasts</i> , Hühnerembryofibroblasten
CEV	engl. <i>cell-associated extracellular enveloped virions</i> , zellassozierte extrazelluläre umhüllte Virionen
CPXV	engl. <i>cowpox virus</i> , Kuhpockenvirus
CVA	engl. <i>chorioallantoisvirus Ankara</i> , Chorioallantoisvirus Ankara
$\Delta$	MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R
DC	engl. <i>dendritic cell</i> , dendritische Zelle
DMSO	Dimethyl-sulfoxid
DNA	engl. <i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECTV	engl. <i>ectromelia virus</i> , Ektromelievirus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEV	engl. <i>extracellular enveloped virions</i> , extrazelluläre umhüllte Virionen
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
ELISA	engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> , Enzymgekoppelter Immunsorbentien-Assay
f	früh
FACS	engl. <i>fluorescence assisted cell sorting</i> , Fluoreszenzgekoppelte Zellsortierung
FCS	engl. <i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FDA	engl. <i>Food and Drug Administration</i>

Abkürzung	Erläuterung
fl	Flanke
GAG	Glykosaminoglykan
GM-CSF	engl. <i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	engl. <i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
i	intermediär
ICS	engl. <i>intracellular cytokine staining</i> , intrazelluläre Zytokinfärbung
IEV	engl. <i>intracellular enveloped virions</i> , intrazelluläre umhüllte Virionen
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-1Ra	Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist
IL-1RI	Typ I IL-1 Rezeptor
IL-1RII	Typ II IL-1 Rezeptor
IMV	engl. <i>intracellular mature virions</i> , intrazelluläre reife Virionen
IRF	engl. <i>interferon response factor</i> , Interferon-gesteuerter Faktor
ITR	engl. <i>inverted terminal repeat</i> , invertierte terminale Sequenzwiederholung
IV	engl. <i>immature virion</i> , unreifes Virion
LPS	Lipopolysaccharid
M-CSF	engl. <i>macrophage colony-stimulating factor</i>
mDC	engl. <i>myloid dendritic cells</i> , myeloide dendritische Zellen
MHC	engl. <i>major histocompatibility complex</i>
moi	engl. <i>multiplicity of infection</i>
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
MVA	modifiziertes Vakziniavirus Ankara
NC	engl. <i>nitrocellulose</i> , Nitrozellulose
NEA	nicht-essentielle Aminosäuren
NFκB	engl. <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NLR	engl. <i>NOD-like receptor</i>
NP-40	Nonidet P-40

Abkürzung	Erläuterung
OD	engl. <i>optical density</i> , optische Dichte
ORF	engl. <i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	engl. <i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	engl. <i>phosphate buffer saline</i> , Phosphatpuffer salin
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PFU	engl. <i>plaque forming units</i> , Plaquebildende Einheiten
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
pmH5	pmH5-Promotor
PO	Peroxidase
PRR	engl. <i>pattern recognition receptor</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rek.	Rekombinant
Rev	MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R
RIPA	engl. <i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
RLH	engl. <i>RIG-like helicase</i>
rpm	engl. <i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
s	spät
SDS	engl. <i>sodium dodecyl-sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SEAP	sekretierte embryonische alkalische Phosphatase
SEM	engl. <i>standard error of the mean</i> , Standardfehler
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TEN	Tris-EDTA-NaCl
TLR	engl. <i>toll like receptor</i>
uninf.	uninfiziert
UV	ultraviolett
VACV	engl. <i>vaccinia viruses</i> , Vakziniaviren
VARV	engl. <i>variola viruses</i> , Variola Virus

---

Abkürzung	Erläuterung
vf	engl. <i>viral factories</i> , virale Fabriken
WHO	engl. <i>world health organization</i> , Weltgesundheitsorganisation
wrK1L	VACV Western Reserve K1L
wt	Wildtyp-MVA



## 7.4. Abbildungen

Abbildung 1: Einordnung und Charakteristika von MVA.	9
Abbildung 2: Schema des Replikationszyklus von Pockenviren	11
Abbildung 3: Darstellung der Transkriptmenge für frühe (f), intermediäre (i) und späte (s) Genklassen im Verlauf der Replikation.	13
Abbildung 4: Expression und Prozessierung von IL-1 $\beta$ .	21
Abbildung 5: Schema der Herstellung von rekombinantem MVA mittels K1L-Selektion.	53
Abbildung 6: Amplifikation des IL-1 $\beta$ R durch PCR.	65
Abbildung 7: Überprüfung des Plasmids pIII IL-1 $\beta$ R rev lacZ2 durch Restriktion mit <i>SspI</i> .	66
Abbildung 8: Qualitative Überprüfung von MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev mittels PCR.	67
Abbildung 9: Gelelektrophoretische Auftrennung des Restriktionsverdaus viraler, genomischer DNA mit <i>EcoRI</i> .	68
Abbildung 10: Virale Proteinexpression nach Infektion von CEF-Zellen mit MVA und MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R bzw. MVA in Gegenwart von AraC.	70
Abbildung 11: Ein- und Mehr-Stufen-Wachstumsanalyse von MVA, MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev.	71
Abbildung 12: Analyse der Expression des IL-1 $\beta$ R in MVA, MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev nach Infektion von CEF-Zellen.	73
Abbildung 13: Expression und Bindungsaktivität des MVA IL-1 $\beta$ R nach Infektion von NIH 3T3-Zellen. (A) Expression in infizierten, unbehandelten Zellen.	74
Abbildung 14: Expression und Bindungsaktivität des MVA IL-1 $\beta$ R nach Infektion von HaCat-Zellen. (A) Expression in infizierten, unbehandelten Zellen.	75
Abbildung 15: Überprüfung der viralen Proteinexpression in mDC nach Infektion mit MVA.	76
Abbildung 16: Induktion von IL-1 $\beta$ nach Infektion von murinen mDC mit MVA.	77
Abbildung 17: IL-1 $\beta$ -Konzentration nach Infektion von murinen mDC mit MVA, MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev.	78
Abbildung 18: Induktion von IL-1 $\beta$ nach Infektion von murinen BMDM mit MVA, MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev.	80
Abbildung 19: Induktion von IL-1 $\beta$ nach <i>ex vivo</i> Infektion von murinen Peritonealzellen mit MVA und MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R.	81

---

Abbildung 20: Induktion weiterer Zytokine nach Infektion von murinen mDC mit MVA, MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev.	83
Abbildung 21: Verifizierung des ASC- <i>knock-down</i> in der THP-1 shASC Kontrollzelllinie.	85
Abbildung 22: Induktion von IL-1 $\beta$ nach Infektion von PMA-stimulierten THP-1 Zellen mit MVA, MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev.	86
Abbildung 23: Induktion von IL-1 $\beta$ nach Immunisierung von B6-Mäusen mit MVA, MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev.	87
Abbildung 24: Induktion anderer Zytokine nach Immunisierung von B6-Mäusen mit MVA, MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev.	88
Abbildung 25: Induktion von spezifischem IgG nach Immunisierung von B6-Mäusen mit MVA und MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R.	90
Abbildung 26: Intrazellulärer Nachweis von IFN- $\gamma$ in Splenozyten aus mit verschiedenen Dosen MVA und MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R immunisierten Mäusen.	91
Abbildung 27: Induktion B8-spezifischer T-Zellen im Blut in der Akut- und Gedächtnisphase nach Immunisierung von B6-Mäusen mit MVA, MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev bezogen auf die Gesamtzahl der CD8 <sup>+</sup> Z-Zellen.	93
Abbildung 28: Induktion B8-spezifischer T-Zellen im Blut in der Akut- und Gedächtnisphase nach Immunisierung von B6-Mäusen mit MVA, MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev bezogen auf die Zahl der aktivierten CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.	95
Abbildung 29: Induktion B8-spezifischer T-Zellen in der Milz und im Blut nach Immunisierung von B6-Mäusen mit MVA, MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev.	97
Abbildung 30: Induktion B8-spezifischer CD8 <sup>+</sup> -Gedächtnis-T-Zellen nach Immunisierung von B6-Mäusen mit MVA, MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev.	98
Abbildung 31: Induktion von CD4 <sup>+</sup> -Gedächtnis-T-Zellen nach Immunisierung von B6-Mäusen mit MVA, MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev.	99
Abbildung 32: Anteil apoptotischer, B8-spezifischer CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen im Blut nach Immunisierung von B6-Mäusen mit MVA, MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev.	100

---

Abbildung 33: Relativer (A) und absoluter Anteil (B) IFN- $\gamma$ sekretierender CD8 <sup>+</sup> T-Zellen nach Immunisierung von B6-Mäusen mit MVA, MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev.	101
Abbildung 34: ELISPOT IFN- $\gamma$ sekretierender CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus Milzen nach Immunisierung von B6-Mäusen mit MVA, MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev.	103
Abbildung 35: ELISPOT IFN- $\gamma$ sekretierender CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus Blut nach Immunisierung von B6-Mäusen mit MVA, MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R rev.	104
Abbildung 36: Vergleichendes Modell der Vorgänge in dendritischen Zellen nach Infektion mit (A) MVA und (B) MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R.	111
Abbildung 37: Vergleichendes Modell zur T-Zellantwort nach Immunisierung mit (A) MVA bzw. (B) MVA $\Delta$ IL-1 $\beta$ R.	118
Abbildung 38: Karte des Vektors pIII lacZ2 A.	139
Abbildung 39: Karte des Vektors pIII lacZ2 A.	140

---

## 7.5. Tabellen

Tabelle 1: Auflistung der bekannten, in MVA vorhandenen Immunmodulatoren.	16
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Reagenzien und deren Hersteller.	24
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen und deren Zusammensetzung	26
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Geräte und Hilfsmittel und deren Hersteller.	29
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Reagenzienkits und deren Hersteller	30
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Virusstämme mit Herkunft und Eigenschaften	31
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Mausstämme mit Herkunft und Eigenschaften	32
Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Zellkulturmedien und -zusätze und deren Hersteller	32
Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Zelllinien mit Herkunft und Eigenschaften	33
Tabelle 10: Auflistung der verwendeten unmarkierten Antikörper mit Herkunft und Arbeitsverdünnung	36
Tabelle 11: Auflistung der verwendeten markierten Antikörper mit Herkunft und Arbeitsverdünnung	36
Tabelle 12: Auflistung der verwendeten MHC-Klasse I-Multimere mit Herkunft und Arbeitsverdünnung	37
Tabelle 13: Auflistung der verwendeten Enzyme und deren Herkunft	37
Tabelle 14: Auflistung der verwendeten Bakterienstämme mit Merkmalen und Herkunft	38
Tabelle 15: Auflistung der verwendeten Peptide mit Herkunft und Sequenz	38
Tabelle 16: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide.	140
Tabelle 17: Abkürzungsverzeichnis.	141

---

**8. DANKSAGUNG**



---

**9. LEBENS LAUF**





