

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. med. vet. Gerd Sutter

**Untersuchungen von rekombinantem Modifizierten Vaccinavirus Ankara zur
Verabreichung von Antigenen des West-Nil-Virus**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde eines Doktor rer. biol. vet.
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Martina Kaserer
aus Mittersill (A)

München 2014

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Marlon R. Schneider

Tag der Promotion: 08. Februar 2014

Meiner lieben Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG.....	8
II. LITERATURÜBERSICHT	9
1. DAS WEST-NIL-VIRUS	9
1.1 Herkunft, Taxonomie und molekulare Klassifikation.....	9
1.2 Epidemiologie.....	13
1.2.1 Verbreitung des WNV in Europa, Afrika, Asien und Australien	13
1.2.2 Verbreitung des WNV auf dem amerikanischen Kontinent	14
1.3 Transmission und Vektorbiologie.....	15
1.4 Molekularbiologie	17
1.4.1 Morphologie des WNV	17
1.4.2 Genomorganisation.....	18
1.4.3 Replikationszyklus	19
1.4.4 Virale Proteine	21
1.5 WNV-Infektionen bei verschiedenen Wirtsgruppen.....	23
1.5.1 Vögel	23
1.5.2 Pferde	24
1.5.3 Mensch	24
1.6 WNV und die Immunantwort.....	26
1.6.1 Angeborenes Immunsystem.....	26
1.6.2 Adaptives Immunsystem	27
1.7 Diagnostik und Behandlung.....	28
1.8 Impfstoffe und Vorbeugung	30
2. MODIFIZIERTES VACCINIAVIRUS ANKARA ALS VEKTORIMPFSTOFF	31
3. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	34
III. MATERIAL UND METHODEN	35
1. CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	35
2. PUFFER UND LÖSUNGEN	36
3. KOMMERZIELLE KITS	37
4. NÄHRMEDIEN UND ZUSÄTZE	37
5. ZELLINIEN.....	38
6. BAKTERIEN	38
7. PLASMIDE.....	39
8. ENZYME.....	40

Inhaltsverzeichnis.....	V
9. VIREN.....	40
10. ANTIKÖRPER	41
10.1 Nicht-konjugierte Antikörper	41
10.2 Konjugierte Antikörper	41
11. SYNTHETISCHE OLIGONUCLEOTIDE (PRIMER)	41
12. SYNTHETISCHE OLIGOPEPTIDE	42
13. MÄUSE	42
14. VERBRAUCHSMATERIAL	43
15. SOFTWARE	43
16. GERÄTELISTE	43
17. ZELLKULTUR.....	45
17.1 Präparation von CEF-Zellen (primäre Hühnerembryofibroblasten, Chicken Embryo Fibroblasts).....	45
17.2 Präparation von Milzzellen.....	45
17.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	46
17.4 Kultivierung und Passagierung permanenter Zelllinien	46
17.5 Bestimmung der Zellzahl	46
18. MOLEKULAR- UND MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	47
18.1 Amplifikation von Plasmid-DNA	47
18.1.1 Transformation von E. coli.....	47
18.1.2 Animpfen von Flüssigkulturen zur Präparation von Plasmid-DNA	47
18.2 DNA-Methoden.....	47
18.2.1 Präparation von Plasmid-DNA	47
18.2.2 Präparation viraler DNA	48
18.2.3 Restriktionsanalyse	48
18.2.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese	48
18.3 PCR (Polymerasekettenreaktion)	49
19. VIROLOGISCHE METHODEN	50
19.1 Infektion von Zellen	50
19.2 Herstellung rekombinanter MVA mittels RFP-Selektion	50
19.3 Transfektion und Infektion	51
19.4 Klonale Isolierung rekombinanter Viren durch Passagierung auf CEF-Zellen	52
19.5 Virusamplifikation und –aufreinigung für <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Experimente	52
19.6 Bestimmung des Virustiters	53
19.7 Wachstumskinetik - Mehrstufenwachstumsanalyse	54
20. PROTEINBIOCHEMISCHE UND IMMUNOLOGISCHE METHODEN	54
20.1 Erzeugung von Proteinextrakten aus kultivierten Zellen	54

Inhaltsverzeichnis	VI
--------------------------	----

20.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE	55
20.2.1 Herstellung von SDS-PAGE-Gelen	55
20.2.2 SDS-PAGE	55
20.3 Westernblot (Tank-Blot-Verfahren)	56
20.3.1 Membrantransfer	56
20.3.2 Proteinnachweis	56
20.4 ELISA zum Nachweis WNV E-spezifischer Antikörper	57
20.5 Interferon- γ ELISpot	58
20.6 Deglykosylierung	59
20.7 Immunfluoreszenz	59
IV. ERGEBNISSE	60
1. Konstruktion rekombinanter MVA zur Expression von WNV-Hüllproteinen	60
1.1 Wahl der Insertionsstelle im MVA-Genom	60
1.2 Konstruktion der Vektorplasmide	61
1.3 Charakterisierung der Plasmide mittels Restriktionsanalyse und Nachweis der Synthese der rekombinanten Proteine	63
1.4 Generierung rekombinanter Viren mittels homologer Rekombination und klonale Isolierung der rekombinanten Viren in Plaquepassagen	64
2. Charakterisierung der rekombinanten Viren	66
2.1 Molekulare Charakterisierung der finalen Konstrukte	66
2.2 Wachstumsanalysen auf verschiedenen Zelllinien	68
3. Analyse der rekombinanten Proteine	71
3.1 Rekombinante Proteinexpression in verschiedenen Zelllinien	71
3.1.1 CEF	71
3.1.2 DF-1	72
3.1.3 HaCaT	73
3.1.4 HeLa	74
3.1.5 EoF	75
3.2 Glykosylierung	76
3.3 Lokalisation der rekombinanten WNV-Proteine in infizierten HeLa-Zellen mittels Immunfluoreszenz und Konfokalmikroskopie	77
3.3.1 MVA-WNVprME ₁	78
3.3.2 MVA-WNVE _{SOL}	79
3.3.3 MVA-WNVE _{TMC} und MVA-WNVE _{TMV}	80
4. Immunogenität im Mausmodell	82
4.1 Antikörperantwort (Antigen-ELISA)	82
4.2 T-Zell-Antwort (IFN- γ -ELISpot)	84

Inhaltsverzeichnis.....	VII
V. DISKUSSION.....	86
1. Generierung rekombinanter MVA zur Produktion von WNV-Antigenen.....	86
2. Charakterisierung der rekombinanten MVA.....	87
3. Immunogenität.....	92
4. Bewertung der Eignung als mögliche Vektorvakzine.....	94
VI. ZUSAMMENFASSUNG.....	95
VII. SUMMARY.....	97
VIII. LITERATURVERZEICHNIS.....	99
IX. ANHANG.....	125
1. Abkürzungen.....	125
2. Sequenzen der WNV-Genkonstrukte.....	128
2.1 Sequenz von prME ₁	128
2.2 Sequenz von prME ₂	129
2.3 Sequenz von E _{SOL}	130
2.4 Sequenz von E _{TMC}	131
2.5 Sequenz von E _{TMV}	132
3. Abbildungen.....	133
4. Tabellen.....	135
X. LEBENS LAUF.....	136
XI. DANKSAGUNG.....	137

I. EINLEITUNG

Das West-Nil-Virus (WNV) ist ein zur Familie der Flaviviren gehörendes Arbovirus und Erreger einer fieberigen Erkrankung, dem West-Nil-Fieber. Seit der Erstbeschreibung der Infektion in der Westnil-Provinz Ugandas im Jahr 1937 breitet sich das Virus zunehmend aus und gilt als das Flavivirus mit dem größten Verbreitungsgebiet. WNV zählt zu den sogenannten „emerging vector-borne viruses“, neu auftretenden, von Vektoren übertragenen Viren, wobei im Falle des WNV Stechmücken als Vektoren dienen. Die Einschleppung des Virus in die USA im Jahr 1999, seine Ausbreitung innerhalb weniger Jahre über den gesamten nordamerikanischen Kontinent und die damit einhergegangenen Krankheits- und Todesfälle bei Pferden und Menschen zeigen eindrucksvoll, wie rasch WNV als neuer Zoonoseerreger in einer Region an Bedeutung gewinnen kann. Durch Auftreten neuer Stämme des WNV, zunehmenden Luftverkehr, klimatische Veränderungen und der Fähigkeit wichtiger Stechmücken der Gattungen Culex und Aedes sich an neue ökologische Bedingungen anzupassen, besteht die Gefahr, dass sich die Infektion auch in Europa weiter ausbreitet. WNV-Infektionen sind im südlichen Europa schon seit mehr als 50 Jahren bekannt, jedoch hat sich das Krankheitsgeschehen seit Mitte der 1990er Jahre scheinbar verändert. So konnten in den letzten Jahren in Gebieten Europas, wie etwa Rumänien, Israel, Italien und Griechenland vermehrt Krankheitsausbrüche bei Menschen und Pferden, sowie eine Zunahme von neuroinvasiven Erkrankungen bei Menschen in Zusammenhang mit WNV-Infektionen beobachtet werden. Im Moment gibt es gegen das West-Nil-Fieber nur sehr begrenzte Therapiemöglichkeiten und keinen für die Verwendung beim Menschen zugelassenen Impfstoff. Die Präventionsstrategien der Infektion des Menschen beruhen insbesondere auf der Bekämpfung von Stechmückenpopulationen durch Pestizideinsatz und der Vermeidung von Mückenstichen. Vor diesem Hintergrund ist die Untersuchung von neuen Impfstoffkandidaten für Mensch und Tier ein wichtiges Ziel für die Verbesserung der Bekämpfung des WNV.

Diese Arbeit soll durch die Herstellung und Charakterisierung rekombinanter Impfstoffe auf Basis des Modifizierten Vacciniavirus Ankara (MVA) einen Beitrag zur Impfstoffforschung und WNV-spezifischen Immunprophylaxe leisten.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. DAS WEST-NIL-VIRUS

1.1 Herkunft, Taxonomie und molekulare Klassifikation

Das *West-Nil-Virus* ist seit 1937 bekannt. Es wurde zum ersten Mal aus dem Blut einer Patientin mit fieberiger Erkrankung isoliert und aufgrund dieses Erstdachweises in der Westnil-Provinz Ugandas als *West-Nil-Virus* (WNV) bezeichnet (Schmithburn et al. 1940).

Taxonomisch wird das Virus in die Familie der *Flaviviridae* eingeordnet. Diese beinhaltet zurzeit drei Genera und zusätzliche Virusspezies (Tabelle 1), die sogenannten Hepatitis-G-Viren, welche noch keiner Gattung zugeordnet sind (Heinz et al. 2000). Neben den Genera *Hepacivirus* und *Pestivirus* gibt es die Gattung *Flavivirus*, zu der auch das WNV und über 70 weitere Viren gehören (Kuno et al. 1998). Namensgebend für diese Gattung und die gesamte Virusfamilie war das *Gelbfieberevirus* (YFV), das beim Menschen eine mit Gelbsucht einhergehende Infektion auslösen kann (*flavus*, lat.: gelb) und von dem amerikanischen Militärarzt Walter Reed Anfang des 20. Jahrhunderts entdeckt wurde (Sfakianos und Hecht 2009). Innerhalb des Genus *Flavivirus* werden zwölf verschiedene Serokomplexe unterschieden. Das WNV ist aufgrund von Kreuzreaktionen im Neutralisationstest dem Japanische-Enzephalitis-Serokomplex zugeordnet (Poidinger et al. 1996).

Wie in Tabelle 1 ersichtlich werden Viren der Gattung *Flavivirus* überwiegend durch Arthropoden (Stechmücken und Zecken) übertragen und zählen daher zu den sogenannten Arboviren (athropod-borne viruses). Dazu gehören zum Beispiel auch Vertreter so unterschiedlicher Familien, wie *Togaviridae*, *Bunyaviridae* oder *Flaviviridae*. Die Viren werden meist von einem Arthropoden über den Biss oder Stich aufgenommen und vermehren sich im Vektor, um bei erneuten Stichen auf andere Organismen übertragen zu werden (Modrow et al. 2010). Arboviren werden üblicherweise in einem kontinuierlichen Zyklus zwischen den blutsaugenden Insekten oder Zecken und Wirbeltierwirten übertragen (Nathanson 2007). Bei WNV handelt es sich überwiegend um einen enzootischen Zyklus zwischen Vögeln und Stechmücken (Hayes et al. 2005, Komar et al. 2003), jedoch sind auch Epizootien möglich.

Genus	Serogruppen bzw. Virusspezies
Flavivirus (76) Arboviren (Stechmücken)	Dengue-Virus-Serokomplex Gelbfieber-Virus-Serokomplex Japanische-Enzephalitis-Serokomplex Aroa-Virus-Serokomplex Kokobera-Virus-Serokomplex Spondweni-Virus-Serokomplex Ntaya-Virus-Serokomplex
Arboviren (Zecken)	Mammalian tick-borne Serogruppe Seabird tick-borne Serogruppe
kein bekannter Vektor	Entebbe-Feldermäusevirus-Gruppe Rio Bravo-Virus-Gruppe Modoc-Virus-Gruppe
Pestivirus (13)	Klassisches Schweinepestvirus Border Disease Virus Bovine Viral Diarrhea Virus 1 Bovine Viral Diarrhea Virus 2
Hepacivirus (6 Genotypen)	Hepatitis-C-Virus
noch nicht zugeordnet	GB-A-Virus GB-B-Virus GB-C-Virus/Hepatitis-G-Virus

Tabelle 1: Familie Flaviviridae: Genera und Serogruppen bzw. Virusspezies. () Anzahl der Viren je Gattung. Modifiziert nach Lindenbach et al. 2007.

Basierend auf Sequenzanalysen und phylogenetischen Studien werden zwei Hauptgenotypen von WNV (Linie 1 und 2) unterschieden (Berthet et al. 1997), die eine genetische Übereinstimmung von rund 75% aufweisen (Lanciotti et al. 2002). WNV-Stämme der Linie 1 haben eine große globale Verbreitung und konnten seit Mitte der 1990er Jahre mit vermehrtem Auftreten von schwereren neurologischen Krankheitsfällen in Verbindung gebracht werden, wohingegen Linie 2-Stämme hauptsächlich in Afrika zu finden sind (Berthet et al. 1997). Untersuchungen des 1999 in die USA eingeführten WNV-Isolats zeigten eine sehr enge Verwandtschaft ($\geq 99,8\%$ Nukleotidübereinstimmung) mit einem Linie 1 Isolat aus Israel, das mit einem Ausbruch 1998 in Verbindung gebracht wurde (Jia et al. 1999, Lanciotti et al. 1999). Aus dieser engen Verwandtschaft wurde geschlossen, dass das WNV über den Mittleren Osten, vermutlich Israel, nach Nordamerika eingeführt wurde (Charrel et al. 2003, Lanciotti et al. 1999). Bisher wurde daher angenommen, dass das amerikanische WNV höchstwahrscheinlich eine Abstammung des Israel-Isolats 1998 sei. Alternative Hypothesen aufgrund neuerer phylogenetischer Analysen gehen hingegen davon

aus, dass die amerikanischen WNV-Isolate nicht direkt von dem 1998 erhaltenen Isolat aus Israel abstammen, sondern beide einen gemeinsamen, noch unbekannten, Ursprung besitzen (May et al. 2011).

Die WNV Linie 1 kann in drei Subklassen (1a, 1b und 1c) unterteilt werden. Isolate des Subtyps 1a sind sowohl in Afrika, dem Mittleren Osten und Europa sowie Amerika zu finden und sind genetisch eng miteinander verwandt (Beasley et al. 2002, Peterson et al. 2003). Als Subklasse 1b wird das in Australien vorkommende *Kunjin-Virus* (KUNV) eingestuft, welches bisher keine bzw. weniger schwere Symptome nach Infektionen verursacht hat (Scherret et al. 2001, Hall et al. 2002). Jedoch ist in letzter Zeit, nach einem schwereren Ausbruch bei Pferden, in Australien eine zwar eng mit KUNV verwandte aber neuroinvasivere Variante isoliert worden (Frost et al. 2012). Zur Subklasse 1c gehören WNV-Isolate aus Indien (Lanciotti et al. 2002, Beasley et al. 2002). Auf Basis der Ergebnisse einer umfassenden phylogenetischen Studie mit indischen WNV-Isolaten wurde vorgeschlagen, aus der Subklasse 1c eine eigene Linie der indischen Viren (Linie 5) zu bilden (Bondre et al. 2007). Die Viren der Linie 2 sind fast ausschließlich auf dem afrikanischen Kontinent südlich der Sahara und auf Madagaskar präsent, jedoch konnten in den letzten Jahren Vertreter dieser Genotyplinie auch in Europa (Ungarn 2004, Griechenland 2010) nachgewiesen werden (Bakonyi et al. 2006, Papa et al. 2011). Diesen zwei Hauptlinien wurden mittlerweile noch zwei weitere genetisch unterschiedliche Linien hinzugefügt (Abbildung 1). Dazu gehören zum einen das Rabensburg-Virus (Linie 3), welches 1997 in Tschechien zum ersten Mal isoliert wurde (Bakonyi et al. 2005) und ein Isolat aus Russland (Linie 4) dessen Nucleotidsequenz sich um ca. 30% von den anderen drei Linien unterscheidet (Lvov et al. 2004).

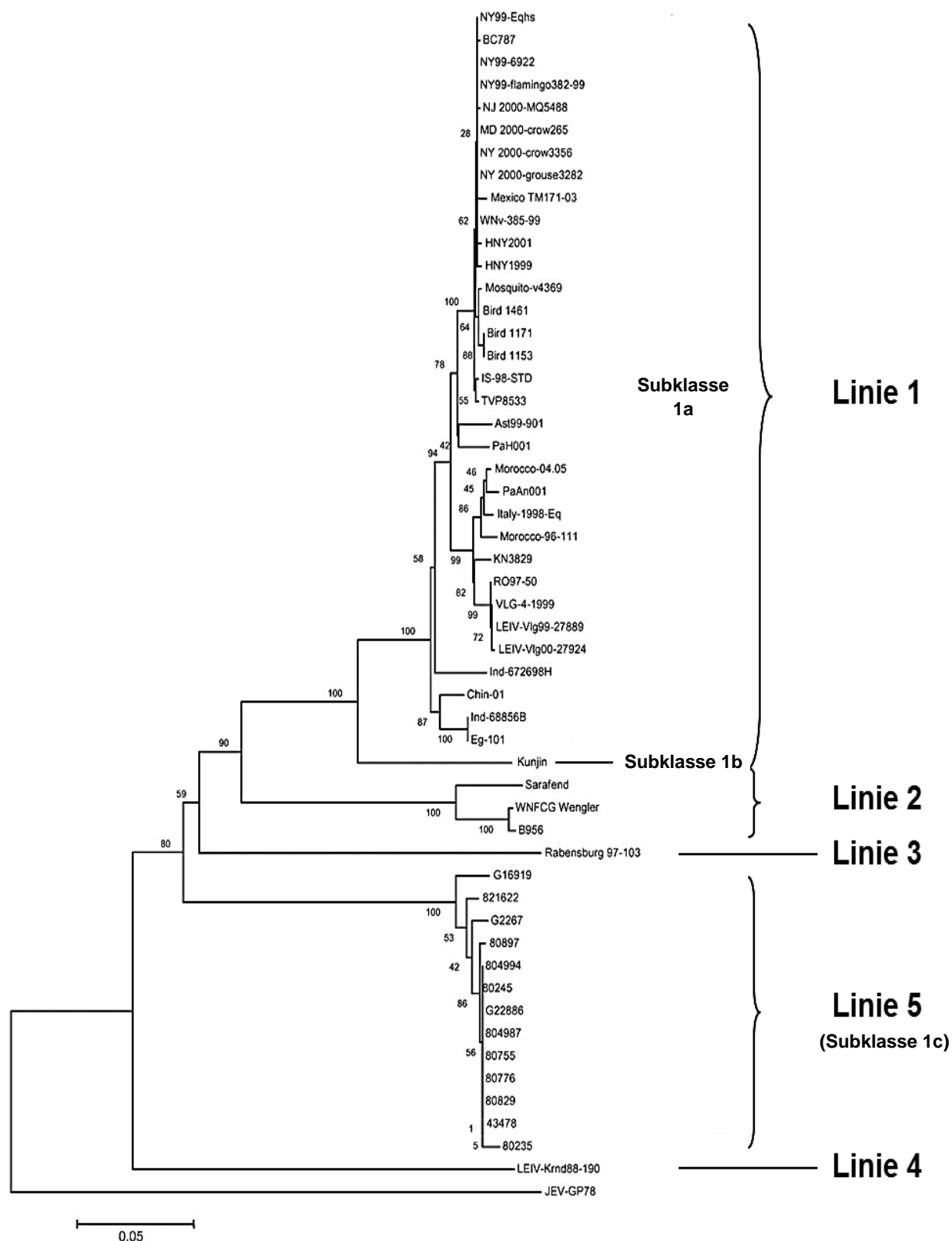


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum von repräsentativen WNV-Stämmen. Erstellt mit Hilfe der Neighbour-joining-Methode. Modifiziert nach Bondre et al. 2007.

1.2 Epidemiologie

1.2.1 Verbreitung des WNV in Europa, Afrika, Asien und Australien

Nach der erstmaligen Isolierung des WNV 1937 in Uganda wurden in den darauffolgenden Jahren und Jahrzehnten WNV-Infektionen auch in anderen Ländern und vor allem auf anderen Kontinenten registriert. Dadurch ist es das Flavivirus mit dem größten Verbreitungsgebiet (De Filette et al. 2012, Hubálek und Halouzka 1999).

In den 1950er und 1960er Jahren wurde es vermehrt in Afrika (Ägypten, Tunesien, Kenia) und Israel nachgewiesen. So konnten beispielsweise durch eine in den 1950er Jahren in Ägypten durchgeführte Studie bei über 60% der menschlichen Population WNV-Antikörper nachgewiesen werden (Hurlbut et al. 1956). Auch in Studien an Pferden konnten Antikörper bei der Hälfte der untersuchten Tiere gefunden werden. Schwere Krankheitsausbrüche waren und sind in Afrika sowohl beim Menschen als auch bei Pferden eher selten zu beobachten (Murgue et al. 2002, Schmidt und Elmansoury 1963). In Zentralafrika ist hauptsächlich die Genotyplinie 2 zu finden, deren Pathogenität geringer zu sein scheint, als jene der Linie 1. Venter et al. 2009 konnten jedoch zeigen, dass in Südafrika WNV-Stämme der Linie 2 zirkulieren, die die Fähigkeit besitzen schwere klinische Symptome bei Pferden und Menschen hervorzurufen. Die erste beim Menschen dokumentierte Epidemie wurde 1951-1952 in Israel beobachtet (Bernkopf et al. 1953). Mittlerweile konnten in vielen anderen Ländern, wie Spanien, Portugal, Frankreich, Italien, Rumänien, der Tschechischen Republik, Österreich, der Slowakei, Ungarn, Polen, Marokko, Bulgarien, Tunesien und Russland, WNV-Isolate aus Mücken, Vögeln und Säugetieren gewonnen werden. Der bisher größte WNV-Ausbruch in Europa ereignete sich 1996 in Rumänien mit 393 bestätigten WNV-Fällen mit neuroinvasivem Krankheitsverlauf (Tsai et al. 1998). In diesen europäischen Ländern sowie dem Mittleren Osten und nördlichen Afrika handelt es sich bei den isolierten Stämmen meist um Subtypen der Klasse 1a. In Asien findet man das WNV überwiegend in Indien und in Australien zirkuliert der WNV-Subtyp *Kunjin-Virus* (KUNV).

Da WNV-Epidemien an eine hohe Stechmückenaktivität in den jeweiligen Regionen gebunden sind, finden sie in Europa sowie anderen gemäßigten Zonen überwiegend in den Monaten Juli bis September statt, oft in Zusammenhang mit Überschwemmungen gefolgt von warmem und trockenem Wetter (Han et al. 1999, Hubálek 2000). WNV-Ausbrüche treten in Europa räumlich und zeitlich begrenzt auf (Dauphin et al. 2004).

1.2.2 Verbreitung des WNV auf dem amerikanischen Kontinent

In den USA wurde das WNV erstmals 1999 in New York City nachgewiesen, was auch als Zeitpunkt der Einschleppung des Virus in die Westliche Hemisphäre gilt (Nash et al. 2001). Durch dieses plötzliche Auftreten in einer neuen Region gewann die Infektion mit WNV vor allem in Amerika als Zoonose sehr schnell an Bedeutung. Die rasche transkontinentale Ausbreitung (Abbildung 2) führte zu einem massiven Vogelsterben mit Infektionen bei mehr als 300 verschiedenen Vogelspezies (CDC 2010, LaDeau et al. 2007), sowie einer Vielzahl von Krankheits- und Todesfällen bei Pferden und Menschen.

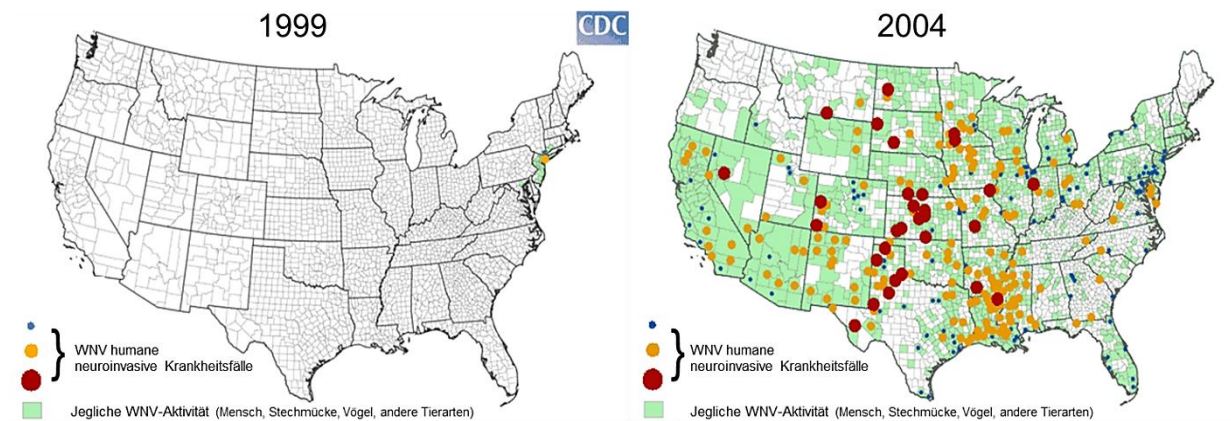


Abbildung 2: Ausbreitung des WNV über die gesamte USA innerhalb weniger Jahre. Modifiziert nach Hayes et al. 2005.

Die schwerste Epidemie, mit insgesamt über 20.000 Infektionen bei Pferden (United States Department of Agriculture 2012) und über 14.000 Fällen beim Menschen, wovon 548 tödlich verliefen, wurde 2002 – 2003 registriert (Tabelle 2). In den darauffolgenden Jahren ging die Anzahl der symptomatischen Infektionen zurück und stabilisierte sich auf niedrigem Niveau. (CDC 2013a). Es ist aber jederzeit wieder mit größeren Epidemien zu rechnen, wie sich im Jahr 2012 zeigte. Im August und September wurde vor allem in Texas, dem am stärksten betroffenen Bundesstaat, eine starke Zunahme von WNV-Infektionen beim Menschen registriert (Roehr 2012a und b) und insgesamt stieg die Zahl der Fälle auf über 5600 mit 286 Todesfällen (CDC 2013b).

Jahr	Meningitis/ Enzephalitisfälle	Gesamtfälle	Todesfälle
1999	59	62	7
2000	19	21	2
2001	64	66	10
2002	2946	4156	284
2003	2866	9862	264
2004	1142	2539	100
2005	1294	3000	119
2006	1459	4269	177
2007	1217	3630	124
2008	687	1356	44
2009	373	720	32
2010	629	1021	57
2011	486	712	43
2012	2873	5674	286
Gesamt	16196	37088	1549

Tabelle 2: Anzahl der registrierten humanen WNV-Fälle in den USA von 1999 bis 2012. CDC (2013a).

Neben den Vereinigten Staaten konnte sich das Virus erfolgreich in den Norden und Süden des amerikanischen Kontinents ausbreiten. In Kanada wurden bereits 2001 die ersten WNV infizierten Stechmücken und Vögel nachgewiesen (Drebot et al. 2003) und 2002 wurde der Erreger erstmals bei Pferden in Mexiko gefunden (Estrada-Franco et al. 2003). Serologisch konnte das WNV zeitgleich oder in den folgenden Jahren auch in den meisten anderen latein- und südamerikanischen Ländern nachgewiesen werden.

1.3 Transmission und Vektorbiologie

Das WNV wird als Arbovirus durch Arthropoden-Vektoren, hauptsächlich Stechmücken, übertragen. Der Erreger konnte auch in Zecken nachgewiesen werden (Lawrie et al. 2004, Mumcuoglu et al. 2005). Epidemiologisch kommt der Zecke jedoch bislang keine Bedeutung zu, sie könnte allerdings als Reservoir fungieren (Lawrie et al. 2004).

Das natürliche Vertebraten-Reservoir von WNV sind Vögel. Das Virus zirkuliert innerhalb der Vogelpopulation im sogenannten ruralen Transmissionszyklus durch ornithophile Stechmückenarten als Vektoren (Vogel-Stechmücke-Vogel Zyklus) (Abbildung 3). Wird das Virus durch Brückenvektoren, Arthropoden die ihre Blutnahrung nicht nur von Vögeln sondern auch anderen Vertebraten beziehen, übertragen, spricht man vom urbanen Transmissionszyklus (Hubálek und Halouzka 1999). Brückenvektoren sind für die Infektion

von Menschen und anderen Wirbeltieren notwendig, da deren Infektion üblicherweise nicht wie bei Vögeln zu einer ausreichend hochtitrigen Virämie führt, um damit wiederum eine Stechmücke zu infizieren (Bowen und Nemeth 2007, Hayes 2001). Somit sind Säugetiere und vor allem Pferd und Mensch sogenannte Zufalls- oder Endwirte, auch „incidental hosts“ oder „dead-end hosts“ genannt (McLean et al. 2001).

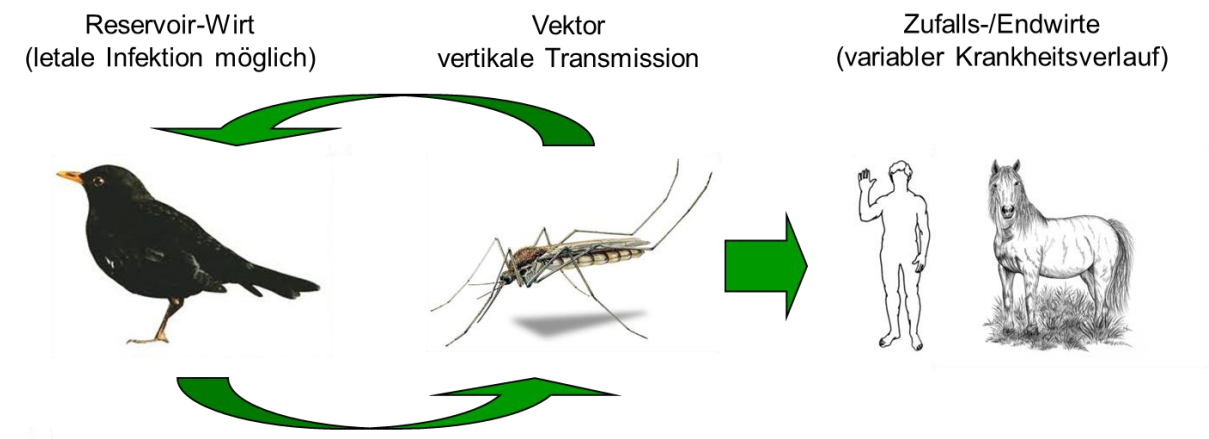


Abbildung 3: Transmissionszyklus des WNV.

Obwohl das WNV ein breites Spektrum an Vektoren besitzt und in über 60 verschiedenen Stechmückenarten nachgewiesen werden konnte, gelten Arten der Gattung *Culex*, vor allem *C. tarsalis* und *C. pipiens* als Hauptüberträger (Turell et al. 2001, Hamer et al. 2008). Beide Mückenarten nehmen sowohl an einer Vielzahl von Vogelspezies, als auch Vertebraten Blut auf und führen so zu einer Übertragung (Reisen et al. 2005).

Bei den Vogelarten zeigen vor allem Sperlingsvögel (Ordnung Passeriformes) wie der Hausspatz (*Passer domesticus*) und Krähen (Familie der Rabenvögel, Corvidae) hohe Empfänglichkeit gegenüber WNV-Infektionen (Komar et al. 2003, Murray et al. 2010). Besonders Vögel, die eine hochtitrige Virämie entwickeln, wie der Blauhäher (*Cyanocitta cristata*), der Hausspatz (*Passer domesticus*) und die Amerikanerkrähe (*Corvus brachyrhynchos*), werden als wichtige Reservoir-Wirte angesehen (Weingartl et al. 2004, Langevin et al. 2005).

Obwohl WNV-Infektionen bereits auch bei anderen Säugetieren, wie z.B. Hunden, Katzen, Kaninchen u.a. detektiert wurden und offenbar nicht selten vorkommen, sind es vor allem Pferde und Menschen, die mit Erkrankungen auf eine Infektion reagieren können.

1.4 Molekularbiologie

1.4.1 Morphologie des WNV

Virionen des WNV sind sphärische, umhüllte Partikel mit einer pseudo-ikosaedrischen Symmetrie und einem Durchmesser von ca. 50 nm. Den Partikeln fehlen Oberflächen-Projektionen oder Spikes (Abbildung 4), die bei anderen umhüllten Viren, wie HIV, Influenza- oder Masernviren, als typisch beobachtet werden (Mukhopadhyay et al. 2003). Das RNA-Genom des WNV wird vom Nukleokapsid umschlossen, das sich aus multiplen Kopien des viralen C-Proteins (Kapsidprotein) zusammensetzt und seinerseits von einer Lipidmembranhülle umgeben ist. Cryo-EM-Untersuchungen zeigen, dass das Kapsid eine ikosaedrische Symmetrie aufweist (Heinz et al. 2000).



Abbildung 4: WNV-Partikel. Links: Struktur eines WNV-Virions, ermittelt durch Cryo-EM. Quelle: Mukhopadhyay et al. 2003. Rechts: Nachweis der Präsenz von WNV-Partikeln im Gewebe durch TEM (Transmissions-EM). Quelle: Cynthia Goldsmith (CDC), CDC Newsroom Image Library.

In der Lipidmembranhülle des Virus sind zwei virale Strukturproteine eingelagert, das E-Protein (Envelope-, Hüllprotein) und das M-Protein (Membranprotein). Das E-Protein stellt das Hauptantigen des Viruspartikels dar und ist sowohl für das Attachment, sowie die Fusion der Membranen während der Penetration in die Wirtszelle notwendig. Das M-Protein entsteht durch proteolytische Spaltung eines Vorläuferproteins, dem sogenannten prM (precursor Membrane)-Protein. Im reifen Virion liegen die E-Proteine flach auf dem Lipid-Bilayer und bilden Homodimere, die mit den M-Proteinen assoziiert sind (Abbildung 5).

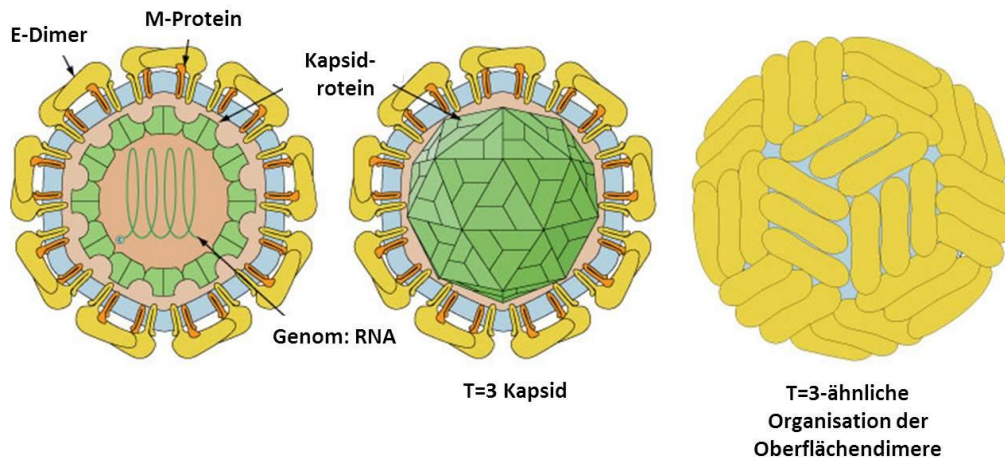


Abbildung 5: Schematischer Aufbau eines WNV-Virions. Die C-Proteine bilden das Kapsid, welches die RNA umhüllt. Die Hüllproteine E und M sind in der Lipidmembran verankert. Modifiziert aus Flavivirus, ViralZone, Swiss Institute of Bioinformatics 2011 (http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/24.html).

1.4.2 Genomorganisation

Als Flavivirus besteht das Genom von WNV aus einer einzelsträngigen RNA mit positiver Polarität, (+)ssRNA, und einer Größe von ~11 kb (Lanciotti et al. 1999, Rice et al. 1985). Das 3'-Ende schließt mit einem konservierten CU_{OH} ab und ist nicht polyadenyliert. An das 5'-Ende wird im Zytoplasma von infizierten Zellen eine Typ 1 Cap-Struktur (m⁷GpppA) angefügt (Castle und Wengler 1987, Wengler und Wengler 1981). An beiden Enden befinden sich nicht kodierende Regionen (noncoding regions, NCR), mit einer Länge von 96 Nukleotiden (5'-NCR) und 631 Nukleotiden (3'-NCR). Dazwischen liegt der einzige offene Leserahmen (open reading frame, ORF) des Genoms, der in zwei Bereiche, Strukturproteine und Nichtstrukturproteine, unterteilt wird (Castle et al. 1986). Der ORF kodiert für ein großes Polyprotein, welches ko- und posttranslational durch virale und verschiedene Zellproteasen in die einzelnen viralen Proteine gespalten wird (Nowak et al. 1989). Die drei Strukturproteine E (Envelope), prM/M (Membran) und C (Kapsid) sind am 5'-Ende lokalisiert, wohingegen die sieben Nichtstrukturproteine (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b und NS5) 3'-terminal liegen (Abbildung 6; Castle et al. 1986, Rice et al. 1985).

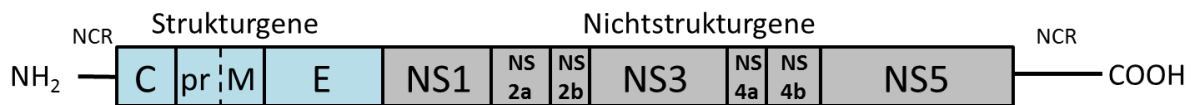


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Genomaufbaus von WNV. Der offene Leserahmen wird in die Bereiche Strukturgene bzw -proteine und Nichtstrukturgene bzw. -proteine unterteilt und das Polyprotein wird während und nach der Translation in die 10 viralen Proteine prozessiert. NCR: Noncoding Region, C: Kapsid, prM/M: preMembran/Membran, E: Envelope, NS1-5: Nichtstrukturproteine1-5.

1.4.3 Replikationszyklus

Die Übertragung des WNV erfolgt durch subkutane Injektion über einen Mückenstich. Zielzellen der primären Replikation sind Keratinozyten und dermale Dendritische Zellen, sowie Langerhans-Zellen (Johnston et al. 2000, Lim et al. 2011, Wu et al. 2000).

Die Aufnahme von WNV in die Wirtszelle erfolgt über Clathrin-abhängige Endozytose (Chu und Ng 2004, Chu et al. 2006). Welche Zelloberflächenproteine als Rezeptoren für das Attachment fungieren, ist bisher noch nicht letztendlich geklärt. Für Dendritische Zellen konnte gezeigt werden, dass die Lektine DC-SIGN und DC-SIGNR auf der Plasmamembran entsprechende Funktionen übernehmen können (Davis et al. 2006, Martina et al. 2008a). Nachdem aber viele Zelltypen von WNV infiziert werden können und nicht alle Zellen DC-SIGN und DC-SIGNR exprimieren, ist es sehr wahrscheinlich, dass noch andere Proteine am Attachment des WNV beteiligt sind. Nach der Endozytose erfolgt eine pH-induzierte Fusion (pH 6,6) der Virionhülle mit der Membran des Endosoms, um das Kapsid freizusetzen. Hierfür ist das E-Protein von besonderer Bedeutung. Durch den niedrigen (sauren) pH-Wert im Inneren des Endosoms kommt es zu einer irreversiblen Konformationsänderung der viralen E-Hüllproteine von Homodimeren zu Trimeren, durch die die Fusion der beiden Membranen vorangetrieben wird (Allison et al. 1995a, Heinz et al. 1994). Nachdem die (+)ssRNA aus dem Kapsid ins Zytoplasma freigesetzt wurde, wird sie als mRNA translatiert und das Polyprotein ko- und posttranslational an multiplen Stellen durch zelluläre und virale Proteasen gespalten, um die reifen viralen Proteine zu erzeugen. Außerdem dient die RNA als Template für die im Translationsschritt erzeugte virale RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5, die Matrizen negativer Polarität generiert, die wiederum als Templates für neue positiv-orientierte RNA-Moleküle dienen. Diese werden dann beim Zusammenbau in die neuen Virionen verpackt (Abbildung 7) oder zur Translation weiterer

Virusproteine herangezogen. Die virale RNA-Synthese bei Flaviviren verläuft asymmetrisch, was bedeutet, dass die Synthese genomischer RNA-Synthese mindestens 10-fach effizienter ist, als die des negativ-orientierten Stranges (Chu und Westaway 1985, Cleaves et al. 1981). In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass Flavivirus-RNA-Replikationskomplexe mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) assoziiert sind (Chu und Westaway 1992, Grun und Brinton 1987, Westaway et al. 1999).

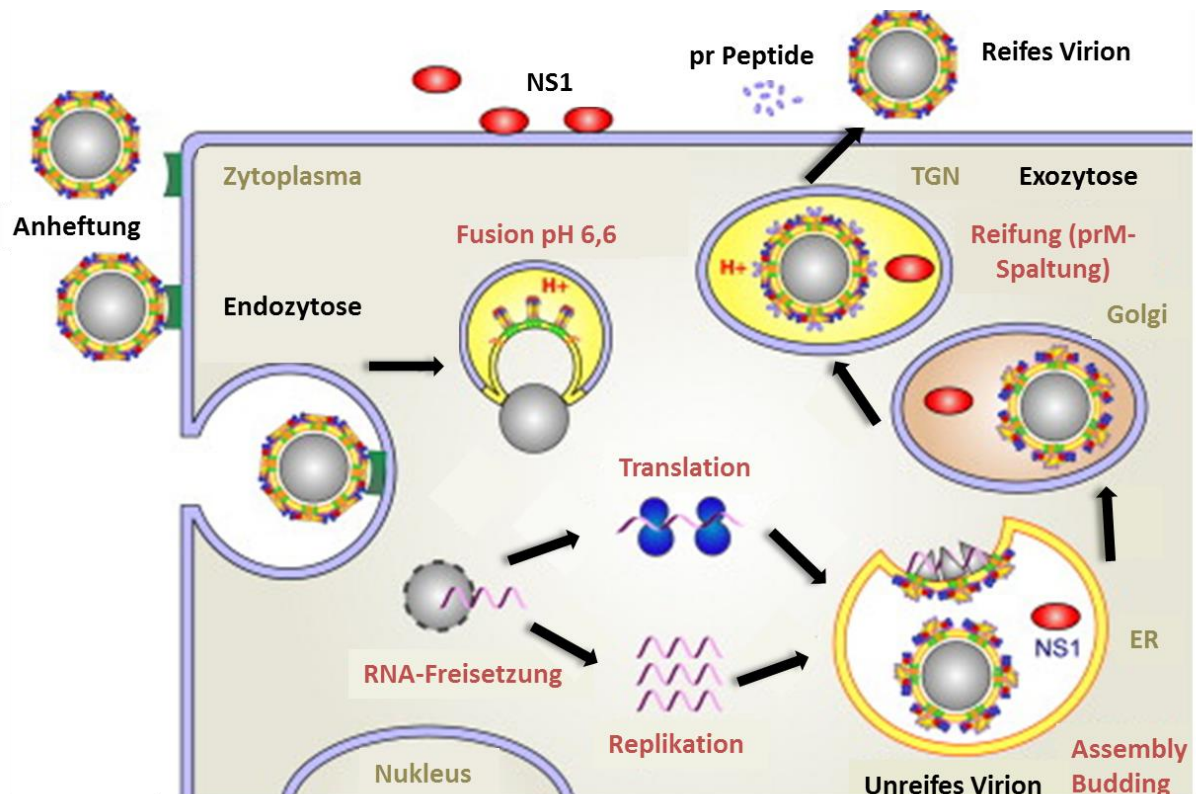


Abbildung 7: Replikationszyklus von WNV. TGN: Trans-Golgi-Netzwerk, ER: Endoplasmatisches Retikulum. Modifiziert nach Heinz und Stiasny 2012.

Die Virion-Morphogenese erfolgt daher hauptsächlich an der ER-Membran, in die sich die translatierten Strukturproteine E und prM einlagern. C-Protein-Dimere interagieren mit der genomischen RNA und prM-E-Heterodimeren, wodurch es zur Bildung des Nukleokapsids kommt. Durch anschließende Einstülpung und Abschnürung der ER-Membran in das Lumen (Budding) werden unreife Viruspartikel geformt. Auf der Virusoberfläche befinden sich nun 180 E- (Kuhn et al. 2002) und genauso viele prM-Proteine in Form von 60 Trimeren aus Heterodimeren (Zhang Y et al. 2003). Die intrazellulären unreifen Virionen akkumulieren in Vesikeln und die Strukturproteine E und prM werden während des Transports durch den Trans-Golgi-Apparat glykosyliert. Bevor die Viruspartikel über Exozytose freigesetzt werden,

unterläuft das prM-Protein einer proteolytischen Spaltung durch eine zelluläre Furin-ähnliche Peptidase (Stadler et al. 1997, Yu et al. 2008). Dabei wird mehr als die Hälfte des N-terminalen Teils des prM-Proteins entfernt, wodurch das reife M-Protein entsteht. Dies führt zur Dissoziation der prM-E-Heterodimere (Allison et al. 1995a, Wengler und Wengler 1989) und zur Bildung der flach an der Virionoberfläche liegenden, E-Homodimere. Die Freisetzung neuer reifer Viren aus infizierten Zellen beginnt 10 bis 12 Stunden nach der Infektion und nach 24 bis 36 Stunden findet man die höchste Konzentration an extrazellulären Viren.

1.4.4 Virale Proteine

Das Genom von WNV enthält in seinem einzigen ORF die Information für 10 virale Proteine, die zunächst als ein großes Vorläuferpolypeptid translatiert werden und von denen drei Strukturproteine und sieben Nichtstrukturproteine darstellen.

Strukturproteine (E, prM/M und C):

Das Hüllprotein E (Envelope) der Flaviviren übernimmt wichtige Funktionen für den Eintritt eines Virions in die Zelle, wie Rezeptorbindung (Crill und Roehrig 2001, Lee et al. 2004) und die pH-induzierte Fusion mit der Endosomenmembran zur Freisetzung des Nukleokapsids ins Zytoplasma. Außerdem induziert es eine schützende Immunantwort und ist das primäre Ziel neutralisierender Antikörper (Colombage et al. 1998, Throsby et al. 2006). Das E-Monomer besteht aus drei Domänen (DI, DII und DIII), die mit flexiblen Gelenken verbunden sind (Kanai et al. 2006, Modis et al. 2003, Mukhopadhyay et al. 2003, Rey et al. 1995). DI ist die zentrale Domäne und wird auf einer Seite von der Dimerisations-Domäne DII, welche das Fusionspeptid beherbergt, flankiert. Auf der anderen Seite befindet sich die immunglobulinähnliche (IgG-like) Domäne DIII, die wahrscheinlich die Rezeptorbindungsstelle enthält (Crill und Roehrig 2001, Mandl et al. 2000).

Auf reifen Flaviviren liegen die E-Proteine als 90 antiparallele Dimere flach gegen die Virionoberfläche und in T=3 pseudo-ikosaedrischer Symmetrie arrangiert vor (Kuhn et al. 2002, Mukhopadhyay et al. 2003).

Das kleinere Hüllprotein M entsteht aus einem Vorläuferprotein prM (precursor Membrane). Kurz vor der Freisetzung des Viruspartikels aus einer infizierten Zelle wird das prM-Protein durch eine zelluläre Protease gespalten, der N-terminale Bereich des Proteins, der pr-Teil, geht verloren und es bleibt ein kleiner C-terminaler Teil (M-Protein) in der Membran verankert zurück. Auf unreifen Viruspartikeln verdeckt das prM-Protein den Fusionsbereich am distalen Ende jedes E-Proteins. Daher wird angenommen, dass eine Aufgabe des prM-Proteins in unreifen Virionen darin liegt, die pH-induzierte Konformationsänderung von E

während des Transports im Trans-Golgi-Netzwerk zu verhindern, da es sonst schon zur Fusion des Viruspartikels mit der Vesikelmembran bei der Exozytose kommen würde (Heinz et al. 1994, Stadler et al. 1997). Des Weiteren dient es wahrscheinlich auch als Chaperon bei der Faltung des E-Proteins (Lorenz et al. 2002) und seine Kosynthese mit E ist ebenso notwendig für dessen Membranassoziation und Assembly (Konishi und Mason 1993).

Das C-Protein ist der einzige Bestandteil des flaviviralen Nukleokapsids. Die strukturelle Basiseinheit zur Bildung eines Kapsids ist ein C-Dimer, dessen Monomere sich aus vier α -Helices zusammensetzen und beim Assembly mit der RNA interagieren (Dokland et al. 2004, Jones et al. 2003, Kiermayr et al. 2004). Die Annahme besteht, dass C-Proteine auch als RNA-Chaperone während des Replikationszyklus fungieren (Ivanyi-Nagy et al. 2008).

Nichtstrukturproteine (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5)

Es wird angenommen, dass alle Nichtstrukturproteine vor allem aber NS1, NS2a, NS3, NS5 und NS4a bei der Replikation der viralen RNA als Teil des sogenannten Replikationskomplexes involviert sind.

NS2a, NS2b, NS4a und NS4b sind kleine, hydrophobe Proteine deren Struktur und Funktion bisher noch nicht gut charakterisiert sind. Es konnte aber gezeigt werden, dass NS2a und NS4a mit dem Replikationskomplex assoziiert sind (Mackenzie et al. 1998).

NS2b formt einen Komplex mit der viralen Serinprotease NS3 und fungiert hier als Protease-Kofaktor, indem seine zentrale Domäne in die NS3 Serinprotease-Domäne interkaliert (Erbel et al. 2006). NS4b ist im Zytosol membranassoziiert, eine Rolle bei der RNA-Replikation konnte noch nicht direkt nachgewiesen werden (Westaway et al. 1997a), es fungiert aber wie NS2a als Interferon-Antagonist (Liu et al. 2006, Munoz-Jordán et al. 2003).

NS3 und NS5 sind die am höchsten konservierten Flavivirusproteine und die bisher am besten charakterisierten Nichtstrukturproteine. Sie fügen sich, wie bereits erwähnt, mit anderen viralen und auch Zellproteinen zum Replikationskomplex zusammen.

NS3 ist ein multifunktionales Protein und kombiniert die Aktivitäten einer Helikase/NTPase, Serinprotease und RNA-Triphosphatase (Assenberg et al. 2009, Borowski et al. 2001).

NS5 ist das größte Nichtstrukturprotein und übernimmt die Funktion der RNA-abhängigen RNA-Polymerase, sowie einer Methyltransferase (Grun und Brinton 1987, Koonin 1993).

NS1 ist ein Glykoprotein und obwohl es hauptsächlich im Zytosol infizierter Zellen zu finden ist, konnte es ebenso auf der Zelloberfläche und im Überstand infizierter Säugerzellen nachgewiesen werden (Smith und Wright 1985). Es wird daher von Zellen sezerniert, jedoch beginnt die Freisetzung von NS1 bei infizierten Vero-Zellen später (16 bis 24 Stunden nach

Infektion) als die Sekretion der ersten reifen Viruspartikel (8 bis 16 Stunden nach Infektion) (Macdonald et al. 2005). Funktionell spielt NS1 durch seine Beteiligung an den viralen Replikationskomplexen bei der WNV-Replikation in infizierten Zellen eine Rolle (Mackenzie et al. 1996, Westaway et al. 1997b).

1.5 WNV-Infektionen bei verschiedenen Wirtsgruppen

1.5.1 Vögel

Vögel sind wichtige Amplifikationswirte und stellen das natürliche Reservoir des Virus dar. Vor allem Sperlingsvögel (Ordnung Passeriformes) sind besonders empfänglich für WNV-Infektionen (Komar et al. 2003). In dieser Tierordnung wiesen insbesondere Rabenvögel (Familie *Corvidae*) nach der Einschleppung von WNV in die USA hohe Mortalitätsraten auf (Eidson et al. 2005, Murray et al. 2010). Experimentelle Infektionen von diversen Vogelordnungen konnten zeigen, dass auch Eulen (Ordnung Strigiformes), Greifvögel (Ordnung Falconiformes) und Regenpfeiferartige (Ordnung Charadriiformes) sehr hohe Virämielevel über mehrere Tage erreichen können. Bei Taubenvögeln (Ordnung Columbiformes), Gänsevögeln (Ordnung Anseriformes) und Spechtvögeln (Ordnung Piciformes) ist die Höhe der Titer sehr viel niedriger und bei Hühnervögeln (Ordnung Galliformes) eindeutig zu gering, um auf blutsaugende Stechmücken übertragen zu werden (Komar et al. 2003). Bis zum heutigen Zeitpunkt hat das CDC über 320 Vogelarten gelistet, die letal mit WNV infiziert werden können (CDC 2013c).

Im Körper eines infizierten Vogels breitet sich das Virus über eine Vielzahl an Organen (Niere, Leber, Haut, Auge, Lungengewebe) und das Nervensystem aus. Dies geht bei besonders empfänglichen Vögeln mit sehr hohen Virämien von bis zu 10^{10} PFU/ml einher (Clark et al. 2006, Komar et al. 2003, Weingartl et al. 2004). Außerdem scheiden infizierte Vögel auch eine nicht unerhebliche Menge an Virus mit ihren Fäkalien aus und könnten so auch zur Übertragung von Vogel zu Vogel beitragen (Kipp et al. 2006, Nemeth et al. 2006). Die virämische Phase ist bei Vögeln von Art zu Art unterschiedlich lang. Sie umfasst aber meist einen Zeitraum von 5 bis 7 Tagen. Die Zeitspanne von Infektion zu Krankheit ist generell eher kurz und in experimentellen Studien starben die meisten Vögel innerhalb einer Woche, oft sogar schon 24 Stunden nach Infektion (Komar et al. 2003). Die Mortalitätsraten sind jedoch von der Anfälligkeit der Vogelarten und der Pathogenität der Virusisolate abhängig (Langevin et al. 2004, Nemeth et al. 2006).

1.5.2 Pferde

Pferde gehören zu den Zufalls- oder Endwirten von WNV, da sie keine ausreichend hohen Virustiter (ca. $10^1 - 10^3$ PFU/ml) im Blut entwickeln, um das Virus bei einem Stich effizient auf eine Stechmücke zu übertragen. Auch ist die Zeitspanne der Virämie im Allgemeinen sehr kurz (Deubel et al. 2001, Bunning et al. 2002). Dennoch sind Pferde im Zusammenhang mit WNV-Infektionen besonders gefährdet. Obwohl die Mehrzahl der Infektionen asymptomatisch oder mit leichter Klinik einhergeht, zeigen einige Tiere klinisch manifeste Erkrankungen. Neben Fieber sind sichtbare Krankheitssymptome einer Enzephalomyelitis, wie Ataxie, Parese, Gliedmaßenschwäche, abnormaler Gang, faszikuläre Zuckungen und Schwierigkeiten beim Aufstehen/Hinlegen, häufig zu beobachten (Ostlund et al. 2001, Ward et al. 2006). WNV-Ausbrüche in Pferdepopulationen gehen mit einer hohen Mortalitätsrate erkrankter Tiere von bis zu 30% - 40% einher (Porter et al. 2003, Ward et al. 2008). Studien mit experimentellen Infektionen von Pferden führten bei 10% - 12% zu Erkrankungen des ZNS, wobei auch hier, wie bei anderen Spezies, diverse Faktoren wie Alter, Impfstatus, Geschlecht eine Rolle bei ernsten oder tödlichen Verläufen spielten (Bunning et al. 2002, Salazar et al. 2004).

Für die gesicherte Diagnose einer WNV-Infektion bei Pferden kommen neben den sichtbaren Symptomen serologische und molekularbiologische Methoden zum Einsatz (Kleiboeker et al. 2004).

1.5.3 Mensch

Menschen sind wie Pferde „Fehlwirte“ des WNV und Hauptinfektionsweg ist der Stich durch blutsaugende, infizierte Stechmücken. Es sind jedoch auch Fälle bekannt, in denen das Virus nachweislich von Mensch zu Mensch übertragen wurde. Hierzu zählen die Transmission des Erregers durch Plasma und Thrombozyten bei Bluttransfusionen (Harrington et al. 2003, Pealer et al. 2003), die Übertragung von der Mutter auf das Kind in der Schwangerschaft über die Plazenta (CDC 2002a, Paisley et al. 2006) und wahrscheinlich die Muttermilch (CDC 2002b, Hayes und O'Leary 2004), sowie bei Organtransplantationen von Spender auf Empfänger (Iwamoto et al. 2003).

Eine WNV-Infektion verläuft in den meisten Fällen (~80%) asymptomatisch. Bei einer von fünf Personen kommt es jedoch zu einer Erkrankung, dem sogenannten West-Nil-Fieber. Diese leichteste Form der Krankheit tritt mit Grippe-ähnlichen Symptomen wie Fieber, allgemeine Schwäche, Kopfschmerzen, Muskelschmerzen, Erythemen, Übelkeit und Erbrechen, in Erscheinung (Watson et al. 2004). Nach der Infektion mit WNV beträgt die

Inkubationszeit bis zum Auftreten der ersten Symptome 2 bis 14 Tage und bei leichteren Verlaufsformen kann die Erkrankung 3 bis 6 Tage andauern (Kramer et al. 2007, Petersen und Marfin 2002).

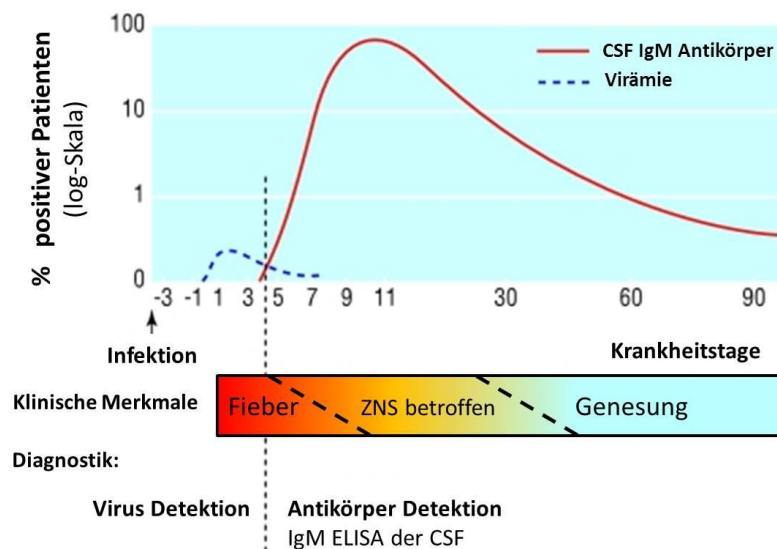


Abbildung 8: Verlauf einer WNV-Enzephalitis beim Menschen. Virämie und Entwicklung von IgM-Antikörpern. CSF: Cerebrospinalflüssigkeit. Modifiziert nach Solomon et al. 2003.

Bei etwa 0,5-1% der Infektionen kommt es zur Entwicklung von schweren neurologischen Erkrankungen (Mostashari et al. 2001, Tsai et al. 1998, Weaver und Barrett 2004), die insbesondere bei Risikopatienten tödlich verlaufen können (Sejvar et al. 2011). Diese schweren Verlaufsformen äußern sich als Enzephalitis (~60%) (Abbildung 8), Meningitis (~40%), seltener AFP (acute flaccid paralysis – schlaffe Lähmung) zusammen mit Symptomen wie Bewusstseinsstörungen, Koordinationsstörungen (Ataxien), Schwindel, Lähmungserscheinungen des Augenmuskels u.a. (Burton et al. 2004, Sejvar et al. 2005, Weiss et al. 2001). Besonders anfällig für schwere, fatale Krankheitsverläufe sind ältere Personen, Menschen mit geschwächtem Immunsystem, Diabetespatienten und Alkoholabhängige (Berner et al. 2002, Bode et al. 2006, Sejvar et al. 2011). Etwa 10% der schweren neuroinvasiven Krankheitsfälle enden tödlich und Genesene sind häufig von länger anhaltenden oder persistierenden Folgeschäden betroffen (Hollidge et al. 2010, Klee et al. 2004).

1.6 WNV und die Immunantwort

1.6.1 Angeborenes Immunsystem

Das schnelle Erkennen eines eingedrungenen Erregers ist ein wesentlicher Bestandteil des gesamten Immunsystems. Die erste Detektion von Viren durch spezielle zelluläre Rezeptoren erfolgt durch das angeborene Immunsystem und ist essentiell für die Einleitung und das Abrufen einer effektiven antiviralen Immunantwort. Diese Rezeptoren sind die sogenannten *pattern recognition receptors* (PRRs). PRRs erkennen konservierte molekulare Pathogenmerkmale, sogenannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), welche fremde Organismen (Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten) von körpereigenen Zellen unterscheiden. Zu den viralen PAMPs zählen virale Nukleinsäuren, wie einzelsträngige RNA, doppelsträngige RNA und doppelsträngige DNA. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass virale Glykoproteine als PAMPs fungieren können (Boehme et al. 2004). Nachdem PRRs virale Komponenten erkannt haben, initiieren sie eine sofortige Immunantwort, die eine Ausbreitung des Virus im Organismus verhindern und gleichzeitig die Erreger-spezifische adaptive Immunantwort induzieren soll. Besonders wichtige Zytokine hierfür sind die Typ-1-Interferone IFN- α und IFN- β , die eine wichtige Rolle, bei der Restriktion der WNV-Ausbreitung auf zellulärer und Gewebeebene einnehmen (Samuel und Diamond 2005). Sie induzieren die Expression multipler Effektormoleküle, eine Reihe anderer Zytokine und interagieren auch mit dem Jak-STAT-Signalweg (Karaghiosoff et al. 2000, Shimoda et al. 2000), Integrinen und dem p53-assoziierten Apoptoseweg (Takaoka et al. 2003). Zwei Beispiele für wichtige PRRs im Zusammenhang mit einer WNV-Infektion sind RIG-I-like Rezeptoren (RLRs) und Toll-like Rezeptoren (TLRs). Die drei zytoplasmatischen RLRs RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1 protein*), MDA-5 (*melanoma-differentiation-associated protein 5*) und LGP2 werden in den meisten Zelltypen des Körpers exprimiert und vor allem RIG-I und MDA-5 sind für eine Immunantwort gegen WNV essentiell, indem sie die Typ-1-Interferonproduktion induzieren (Daffis et al. 2008b, Fredericksen et al. 2004, Fredericksen et al. 2008). RIG-I ist dabei sehr früh während einer Infektion von Bedeutung, während MDA-5 für die Aufrechterhaltung und Verstärkung der angeborenen Immunabwehr benötigt wird (Fredericksen et al. 2008).

Für die Erfassung viraler Strukturen sind von den über 10 vorhandenen TLRs drei (TLR3, TLR7 und TLR8) bei einer WNV-Infektion von Bedeutung (Daffis et al. 2008a, Town et al. 2009). Sie sind in der Lage Nukleinsäuren zu erkennen und überwiegend in den Endosomen lokalisiert (Matsumoto et al. 2003). TLR3 erkennt doppelsträngige RNA (Alexopoulou et al. 2001), wohingegen TLR7 und TLR8 für die Erkennung U- oder GU-reicher einzelsträngiger RNA benötigt werden (Diebold et al. 2004, Heil et al. 2004, Hemmi et al. 2002).

Das Komplementsystem, ein weiterer Teil des angeborenen Immunsystems und bestehend aus einer Reihe von Oberflächenrezeptoren und Serumproteinen, trägt zur Abwehr von WNV bei, indem es eine Neutralisierung und Lyse von Virionen hervorruft und die humorale Immunreaktion verstärkt (Mehlhop et al. 2005, Mehlhop und Diamond 2006).

Weitere Bestandteile des angeborenen Immunsystems wie NK-Zellen (Hershkovitz et al. 2009, Zhang et al. 2010), Neutrophile Leukozyten (Bai et al. 2010, Cantile et al. 2001, Crichton et al. 2004) und $\gamma\delta$ T-Zellen (Wang et al. 2003, Welte et al. 2008) sind an der Reaktion auf eine WNV-Infektion beteiligt.

1.6.2 Adaptives Immunsystem

Die Aktivierung der humoralen und zellulären Immunantwort ist für die weitere effektive Kontrolle der viralen Infektion, die Virusbeseitigung und den Schutz vor erneuter Infektion essentiell.

Im Zuge der humoralen Immunität sind die WNV neutralisierenden Antikörper von besonderer Wichtigkeit. Das E-Protein der Virushülle ist hierbei das Hauptzielantigen (Colombage et al. 1998, Throsby et al. 2006). Es wurden zwar auch Antikörper gegen prM (Vázquez et al. 2002) und das Nichtstrukturprotein NS1 nachgewiesen, jedoch handelte es sich hierbei nicht um neutralisierende Antikörper (Chung et al. 2007).

Die besondere Bedeutung der B-Zell-Effektorantwort im Zusammenhang mit einer WNV-Infektion konnte bereits in mehreren Infektionsstudien nachgewiesen werden. So wurde etwa in B-Zell-defizienten Mäusen oder solchen, die nicht in der Lage waren IgM zu bilden, eine erhöhte Mortalitätsrate ermittelt (Chambers et al. 2008, Diamond et al. 2003a und b). Speziell Immunglobulin M ist für eine frühe Kontrolle einer WNV-Infektion wichtig. Bereits vier Tage nach einer Infektion kann im Serum infizierter Mäuse ein hoher Anteil an neutralisierendem WNV-spezifischem IgM gefunden werden (Diamond et al. 2003b). IgM-spezifische Neutralisierung in einer frühen Phase der Infektion könnte in vielen Fällen beitragen, ein weiteres Ausbreiten des Virus ins ZNS zu verhindern bzw. einzuschränken. Die IgG-Antwort auf eine WNV-Infektion wird erst zu einem späteren Zeitpunkt wirksam, da neutralisierende IgG gegen WNV in der Regel erst 8 bis 15 Tage nach einer Infektion detektiert werden können. Zu diesem Zeitpunkt hat sich das Virus oft bereits aus der Peripherie ins ZNS ausgebreitet (Diamond et al. 2003a, Oliphant et al. 2007). Das E-Protein stellt das primäre Ziel für die Mehrheit der neutralisierenden Antikörper dar. Epitope-Mapping-Studien haben insgesamt über 12 Epitope, verteilt über alle drei strukturellen Domänen des E-Proteins, ermittelt. Die an diese Domänen bindenden Antikörper weisen unterschiedliches Neutralisationspotential auf. Am wirksamsten sind monoklonale Antikörper,

welche an Epitope der Domäne III binden können (Beasley und Barrett 2002, Oliphant et al. 2005, Sánchez et al. 2005).

Die T-Zell-Immunantwort ist ein weiterer wichtiger Bestandteil der adaptiven Immunantwort auf virale Infektionen. CD8⁺ T-Zellen, auch zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) genannt, sind für den Schutz gegen eine WNV-Infektion essentiell (Purtha et al. 2007, Shrestha und Diamond 2004). Ihre Effektorfunktion beruht auf zwei unterschiedlichen Strategien. Zum einen sezernieren sie Zytokine und zum anderen wirken sie zytotoxisch, wodurch es zur Eliminierung einer virusbefallenen Zelle kommt. Die Zytokine schließen Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor (TNF) ein (Brien et al. 2007, Shrestha et al. 2006). Die ausgeschütteten zytotoxischen Proteine sind Granzym B und Perforin (Ramos et al. 2012, Shrestha und Diamond 2006). Es wird angenommen, dass CTL die erfolgreiche Replikation von WNV zusätzlich unterdrücken, indem sie infizierte Zellen durch die Sekretion von Perforin direkt abtöten. Außerdem erfolgt die Zelloberflächenexpression von TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) und eine Interaktion des FasL mit dem Fas-Rezeptor (Shrestha et al. 2012, Shrestha und Diamond 2007). Auch CD4⁺ T-Zellen werden bei der Virusabwehr benötigt. So zeigen Mäuse ohne CD4⁺ T-Zellen oder ohne MHC-II-Moleküle eine höhere Anfälligkeit für experimentelle Infektionen mit WNV (Sitati und Diamond 2006). CD4⁺ T-Zellen helfen B-Zellen bei der Ausbildung der humoralen Immunantwort (Bishop und Hostager 2001), unterstützen die CD8⁺ T-Zell-Antwort, segregieren Zytokine (Sitati und Diamond 2006) und sind auch in der Lage infizierte Zellen direkt zu töten (Heller et al. 2006). Bei der Immunabwehr von WNV-Infektionen ist eine Beteiligung von regulatorischen T-Zellen wahrscheinlich. In einer Studie an Mäusen konnte nach Depletion regulatorischer T-Zellen ein erhöhtes Risiko der Entwicklung von WNV-induzierten Krankheitssymptomen, sowie eine höhere Rate an letalen WNV-Infektionen und eine verstärkte Expansion von CTL beobachtet werden (Lanteri et al. 2009).

1.7 Diagnostik und Behandlung

Der Nachweis einer WNV-Infektion ist mittels verschiedener Methoden möglich. Serologische Tests stellen aber die Hauptmethode zur WNV-Diagnose dar. Diese beruhen auf der Detektion von anti-E Antikörpern (Martin et al. 2002). Hierbei ist allerdings zu beachten, dass bei Antikörpern Kreuzreaktionen mit anderen Flaviviren auftreten können (Calisher et al. 1989, Hirota et al. 2010, Niedrig et al. 2007). Es ist daher notwendig, serologisch positive Ergebnisse mit einem Neutralisationstest zu bestätigen. Als Standardtest wird hierfür meistens der Plaque-Neutralisationstest (Plaque Reduction

Neutralization Test, PRNT₉₀), als Bestätigungstest oder zur Titration, angewendet. Weitere Nachweismöglichkeiten sind der Immunfluoreszenzassay (IFA) (Malan et al. 2003), ELISA oder Westernblot. Zum Nachweis von IgM und IgG sind verschiedene ELISA verfügbar. Für den IgM-Antikörpernachweis im Liquor (Cerebrospinalflüssigkeit) und/oder in Serumproben gibt es sogenannte MAC-ELISA (IgM antibody-capture ELISA). Diese Methode erlaubt die Detektion einer akuten WNV-Infektion, da IgM bereits früh nach der Infektion gebildet werden. Bei schwereren Krankheitsverläufen (Enzephalitis) war es jedoch sogar möglich IgM-Antikörper mehr als ein Jahr nach der Erkrankung zu detektieren (Roehrig et al. 2003). MAC-ELISA sind für Menschen und Pferde validiert (Long et al. 2006, Martin et al. 2000). Auch der indirekte IgG-ELISA ist für die Verwendung von menschlichen Serumproben etabliert und für die Anwendung bei Pferden adaptiert worden (Davis et al. 2001, Johnson et al. 2000).

Ein direkter Nachweis von WNV kann durch die Detektion viraler RNA aus Blut-, Liquor- und Gewebeproben erfolgen. Da die virämische Phase meist ein paar Tage nach einer WNV-Infektion beginnt, nur von kurzer Dauer ist und den sichtbaren Krankheitssymptomen oft vorausgeht (Johnson et al. 2000) gestaltet sich die Virus- oder RNA-Detektion schwieriger je später der Zeitpunkt der Untersuchung. Somit sind direkte Nachweismethoden üblicherweise auf eine frühe Infektionsphase, in der genügend Virusmaterial in den Proben vorhanden ist (Lanciotti et al. 2000), beschränkt (Pkt. 1.5.3, Abbildung 8). Auch die elektronenmikroskopische Darstellung von Viruspartikeln gelingt nur bei ausreichend hohem Virustiter im Untersuchungsmaterial. Möglichkeiten zur direkten WNV-Detektion sind Virusisolierung in der Zellkultur und Plaque-Titration, konventionelle RT-PCR, real-time RT-PCR (Lanciotti et al. 2000, Papin et al. 2004), Antigendetektion (Padgett et al. 2006) und Immunhistochemie (Cantile et al. 2001, Jozan et al. 2003).

Zurzeit gibt es keine effektiven Therapiemöglichkeiten und somit sind nur unterstützend wirkende Behandlungen bei einer Erkrankung möglich. Bei der Suche nach WNV-Inhibitoren sind bisher die vielversprechendsten Ergebnisse mit einer auf Antikörper basierenden Therapie erzielt worden (Ben-Nathan et al. 2003, Ben-Nathan et al. 2009, Engle und Diamond 2003, Julander et al. 2005, Oliphant et al. 2005). Andere Ansätze zur Therapie von WNV-Infektionen sind die Gabe von IFN- α (Samuel und Diamond 2005, Sayao et al. 2004), Nukleinsäure-Inhibitoren (Deas et al. 2007), siRNA (Bai et al. 2005, Kumar et al. 2006) und Small-Molecules-Inhibitoren (Puig-Basagoiti et al. 2005).

1.8 Impfstoffe und Vorbeugung

Im Moment ist noch kein Impfstoff für den Einsatz im Menschen verfügbar. Mehrere Impfstoff-Kandidaten befinden sich gerade in der Entwicklung und werden in klinischen Studien getestet. Davon ist der attenuierte rekombinante Lebendimpfstoff Chimerivax-WN02 von Acambis auf Basis des Gelbfieberevirusimpfstammes YFV-17D am weitesten entwickelt (Biedenbender et al. 2011, Monath et al. 2006). Weitere Ansätze sind rekombinante Subunit-Impfstoffe (Lieberman et al. 2007, Watts et al. 2007), DNA-Vakzine (Ledgerwood et al. 2011, Martin et al. 2007) und ein pseudoinfektöses WNV, genannt RepliVAX WN. Eingeführte Mutationen und/oder Deletionen im viralen C-Strukturprotein sollen dieses Virus daran hindern, nach erfolgreichem Eindringen in eine Zelle, den Replikationszyklus vollständig zu durchlaufen (Nelson et al. 2011, Widman et al. 2009, 2010). Des Weiteren werden virale Vektoren untersucht, wie rekombinantes Kanarienvirus (Minke et al. 2004), Masernvirus-Vektoren (Desprès et al. 2005) und Lentivirus-Vektoren (Iglesias et al. 2006). Neben dem bereits erwähnten Chimerivax-WN02 werden noch andere Varianten von Chimären mit Denguevirus WNV/DEN4 (Plentev et al. 2002, 2006) und DEN2/WNV (Huang et al. 2005) getestet. Auch inaktiviertes Virus und attenuierte WNV-Isolate, wie das KUNV (Hall et al. 2003) werden untersucht. An der Entwicklung von rekombinanten Proteinimpfstoffen wird ebenfalls gearbeitet. Protektive Eigenschaften konnten im Tiermodell für die Ektodomäne und die Domäne DIII des E-Strukturproteins nachgewiesen werden (Chu et al. 2007, Martina et al. 2008b, Wang et al. 2001).

In der Veterinärmedizin sind bereits Vakzinen gegen das WNV zugelassen und kommerziell erhältlich. Ein in Fort Dodge Animal Health (Princeton, USA) entwickelter und durch die European Medicines Agency zugelassener Impfstoff Equip WNV[®] (früher Duvaxyn WNV[®]) besteht aus Formalin-inaktiviertem WNV (Ng et al. 2003). Auf dem Markt befindet sich ein zweiter Impfstoff mit inaktiviertem Virus (Stamm VM-2, West Nile Innovator[®]), dem ein spezielles Adjuvantsystem MetaStim[®] (SP-Öl) zugefügt wurde. Das Adjuvantsystem soll eine Verbesserung der Stimulation des Immunsystems bewirken. Ein weiterer lizenzierter Impfstoff für den Gebrauch im Pferd ist ein Produkt aus WNV und dem Gelbfieberimpfstamm YFV-17D, der sich zurzeit auch in klinischen Studien für die Anwendung beim Menschen befindet und mit der ChimeriVAX-Technologie hergestellt wurde (Guy et al. 2010). Eine auf dem Canarypox-Vektor-Modell basierende Vakzine ist der kommerziell erhältliche Impfstoff ALVAC[®]-WNV (El Garch et al. 2008, Minke et al. 2004). Außerdem ist in den USA eine DNA-Vakzine zugelassen, deren Transfektion in Wirtszellen zur Bildung von VLPs (virus-like particles) führt. Immunisierte Pferde entwickelten WNV-spezifische zelluläre und humorale Immunität (Davis et al. 2001). Diese Zulassung ist jedoch nicht mit den europäischen Standards vergleichbar, da in den Vereinigten Staaten Zulassungen im Veterinärbereich

aufgrund anderer Anforderungen bzw. Beurteilungskriterien, insbesondere bei der Wirksamkeitsprüfung der Impfstoffe, schneller erteilt werden.

Im Moment ist die Hauptstrategie zur Vorbeugung von WNV-Infektionen die Kontrolle von Stechmücken. In den USA haben viele Gesundheitsbehörden Programme ins Leben gerufen, die proaktive und reaktive Strategien verfolgen. Proaktive Programme konzentrieren sich auf die Verhinderung von menschlichen Infektionen durch die Kontrolle und Eindämmung der Mückenpopulationen in Risikogebieten. Haben jedoch bereits Infektionen in größerem Umfang stattgefunden, wird „reaktiv“ versucht, zusätzliche Infektionen zu verhindern (Reisen und Brault 2007). In beiden Fällen kommen Insektizide zum Einsatz. Außerdem wird von Behörden empfohlen sich beim Aufenthalt im Freien durch lange Bekleidung und/oder dem Auftragen von Repellentien zu schützen.

2. MODIFIZIERTES VACCINIAVIRUS ANKARA ALS VEKTORIMPFSTOFF

Der Einsatz von Impfstoffen ist eine wichtige medizinische Errungenschaft. Immunisierte Personen können einen präventiven Schutz gegen den jeweiligen Erreger aufbauen und sind so, bei Kontakt mit dem Pathogen, vor dem Ausbruch einer Erkrankung geschützt. Es gibt diverse Arten von Impfstoffen, wie Totimpfstoffe, Lebendimpfstoffe oder DNA-Impfstoffe. Eine in der letzten Zeit immer mehr in den Fokus der Impfstoffentwicklung geratene Variante sind rekombinante Virusvektoren. Diese Vektorimpfstoffe entstehen dadurch, dass in das Erbgut eines infektiösen Virus fremde Erbinformation, z.B. die eines anderen Virus, Bakteriums oder Einzellers eingebaut wird. Dies bewirkt nach Infektion mit dem Vektorvirus die Expression des Fremd-Gens und ermöglicht im Wirt eine Immunantwort gegen das Fremdantigen. Im Idealfall kann der so hergestellte Impfstoff einen Schutz gegen den Erreger induzieren, dessen Erbgut dem Vektorvirus hinzugefügt wurde, ohne dabei starke Nebenwirkungen auszulösen. Ein wichtiger Vertreter von viralen Vektoren in der Impfstoffentwicklung ist das Modifizierte Vacciniavirus Ankara (MVA) (Kreijtz et al. 2013, Volz und Sutter 2013).

MVA ist ein hoch attenuiertes, zur Familie der Pockenviren gehörendes, Vacciniavirus. Die Poxviridae werden in zwei Unterfamilien aufgeteilt, die Chordopoxvirinae (Wirbeltierpockenviren) und die Entomopoxvirinae (Insektenpockenviren). Neben den Tierpockenspezies (Kuhpocken-, Kaninchenpocken-, Pferdepocken-, Mäusepocken-, Affenpocken- und Kamelpockenvirus) und dem heute ausgerotteten Erreger der menschlichen Pockenerkrankung, dem Variolavirus, werden Vacciniaviren den

Chordopoxvirinae und darin dem Genus der Orthopoxviren zugeordnet (Mayr et al. 1975, Moss 2007). Vacciniaviren (VACV) sind die bisher am intensivsten erforschten Pockenviren. Sie wurden im Rahmen der Pockeneradikationskampagne der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als Impfstoff eingesetzt (Fenner 1982, Hochstein-Mintzel et al. 1975, Stickl et al. 1974). Pockenviren gehören zu den größten bekannten Viren und haben eine ziegelsteinähnliche Form. Im Inneren befindet sich ein hantelförmiges Core (Abbildung 9) mit zwei Lateralkörperchen und das Genom ist ein doppelsträngiges DNA-Molekül. Abhängig vom Reifestatus besitzen sie ein oder zwei Lipidhüllen.

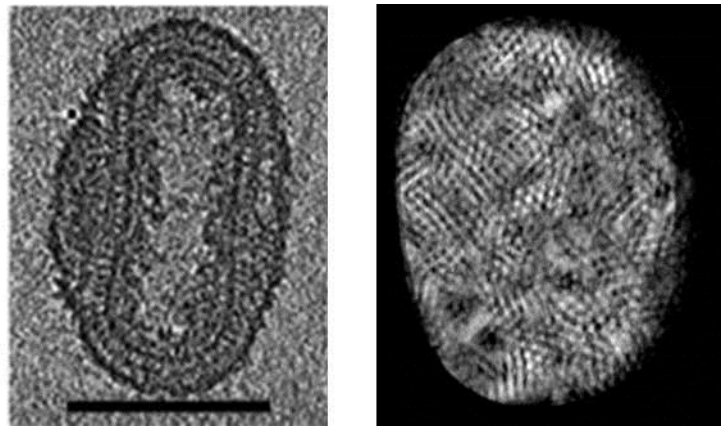


Abbildung 9: Cryo-EM Aufnahmen von Vacciniaviruspartikeln. Maßstabsbalken: 200 nm. Quelle: Cyrklaff et al. 2005.

Das MVA entstand durch über 570 serielle Passagen des Ausgangsvirus CVA (Chorioallantois Vacciniavirus Ankara) auf primären Hühnerembryofibroblasten (CEF, chicken embryo fibroblasts) (Mayr et al. 1975). Während dieser Zeit verlor das Virus etwa 15% (31 Kilobasenpaare; kb) seiner ursprünglichen genetischen Information und sein Genom schrumpfte von 208 kb des Wildtyp CVA auf ~177 kb des heutigen MVA. Die dadurch entstandenen sechs großen Deletionen (Del I – Del VI) im MVA-Genom befinden sich hauptsächlich in den beiden terminalen Regionen des Genoms, der Right und der Left Terminal Region (Abbildung 10) und betreffen überwiegend Gene, die für die Regulation der Virus/Wirt-Interaktion zuständig sind (Meyer et al. 1991, Wyatt et al. 1998). Durch diesen Verlust an genetischer Information entwickelte das MVA einen stark attenuierten Phänotyp (Meyer et al. 1991). Dieser äußert sich darin, dass das Virus nicht mehr oder nur zu einem sehr geringen Ausmaß in der Lage ist, in Säugetierzellen zu replizieren. Das eingeschränkte Wirtsspektrum beschränkt sich fast ausschließlich auf Hühnerembryofibroblasten und die

Hamsterzelllinie BHK-21 (Carroll und Moss 1997, Drexler et al. 1998). Das Virus erwies sich auch *in vivo* bei immunsupprimierten Tieren als nicht-pathogen bzw. avirulent (Mayr et al. 1978, Stittelaar et al. 2001, Werner et al. 1980). Außerdem erfolgte während der 1970er Jahre die Anwendung in großen Feldstudien als Impfstoff gegen das Variolavirus an über 120.000 Impflingen (Mayr et al. 1975, Mayr et al. 1978, Stickl et al. 1974). MVA ist zwar nach wie vor in der Lage Säugerzellen zu infizieren, der Replikationszyklus verläuft aber in nicht-permissiven Zellen abortiv, mit einem Block während der Morphogenese und somit ohne die Generierung neuer Viruspartikel. Wichtig für die Verwendung von MVA als Vektorimpfstoff ist hierbei, dass die virale Genexpression und Proteinsynthese vollständig ablaufen.

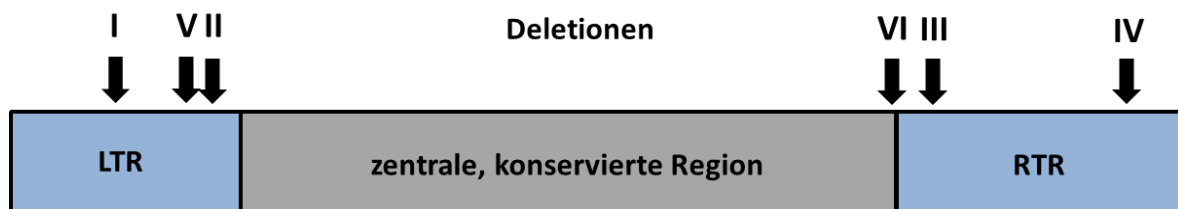


Abbildung 10: Schematische Darstellung des MVA-Genoms. LTR: left terminal region; RTR: right terminal region.

Die Verwendung von MVA als Expressionsvektor und Vektorimpfstoff wurde durch die Attenuierung und besondere biologische Sicherheit des Virus unterstützt. Der Verlust genetischer Information in sehr gut charakterisierten Bereichen des MVA-Genoms ermöglichte es, ausgewählte Deletionsorte zur präzisen Insertion fremder DNA zu verwenden (Drexler et al. 2004, Sutter und Moss 1992).

Aufgrund besonderer Charakteristika, wie biologischer Sicherheit, effizienter Genexpression und Proteinsynthese, Fähigkeit zur Anregung antigenspezifischer Immunantworten, der Möglichkeit fremde Gene stabil zu inserieren und Vektorviren im industriellen Maßstab zu produzieren, erscheint MVA bestens zur Erforschung und Entwicklung neuer rekombinanter Impfstoffe geeignet. Ergebnisse aus zahlreichen Studien in verschiedenen Tiermodellen unterstützen diese Entwicklungen (Amara et al. 2001, Bender et al. 1996, Gherardi et al. 2004, Sutter et al. 1994) und es befinden sich bereits mehrere MVA-Impfstoffe in den klinischen Erprobungsphasen I-III.

3. ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Das WNV hat sich durch seine rasche, weltweite Verbreitung und vor allem durch das mittlerweile auch in Europa erhöhte Risiko von WNV-Infektionen mit schweren Verlaufsformen, sowie einer Zunahme von registrierten Fällen als ein ernstzunehmender Zoonose-Erreger etabliert. Da bisher keine effizienten Therapiemöglichkeiten bzw. für den Einsatz im Menschen zugelassene Impfstoffe verfügbar sind, bleibt die Entwicklung von neuen Impfstoffen ein wichtiges Ziel der infektionsmedizinischen Forschung, um einen bestmöglichen Schutz vor WNV-Infektionen so rasch wie möglich zu gewährleisten.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten rekombinante Vektorimpfstoffe gegen das WNV auf Basis des Modifizierten Vacciniavirus Ankara (MVA) entwickelt und vergleichend charakterisiert werden. Daraus sollte sich die Möglichkeit ergeben, für die weitere Impfstoffentwicklung geeignete Kandidaten auszuwählen. Hierfür galt es zunächst die Zielantigene des WNV zu ermitteln und verschiedene Antigen-Varianten als Genkonstrukte anzufertigen. Diese sollten zur Herstellung rekombinanter MVA verwendet werden. Nach der Konstruktion, klonaler Isolierung und Amplifikation ausgewählter rekombinanter Virusvektoren sollten diese einer eingehenden *in vitro* Charakterisierung unterzogen werden und danach eine Analyse der Immunogenität der Impfstoffe im Mausmodell erfolgen.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
Aceton	Carl Roth (Karlsruhe)
Acrylamid/Bisacrylamid	Carl Roth (Karlsruhe)
Agarose peqGOLD	PeqLab (Erlangen)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
Ampicillin	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
BSA	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
DMSO	Carl Roth (Karlsruhe)
EDTA	Roche (Mannheim)
Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Fluorescent Mounting Medium	Dako North America Inc. (Carpinteria, USA)
Gel Red	Biotrend (Köln)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Glycin	AppliChem (Darmstadt)
Ionomycin	Merck Biosciences (Schwalbach)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Magermilchpulver	AppliChem (Darmstadt)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumacetat	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
PMA (Phorbol-12-myristad-13-acetat)	Merck Biosciences (Schwalbach)
Proteaseinhibitor	Roche Diagnostics (Penzberg)
Proteinase K	Merck (Darmstadt)
Red Blood Cell Lysis Buffer	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
Roti-Load1 Protein-Probenauftragspuffer	Carl Roth (Karlsruhe)
TEMED	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin)	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
Tris	Appli Chem (Darmstadt)
TrueBlue Peroxidase Reagent	KPL (Gaithersburg, USA)
Tween-20	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
Stop Reagent für TMB-Substrat (450 nm)	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
1 kb DNA Ladder	New England Biolabs (Schwalbach)

Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien sowie deren Bezugsquelle

2. PUFFER UND LÖSUNGEN

Bezeichnung	Zusammensetzung
36% (v/v) Sucrose	208 g Sucrose auf 500 ml mit 10mM Tris pH 9 sterilfiltriert
Blockinglösung Westernblot	100 ml PBS 5% (w/v) Magermilchpulver 0,05% (v/v) Tween-20
Blockingpuffer ELISA	150 ml PBS 7,5 g Sucrose 1,5 g BSA
Blottingpuffer (= Transferpuffer) Westernblot	80 ml Towbin-Puffer 200 ml Methanol auf 1 L mit Reinstwasser aufgefüllt
Impfstoffpuffer	140 mM NaCl auf 500 ml mit 10 mM Tris autoklaviert pH 7,4
LB-Medium	1% Trypton 1% NaCl 0,5% Hefeextrakt in Aqua dest. autoklaviert
PBS	1,5 mM KH_2PO_4 0,8 mM Na_2HPO_4 137 mM NaCl 3 mM KCl pH 7,4
PBS-T	1 L PBS 0,05% Tween-20
Proteinase K	1 mg/ml in 1,5 M Kalziumchlorid
SDS-Lysepuffer (1-fach)	62,5 mM Tris-HCl 0,01% (w/v) Bromphenolblau 2% (w/v) SDS 3,2% (v/v) β -Mercaptoethanol 10% (v/v) Glycerin pH 6,8
SDS-PAGE-Laufpuffer (5-fach)	72,5 g Glycin 15,2 g Tris 25 ml SDS (20%) auf 1 L mit Reinstwasser aufgefüllt
TAE-Puffer (20-fach)	0,32 M Tris 2,3% (v/v) Essigsäure 25 mM EDTA pH 8,0
TEN-Puffer (10-fach)	1 mM NaCl 10 mM EDTA 100 mM Tris pH 7,5

Towbin-Puffer	24 g Tris 112,6 g Glycin auf 1 L mit Reinstwasser aufgefüllt
Tris	10 mM bis 2 M, diverse pH-Werte

Tabelle 4: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen sowie deren Zusammensetzung

3. KOMMERZIELLE KITS

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
mIFN- γ ELISpot	Mabtech (Nacka Strand, Schweden)
NucleoBond Xtra Midi Plus	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoSpin BloodQuickPure DNA-Extraktion	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel (Düren)
SuperSignal West Dura Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific (Rockford, USA)
X-tremeGene HP DNA Transfection Reagent	Roche (Mannheim)
PNGase F Deglykosylierungskit	New England Biolabs (Schwalbach)

Tabelle 5: Liste der verwendeten kommerziell erhältlichen Kits

4. NÄHRMEDIEN UND ZUSÄTZE

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) inkl. L-Glutamin	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
FCS (fötales Kälberserumalbumin)	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
HEPES	PAA Laboratoires (Cölbe)
MEM (Minimum Essential Medium) inkl. L-Glutamin	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
NEAA (Nicht Essentielle Aminosäuren)	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
Penizillin/Streptomycin (100x)	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
RPMI-1640	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)

Tabelle 6: Liste der verwendeten Nährmedien, der Zusätze und deren Hersteller

5. ZELLINIEN

Bezeichnung	Beschreibung	Medium
CEF	Primäre Hühnerembryo-fibroblasten aus bebrüteten SPF-Hühnereiern	MEM (+ L-Glutamin) 10% FCS Kulturmedium / 2% FCS Infektionsmedium 1% Pen/Strep 1% NEAA
DF-1	Hühnerembryofibroblastenzelllinie	DMEM (+ L-Glutamin) 10% FCS Kulturmedium / 2% FCS Infektionsmedium 1% Pen/Strep 1% NEAA 1% HEPES
Equine Fibroblasten	Primäre Pferdefibroblasten aus Cornea	DMEM (+ L-Glutamin) 10% FCS Kulturmedium / 2 % FCS Infektionsmedium 1% Pen/Strep 1% NEAA 1% HEPES
HaCaT	Humane Keratinozytenzelllinie	DMEM (+ L-Glutamin) 10% FCS Kulturmedium / 2% FCS Infektionsmedium 1% Pen/Strep 1% NEAA 1% HEPES
HeLa	Humane Epithelzelllinie	MEM (+ L-Glutamin) 10% FCS Kulturmedium / 2% FCS Infektionsmedium 1% Pen/Strep 1% NEAA

Tabelle 7: Liste der verwendeten Zelllinien und deren Kultivierungsmedium

6. BAKTERIEN

Die in dieser Dissertation durchgeführten Arbeiten mit Bakterien wurden alle mit dem chemisch kompetenten *Escherichia Coli*-Stamm TOP10 NEB 10 beta competent high efficiency der Firma New England Biolabs ausgeführt.

7. PLASMIDE

Bezeichnung	Konstruktion	Herkunft
pIIIH5RedK1L	Ausgangsvektor mit dem Selektionsmarker mCherry zwischen MVA-DelIII-Flank1 und Flank1-repeat	Prof. Dr. Gerd Sutter
pIIIH5RedK1L-WNV _{Esol}	Ausgangsvektor mit der Gensequenz des WNV E-Proteins ohne dessen TM* zwischen MVA-DelIII-Flank2 und Flank1-repeat	GeneArt (Regensburg)
pIIIH5RedK1L-WNV _{ETMC}	Ausgangsvektor mit der Gensequenz des WNV E-Proteins, dessen TM* durch jene des E2-Proteins aus CHIKV ersetzt wurde, zwischen MVA-DelIII-Flank2 und Flank1-repeat	GeneArt (Regensburg)
pIIIH5RedK1L-WNV _{ETMV}	Ausgangsvektor mit der Gensequenz des WNV E-Proteins, dessen TM* durch jene des A56-Proteins aus VACV ersetzt wurde, zwischen MVA-DelIII-Flank2 und Flank1-repeat	GeneArt (Regensburg)
pIIIH5RedK1L-WNVprME ₁	Ausgangsvektor mit den Gensequenzen der WNV Proteine prM und E zwischen MVA-DelIII-Flank2 und Flank1-repeat, die Codon Usage wurde auf VACV optimiert	GeneArt (Regensburg)
pIIIH5RedK1L-WNVprME ₂	Ausgangsvektor mit den Gensequenzen der WNV Proteine prM und E zwischen MVA-DelIII-Flank2 und Flank1-repeat, ohne Optimierung der Codon Usage	GeneArt (Regensburg)

*Transmembrandomäne

Tabelle 8: Liste der verwendeten Plasmide, deren Zusammensetzung und deren Herkunft

8. ENZYME

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Schwalbach)
PNGase F	New England Biolabs (Schwalbach)
Taq DNA Polymerase	Life Technologies (Darmstadt)

Tabelle 9: Liste der verwendeten Enzyme sowie deren Bezugsquelle

9. VIREN

Bezeichnung	Charakteristik	Herkunft
MVA-F6	Wildtypvirus, Isolat F6	Prof. Dr. Gerd Sutter
MVA-WNV _{prME1}	Rekombinantes MVA-F6 mit den (auf VACV codon-optimierten) prME-Sequenzen von WNV-NY99 in Del III integriert; unter der Kontrolle des Promotors PmH5	hergestellt in dieser Arbeit
MVA-WNV _{prME2}	Rekombinantes MVA-F6 mit den prME-Sequenzen von WNV-NY99 in Del III integriert; unter der Kontrolle des Promotors PmH5	hergestellt in dieser Arbeit
MVA-WNV _{Esol}	Rekombinantes MVA-F6 mit der Sequenz des E-Proteins von WNV-NY99 ohne dessen TM* in Del III integriert; unter der Kontrolle des Promotors PmH5	hergestellt in dieser Arbeit
MVA-WNV _{ETMC}	Rekombinantes MVA-F6 mit der Sequenz des E-Proteins von WNV-NY99, dessen TM* durch jene des E2-Proteins aus CHIKV ersetzt wurde, in Del III integriert; unter der Kontrolle des Promotors PmH5	hergestellt in dieser Arbeit
MVA-WNV _{ETMV}	Rekombinantes MVA-F6 mit der Sequenz des E-Proteins von WNV-NY99, dessen TM* durch jene des A56-Proteins aus VACV ersetzt wurde, in Del III integriert; unter der Kontrolle des Promotors PmH5	hergestellt in dieser Arbeit

*Transmembrandomäne

Tabelle 10: Liste der verwendeten Viren und ihrer Charakteristika

10. ANTIKÖRPER

10.1 Nicht-konjugierte Antikörper

Bezeichnung	Spezifität	Herkunft	Arbeitsverdünnung	Bezugsquelle
Anti-Actin	Maus Actin	Kaninchen monoklonal	1:2000	Sigma-Aldrich (St. Louis)
Anti-VACV Lister	VACV Virionen	Kaninchen polyklonal	1:2000	Acris Antibodies (Herford)
Anti-WNV Clone 7H2	West-Nil-Virus Protein E	Maus monoklonal	1:10000	BioReliance (Rockville, USA)

Tabelle 11: Liste der verwendeten nicht-konjugierten Antikörper

10.2 Konjugierte Antikörper

Bezeichnung	Spezifität	Herkunft	Markierung	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-Mouse IgG	Maus IgG	Ziege polyklonal	POD	1:10000	Sigma-Aldrich (St. Louis)
POD-conjugated AffiniPure	Kaninchen IgG	Ziege polyklonal	POD	1:5000	Dianova (Hamburg)
Alexa Fluor 488 F(ab) ₂ fragment	Maus IgG	Ziege polyklonal	Alexa Fluor 488	1:1000	Life Technologies (Darmstadt)

Tabelle 12: Liste der verwendeten konjugierten Antikörper

11. SYNTHETISCHE OLIGONUCLEOTIDE (PRIMER)

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) nach Auftrag synthetisiert und geliefert.

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Verwendung
III-3' III-5'	GTACCGGCATCTCTAGCAGT TGACGAGCTTCCGAGTTCC	Primerpaar für die Flank-PCR der Del III in MVA
prMME-31 prMME-32	CACTTCTCGGTTTACAATCTACTG GACAGTAAACGCGACAGATGTAAC	Primerpaar für die Kontroll-PCR zur Insertion von prME ₁ in Del III
prMME-for prMME-rev	TGTGTGATCCAAGACATTCCTC TGAGAAACCCTGGATATGCTCT	Primerpaar für die Kontroll-PCR zur Insertion von prME ₂ in Del III
WNVE-for WNVE-rev	CATGTCCTGTATCAGCTGGTGT CTTGGAGTCATCCACAATTTGA	Primerpaar für die Kontroll-PCR zur Insertion von E in Del III
C7L-for C7L-rev	CATGGACTCATAATCTCTATAC ATGGGTATACAGCACGAATTC	Primerpaar für die C7L-Kontroll-PCR

Tabelle 13: Liste der verwendeten Primerpaare, deren Sequenz und Verwendungszweck

12. SYNTHETISCHE OLIGOPEPTIDE

Die verwendeten Oligopeptide wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific bezogen.

Bezeichnung	Aminosäureposition	Aminosäuresequenz	Herkunft
SVG9	430 - 438	SVGGVFTSV	WNV E-Protein

Tabelle 14: Liste der verwendeten Oligopeptide, deren Sequenz und Ursprung

13. MÄUSE

Bezeichnung/Mausstamm	Charakteristika	Bezugsquelle
BALB/c	Wildtyp-Stamm ingezüchtet; MHC-Haplotyp: H-2K ^d	Charles River (Sulzfeld)
HLA-A2.1/HLA-DR1-transgen	Die Tiere präsentieren Antigene nur über die humanen MHC Klasse I: HLA-A*0201 und MHC Klasse II: HLA-DR1 Moleküle.	Charles River (Sulzfeld) / Institut Pasteur (Paris)

Tabelle 15: Liste der verwendeten Mausstämme sowie deren Bezugsquelle

14. VERBRAUCHSMATERIAL

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
Filterpapier	Whatman (Maidstone, USA)
Einwegpipetten (1 – 25 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Entsorgungsbeutel	Carl Roth (Karlsruhe)
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Filterspitzen (10 – 1000 µl)	Sarstedt (Nümbrecht)
Flächendesinfektionsmittel SafeSept	Henry Schein (Melville, USA)
MaxiSorp flat-bottom ELISA-Platten	Nunc GmbH (Langenselbold)
PVDF-Transfermembran	VWR (Darmstadt)
PCR-Reagiergefäße Multiply (0,2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Reagiergefäße SafeSeal (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Sterilfilter	Millipore Corp. (Bedford, USA)
Zellkulturplatten (6-,12-,96-Loch)	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturflaschen (75 cm ² , 175 cm ²)	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellsiebe 70 µm	BD Biosciences (Heidelberg)
Zellstofftücher	Henry Schein (Melville, USA)

Tabelle 16: Liste des verwendeten Verbrauchsmaterials sowie dessen Bezugsquelle

15. SOFTWARE

Bezeichnung	Anbieter
Adobe Reader 9	Adobe Systems (San Jose, USA)
A-EL-VIS ELISpot-Software	A.EL.VIS GmbH (Hannover)
DNASTAR Lasergene 7	DNASTAR Inc. (Madison, USA)
GraphPad Prism 5.04	GraphPad Software (La Jolla, USA)
Magellan ELISA-Data Analysis Software	Tecan GmbH (Crailsheim)
Microsoft Office 2010	Microsoft Corp. (Redmond, USA)

Tabelle 17: Liste der verwendeten Software und deren Anbieter

16. GERÄTELISTE

Bezeichnung	Modell/Typ	Hersteller/Bezugsquelle
Blotting-Kammern	Mini Trans Blot	Bio-Rad (München)
Brutschränke	Galaxy 170S	New Brunswick (Enfield, USA)
Chemilumineszenzimager	MicroChemi	DNR Bio-Imaging Systems (Jerusalem, Israel)
Eierbrutschrank	BSS 300	Grumbach Brutgeräte (Asslar)

ELISA-Reader	Tecan Sunrise	Tecan GmbH (Crailsheim)
Flockeneisbereiter	KF75	Migel (Mailand, Italien)
Gefrierschrank (-20 °C)	Comfort	Liebherr (Ochsenhausen)
Gefrierschrank (-80 °C)	U101 innova	New Brunswick Scientific (Enfield, USA)
Gelkammern	Mighty Small II	GE Healthcare (Richmond, USA)
Kühlschrank (4 °C)	Economic ProfiLine	Bosch (München) Liebherr (Ochsenhausen)
Mehrkanalpipette	Research	Eppendorf (Hamburg)
Mikropipetten (10 – 1000)	Research plus	Eppendorf (Hamburg)
Mikroskope	MBL 3200 Axiovert 25 Axio CSM 700	A.Krüss Optronic (Hamburg) Carl Zeiss (Oberkochen) Carl Zeiss (Oberkochen)
Mikrowellenherd	800 W	Panasonic (Japan)
Netzgeräte	PowerPac 300 PowerPac Basic	Bio-Rad (München) Bio-Rad (München)
PCR-Cycler	PTC-200	MJ Research (Quebec, Kanada)
pH-Meter	pH Checker	HANNA instruments (Woonsocket, USA)
Pipettierhilfe	Pipetboy acu	Integra Biosciences (Fernwald)
Scanner Elispot-Reader	Perfection V700	Epson (Nagano)
Schierlampe	Blohm	Bruja (Hammelburg)
Schüttler/Roller	Platform Rocker STR6 Rocker Platform comp Roller RS-TR05	Bibby Scientific (Staffordshire, UK) Bellco Glass (Vineland, USA) Phoenix Instrument (Garbsen)
Sterilbänke	HERAsafe UVF	Heraeus (Hanau) BDK (Sonnenbühl-Genkingen)
Thermoschüttler	comfort 5436	Eppendorf (Hamburg) Eppendorf (Hamburg)
Ultraschallgerät	Sonopuls HD2200	Bandelin (Berlin)
Vortex-Schüttler	G560	Scientific Industries (NY, USA)
Waage	Mprove	Sartorius (Göttingen)
Zellzählkammer	Neubauer improved	Assistent (Sondheim/Röhn)
Zentrifugen	3-16PK Centrifuge 5417R Centrifuge 5415D Anvanti J-26 XP Optima LE-80K ZU	Sigma (Osterode am Harz) Eppendorf (Hamburg) Eppendorf (Hamburg) Beckman (München) Beckman (München)

Tabelle 18: Liste der verwendeten Geräte und deren Hersteller

17. ZELLKULTUR

17.1 Präparation von CEF-Zellen (primäre Hühnerembryofibroblasten, Chicken Embryo Fibroblasts)

Die Präparation der Hühnerembryofibroblasten erfolgte aus 11 Tage bebrüteten spezifisch-Pathogen-freien (SPF) Eiern. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 50% relativer Luftfeuchtigkeit, die Eier wurden regelmäßig gedreht. Nach dem Schieren wurden die Embryonen steril aus dem Ei entnommen und der Kopf sowie die Beine abgetrennt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die mechanische Zerkleinerung der Embryonen mittels einer kleinen Schere. Die daraus entstandene Masse wurde in einen Erlenmeyerkolben überführt, je Embryo 5 ml Trypsin-EDTA zugegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Magnetrührer bei ca. 250 rpm inkubiert. Nach dem Absetzen der unverdauten Gewebeteile wurde der Überstand über sterile Gaze filtriert, in 50 ml Falcons überführt und bei 1500 rpm für 7 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die so entstandenen Pellets wurden zusammengeführt, in frischem Medium (2,5 ml pro Embryo) resuspendiert und die je nach gewünschter Zelldichte ($\frac{1}{4}$ bis 1 Embryo/Flasche) in 175 cm² Zellkulturflaschen ausgesät.

17.2 Präparation von Milzzellen

Zur Gewinnung der Milzzellen wurden die Mäuse zuerst mit Isofluran narkotisiert und danach durch zervikale Dislokation getötet. Nach steriler Entnahme der Milzen wurden diese in eine Petrischale mit 5 ml Medium (RPMI-1640) überführt, jede Milz mittels eines separaten Zellsiebs mit der Porengröße 70 µm durch Reibung homogenisiert und die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Nach der Zentrifugation der Zellsuspension für 5 Minuten bei 1200 rpm wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 5 ml „Red blood cell lysis buffer“ resuspendiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt diente der Lyse vorhandener Erythrozyten im Zellpellet. Anschließend wurden 5 ml Medium zum Stoppen der Reaktion zugegeben und ein weiterer Zentrifugationsschritt von 5 Minuten bei 1200 rpm durchgeführt. Das so erhaltene Pellet wurde nach zweimaligem Waschen in 5 ml Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt (Pkt. 17.5). Zur Verwendung für eine ELISpot-Analyse wurden 2×10^4 Zellen pro Vertiefung einer 96-well-ELISpot-Platte ausgesät.

17.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Kryokonservierung von Zellen erfolgte in Einfriermedium, das aus 90% v/v FCS und 10% v/v DMSO bestand. Die Zellen einer 175 cm² Zellkulturflasche wurden mit PBS gewaschen, abgelöst und für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wurde in 1 ml des Einfriermediums resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Anschließend erfolgte ein rasches Abkühlen durch eine mindestens zweistündige Aufbewahrung des Röhrchens bei -80°C und nachfolgende Lagerung im Stickstoff-Lagertank bei -180°C in der Gasphase.

Das Auftauen der Zellen erfolgte durch Erwärmen bei Raumtemperatur und Zugabe von Kulturmedium mit anschließender Zentrifugation für 5 Minuten bei 1200 rpm. Nach Aufnahme des erhaltenen Zellpellets in Medium wurde die Zellsuspension in 75 oder 175 cm² Zellkulturflaschen überführt.

17.4 Kultivierung und Passagierung permanenter Zelllinien

Die Kultivierung permanenter eukaryotischer Zelllinien erfolgte in Zellkulturflaschen gewünschter Größe (meist 175 cm²) in Brutschränken mit einer 5%igen CO₂ Atmosphäre, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90% und einer Temperatur von 37°C.

Für das Passagieren der Zelllinien wurde das Medium entfernt und der Zellmonolayer mit auf 37°C vorgewärmtem Trypsin-EDTA (ca. 10 ml Trypsin pro 175 cm² Zellkulturflasche) 5 Minuten inkubiert. Die so abgelösten Zellen wurden resuspendiert und je nach gewünschtem Teilungsverhältnis in neue Zellkulturflaschen mit frischem Medium überführt. Das Passagieren der Zellen erfolgte alle 3 – 5 Tage.

17.5 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Zählkammer des Typs „Neubauer improved“ bestimmt. Es wurden 4 große Quadrate der Zählkammer ausgezählt und die Berechnung der Zellzahl erfolgte folgendermaßen:

$\sum \text{der gezählten Zellen aller Quadrate} / 4 = \text{Mittelwert der Zellzahl pro Quadrat}$ $\text{Mittelwert der Zellzahl pro Quadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 \text{ (Kammerfaktor)} = \text{Zellzahl/ml}$ $\text{Zellzahl/ml} \times \text{Volumen der Zellsuspension} = \text{Gesamtzellzahl}$

18. MOLEKULAR- UND MIKROBIOLOGISCHE METHODEN

18.1 Amplifikation von Plasmid-DNA

18.1.1 Transformation von *E. coli*

Um die Plasmide zu amplifizieren, wurden diese mittels Hitzeschock-Methode in kompetente *E. coli*-Stämme eingeschleust. Hierfür wurden zunächst 50 µl der Bakterien auf Eis aufgetaut und 1 – 10 ng Plasmid-DNA hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten auf Eis erfolgte die Hitzeschockbehandlung für 50 Sekunden bei 42°C, wodurch sich kleine, kurzzeitige Öffnungen der Zellwand ergeben, die das Eindringen der Plasmid-DNA in das Bakterium ermöglichen. Danach wurde das Reaktionsgemisch für 2 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend das 10-fache Volumen SOC-Medium hinzugegeben. Um die Expression der plasmidkodierten Antibiotikaresistenz zu gewährleisten, wurde die Bakteriensuspension für eine Stunde bei 37°C unter leichtem Schütteln vorkultiviert. Nach Einengung des Transformationsansatzes auf ein geringeres Volumen durch Zentrifugation erfolgte das Ausplattieren auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten und deren Inkubation über Nacht bei 37°C.

18.1.2 Animpfen von Flüssigkulturen zur Präparation von Plasmid-DNA

Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu generieren, wurden ein oder mehrere der über Nacht auf den Agarplatten gewachsenen Klone mittels steriler Pipettenspitzen gepickt, jeweils in 3 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt und über Nacht bei 37°C in einem Schüttelinkubator kultiviert. Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 11000 rpm erfolgte die Isolation der Plasmid-DNA (siehe 18.2.1) oder eine weitere Vermehrung durch Überimpfen von 100 µl dieser ersten Flüssigkultur in einen neuen Glaskolben mit 300 ml frischem antibiotikahaltigem LB-Medium und erneuter Schüttelinkubation über Nacht bei 37°C. Die so erhaltene Bakteriensuspension wurde mittels Zentrifugation für 15 min bei 4500 rpm geerntet und die Plasmid-DNA, wie unter 18.2.1 beschrieben, isoliert.

18.2 DNA-Methoden

18.2.1 Präparation von Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA aus Flüssigkulturen zu isolieren, wurden die Bakterienzellen mittels alkalischer Lyse aufgebrochen und die DNA anschließend über Silica-Säulen gereinigt. Dies

erfolgte unter der Verwendung hierfür kommerziell erhältlicher Kits (MN NucleoSpin® Plasmid und MN NucleoBond® Xtra Midi Plus) laut Herstellerangaben.

18.2.2 Präparation viraler DNA

Die Extraktion viraler DNA erfolgte mittels des kommerziell erhältlichen Kits MN NucleoSpin® BloodQuickPure. Zunächst wurden hierfür Zellen eines Lochs einer 6-well-Platte mit einer MOI von 10 infiziert und für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit einem Zellschaber gelöst und zusammen mit dem Kulturmedium in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation für 1 Minute bei 13000 rpm wurde das Volumen des Überstandes auf 200 µl reduziert und die Zellen darin resuspendiert. Anschließend wurde die DNA wie vom Hersteller angegeben isoliert. Die Elution der DNA erfolgte in 50 µl Reinstwasser.

18.2.3 Restriktionsanalyse

Der Gebrauch von Restriktionsendonukleasen erfolgte im Rahmen der Qualitätskontrolle von Plasmiden. Zur Durchführung der Restriktionsanalyse wurden Enzyme der Firma NEB nach Herstellerangaben verwendet. Dazu wurde 1 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 1 Stunde bei 37°C verdaut. Die hierbei entstandenen Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und analysiert (siehe 18.2.4).

18.2.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese

In dieser Arbeit wurden 1%ige Agarosegele verwendet. Zunächst wurde die Agarose in 1 x TAE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst, mit 1,5 µl „Gel Red“ pro 100 ml versehen und in die dafür vorgesehenen Kammern gegossen. Der im „Gel Red“ enthaltene Farbstoff interkaliert in die DNA und fluoresziert durch Anregung mit UV-Licht, wodurch DNA-Banden sichtbar werden. Die zu analysierenden DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen Ladepuffer versehen und nach dem Abkühlen der Gele bei Raumtemperatur in die Geltaschen pipettiert. Für die Interpretation des Ergebnisses wurden zu den Proben noch kommerziell erhältliche Größenstandards auf die Gele aufgetragen. In den meisten Fällen war dies eine 1 kb DNA Leiter der Firma NEB.

Die Auftrennung erfolgte bei 90 – 110V. Die DNA-Banden wurden durch Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm sichtbar gemacht und durch Fotografieren mittels Digitalkamera dokumentiert.

18.3 PCR (Polymerasekettenreaktion)

Zur Überprüfung von Virus-Klonen während der Generierung der rekombinanten MVA und zur finalen Überprüfung des sucrosegereinigten Virusstocks wurden PCRs mit *Taq*-Polymerase durchgeführt. Verwendung hierfür fanden PCR-Thermocycler des Typs PTC-200. Das Standardreaktionsvolumen betrug 25 µl pro Reaktion. Für eine Standard-PCR zur Untersuchung viraler DNA wurden folgende Protokolle angewendet:

Einfacher Reaktionsansatz:

Komponente	Menge je Reaktionsgefäß
Aqua dest.	16,20 µl
<i>Taq</i> Puffer	2,50 µl
3'-Primer (10pmol/µl)	1,30 µl
5'-Primer (10pmol/µl)	1,30 µl
50 mM MgCl ₂	0,75 µl
10 mM dNTPs	1,00 µl
<i>Taq</i> Polymerase	0,25 µl
	Σ 25 µl

Temperaturprotokoll:

Das Temperaturprofil wurde mit Ausnahme des Annealings, das den jeweiligen Primer-Schmelztemperaturen angepasst wurde, bei allen PCR-Läufen unverändert durchgeführt. Außerdem wurde die Elongationszeit-Zeit auf die Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts abgestimmt (ca. 1 min/1000 bp).

		Zeit	Temperatur
Step 1 1 x	Initiale Denaturierung	5 min	94 °C
Step 2 35 x	Denaturierung Annealing Elongation	30 sec 30 sec X sec	94 °C X °C 72 °C
Step 3 1 x	Finale Elongation	10 min	72 °C
Step 4		∞	4 °C

Die so erhaltenen DNA-Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (siehe 18.2.4).

19. VIROLOGISCHE METHODEN

19.1 Infektion von Zellen

Für die Infektion von Zellen mit MVA-Viren wurde Medium mit reduziertem FCS-Gehalt von 2% verwendet. Idealerweise waren die Zellen zum Zeitpunkt der Infektion nicht älter als 48 Stunden und der Monolayer war zu 90% konfluent. Vor jeder Infektion wurden die eingefrorenen Virussuspensionen oder –stocks aufgetaut und dreimal für je 1 Minute im Eiswasserbad sonifiziert. Zwischen diesen einzelnen Ultraschallbehandlungen wurden die Proben für 15 Sekunden kräftig mit einem Vortex-Gerät durchmischt und nach der Sonifikation mit Infektionsmedium auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Danach wurde von den Zellen das Kulturmedium abgenommen und durch etwa die Hälfte der ursprünglichen Menge mit Virussuspension ersetzt. Die Adsorption der Viruspartikel an die Zellen erfolgte für 60 – 120 Minuten bei 37°C im Inkubator. Zuletzt wurde entweder mit weiterem Medium auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt oder das virushaltige Medium abgenommen und durch Erhaltungsmedium ersetzt. Unter täglicher lichtmikroskopischer Beobachtung wurden die Zellen bis zur Erreichung des gewünschten CPEs (Zytopathischer Effekt) weiter im Brutschrank bei 37°C kultiviert.

19.2 Herstellung rekombinanter MVA mittels RFP-Selektion

Die Generierung rekombinanter MVA erfolgte nach Transfektion/Infektion (siehe 19.3) durch homologe Rekombination des gewünschten Gens von einem Vektorplasmid in die Deletionsstelle III des MVA-Genoms (Abbildung 11). Als Ausgangsvirus diente das Wildtypvirus MVA-F6. Das Transferplasmid enthielt neben den zu integrierenden Genen flankierende Sequenzen (Flank1 und Flank2) des gewählten Insertionsortes. Durch die Kointegration unseres gewünschten Gens („Gene of Interest“) mit einem Markerprotein (RFP) war es möglich eine klonale Isolierung rekombinanter MVA durch Passagierung auf CEF-Zellen (siehe 19.4) durchzuführen. Die Selektion der rekombinanten Viren erfolgte durch Screenen der infizierten Zellkulturen nach rot-fluoreszierenden Plaques. Das hierfür verwendete Protein ist das RFP (Red Fluorescent Protein) mCherry, welches bei Anregung

durch Licht der Wellenlänge von 610 nm rot leuchtet. Um nach erfolgreicher Selektion die Eliminierung des Markers zu gewährleisten, wurde in den Konstrukten ein kurzer repetitiver Abschnitt des Flank1 (FI1-rpt) zwischen gewünschtem Gen und dem RFP eingefügt. Dadurch sollte nach ausreichend langer Passagierung auf CEF-Zellen das mCherry durch homologe Rekombination wieder entfernt werden.

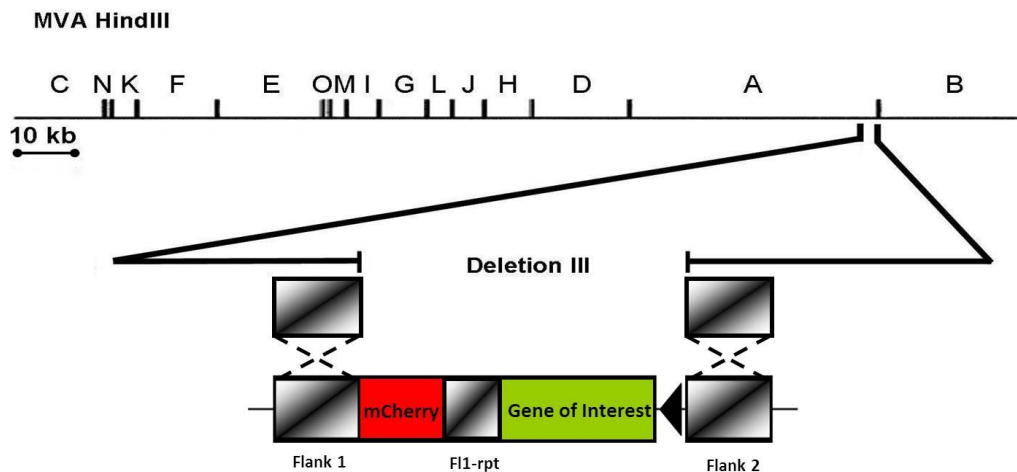


Abbildung 11: Schematische Darstellung der homologen Rekombination. Lage der Deletion III auf der *HindIII*-Restriktionskarte des MVA-Genoms. Die homologe Rekombination findet zwischen den Flank1- und Flank2-Bereichen des Vektorplasmids und den homologen Sequenzen im MVA-Genom statt. mCherry: rot-fluoreszierendes Selektionsmarkerprotein, FI1-rpt: repetitive Sequenz aus dem Flank1.

19.3 Transfektion und Infektion

Die in 6-Loch-Zellkulturplatten bis zu rund 80% Konfluenz kultivierten CEF-Zellen wurden zunächst mit dem Ausgangsvirus MVA-F6 und einer MOI von 0,05 infiziert. Anschließend wurde für 1 Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. 1 µg Plasmid-DNA wurde mit 3 µl Transfektionsreagenz pro Ansatz gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um danach tröpfchenweise in das Medium der infizierten Zellen gegeben zu werden. Die so behandelten Zellen wurden für 48 Stunden bei 37°C im Brutschrank belassen, anschließend abgeschabt und inklusive Medium bei -20°C aufbewahrt.

19.4 Klonale Isolierung rekombinanter Viren durch Passagierung auf CEF-

Zellen

Nach dreimaligem Gefriertauen und nachfolgender Sonifikation des Materials aus der Transfektion/Infektion (siehe 19.3) wurden damit frische CEF-Zellen in 6-Loch-Zellkulturplatten infiziert. Hierfür wurden zunächst Verdünnungen der Virussuspensionen in log₁₀-Stufen (10^{-1} – 10^{-3}) angelegt, die dann auf die Zellmonolayer ausgebracht wurden. Nach 48 Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37°C erfolgte das Screenen der Zellkulturen nach rot-leuchtenden Plaques mittels Fluoreszenzmikroskop. Gut erkennbare Plaques wurden an der Unterseite der Zellkulturplatte markiert, anschließend mit Hilfe einer Eppendorfpipette in einem Volumen von 10 – 20 µl Medium gepickt und in ein Reaktionsgefäß mit 300 µl Medium übertragen. Die nachfolgende Behandlung bestand aus dreimaligem Gefriertauen und dreimaliger Sonifikation im Eiswasserbad für je 1 Minute, serieller Verdünnung (10^{-1} - 10^{-4}), Ausbringen auf Zellrasen in 6- oder 96-Loch-Platten und Inkubation für 48 Stunden bei 37°C im Brutschrank. Wiederholungen dieses Verfahrens, der sogenannten Plaquepassage, erfolgten bis zum Erhalt genetisch identischer rekombinanter Viruskclone und Eliminierung des Wildtyp-Ausgangsvirus. Zur Kontrolle der gepickten Plaques erfolgte ab der fünften, danach alle zwei Passagen eine Analyse der Virus-DNA mittels PCR (siehe 18.3). Für jedes Konstrukt wurden mindestens zwei reine Viruskclone ausgewählt und amplifiziert (siehe 19.5).

19.5 Virusamplifikation und –aufreinigung für *in vitro* und *in vivo* Experimente

Zunächst wurden die, wie unter 19.4 beschrieben, erhaltenen reinen Viruskclone zur Infektion einer Vertiefung einer 6-Loch-Zellkulturplatte mit CEF-Zellen herangezogen. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden bei 37°C wurden die infizierten Zellen abgeschabt und zur Infektion einer 75 cm² Zellkulturflasche verwendet, deren Inhalt nach weiteren 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C abgeschabt und zur Infektion einer 175 cm² Zellkulturflasche benutzt wurde. Mit dem gesamten Inhalt dieser Flasche erfolgte nach 48 Stunden Inkubation bei 37°C die Infektion von fünf 175 cm² Zellkulturflaschen. Diese wurden nach lichtmikroskopischer Analyse des Infektionsstatus (vollständige Infektion des Zellmonolayers) bei -20°C eingefroren, wodurch das spätere Ablösen des Zellrasens erleichtert werden sollte. Zum Auftauen wurden die Zellkulturflaschen langsam auf Raumtemperatur gebracht, indem sie dem Gefrierschrank entnommen und auf die Arbeitsbank im Labor gelegt wurden. Nach Antauen des Mediums wurden die Flaschen geschüttelt, sodass das vorhandene Eis darin zerbrach und die so entstandenen Eisstücke den infizierten Zellrasen vollständig vom Boden ablösten. Nach dem Auftauen wurde der gesamte Inhalt in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt,

dreimal gefriergetaut und als sogenannter Crude Stock bei -80°C gelagert. Vor einer weiteren Verwendung und Amplifikation wurde die DNA des so erhaltenen Virus ein weiteres Mal mittels PCR überprüft, der Virustiter (siehe 19.6) bestimmt, sowie die Expression des inserierten Gens kontrolliert.

Für die Herstellung von Virusmaterial zum weiteren Gebrauch für *in vitro* und *in vivo* Experimente diente der Crude Stock als Ausgangsmaterial. Hierfür wurden 30 175 cm² Zellkulturflaschen mit einer MOI von 1 (1×10^7 PFU/Flasche) infiziert und nach vollständiger Infektion des Zellrasens bei -20°C eingefroren. Beim späteren Auftauen wurden die Flaschen zur besseren Ablösung der infizierten Zellen geschüttelt. Nachdem der Inhalt der Zellkulturflaschen komplett aufgetaut war, wurde dieser in Zentrifugenbecher überführt und bei 38180 g und 4°C für 1,5 Stunden zentrifugiert, um die Zellen, Zelltrümmer und Viruspartikel aufzukonzentrieren. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 mM Tris pH 9,0 aufgenommen. Um die Zellen so gut wie möglich zu zerstören und somit Virionen freizusetzen wurde diese Virussuspension dreimal gefriergetaut und mit einem Vortex-Gerät durchmischt. Danach erfolgte eine Sucrose-Aufreinigung. Dafür wurde die Virussuspension dreimal 15 Sekunden lang mit einer Ultraschallnadel auf Eis geschallt und in Zentrifugenröhrchen vorgelegt, danach mit 10 ml 36%iger Sucroslösung unterschichtet und für 1,5 Stunden bei 4 °C und 30600 g zentrifugiert. Das dadurch gewonnene Pellet wurde in 2 – 3 ml 10 mM Tris pH 9,0 resuspendiert, der Virustiter bestimmt, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

19.6 Bestimmung des Virustiters

Die Bestimmung des Virustiters erfolgte durch Titration. Zunächst wurden serielle Verdünnungen über 9 log-Stufen (10^{-1} – 10^{-9}) der zu bestimmenden Virussuspension angefertigt. Diese wurden im Doppelansatz mit 1 ml Volumen je Vertiefung auf CEF-Zellen in 6-Loch-Zellkulturplatten ausgebracht und für 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der Adsorption wurde dieses Infektionsmedium abgenommen, durch 2 ml frisches Medium ersetzt und die Platten für 48 Stunden bei 37°C inkubiert.

Für die Fixierung der Zellen wurde das Medium abgenommen, durch ein eiskaltes Aceton/Methanol-Gemisch (1:1) ersetzt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um unspezifisches Binden der nachfolgend verwendeten Antikörper zu verhindern, wurde nach Lufttrocknung der Platten mit PBS-3% (PBS mit 3% FCS) und einem Volumen von 2 ml je Well für 1 Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Danach erfolgte die erste Antikörperinkubation mit einem polyklonalen Antikörper, der spezifisch gegen Vacciniavirus-Proteine (VACV Lister) gerichtet war. Hierfür wurde der Antikörper 1:2000 in PBS-3% verdünnt, 1 ml je Vertiefung aufgetragen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter

leichtem Schwenken inkubiert. Danach erfolgte ein dreimaliges Waschen mit PBS und anschließendes Ausbringen des mit Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörpers. Dieser wurde 1:5000 in PBS-3% verdünnt und mit 1 ml je Vertiefung, für 1 Stunde bei Raumtemperatur und unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Zugabe von TrueBlue-Substrat und nach 5 – 10 Minuten wurde eine deutliche Blaufärbung der infizierten Plaques erkennbar. Die Anzahl der Plaques wurde am Lichtmikroskop gezählt, der Mittelwert von den im Doppelansatz vorhandenen Verdünnungsstufen gebildet und dieser mit der Verdünnungsstufe verrechnet. Die Angabe des Titors erfolgte in PFU (plaque forming units)/ml.

19.7 Wachstumskinetik - Mehrstufenwachstumsanalyse

Die Mehrstufenwachstumsanalyse wird herangezogen, um die Fähigkeit eines Virus zu testen sich in einem Zellrasen auszubreiten. Hierdurch konnte die Permissivität verschiedener Zellkulturen für die rekombinanten Viren untersucht und verglichen werden. Zunächst wurden verschiedene Zellen in 6-Loch-Zellkulturplatten mit einer MOI von 0,05 infiziert und für 1 Stunde bei 4°C aufbewahrt (Cold-Start-Methode). Nach der Adsorption wurde einmal mit PBS gewaschen und 2 ml frisches auf 37°C vorgewärmtes Infektionsmedium hinzugefügt. 0, 2, 8, 24, 48 und 72 Stunden p.i. wurden die Zellen mitsamt der Zellkulturplatte bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Zellen abgeschabt, mit Überstand in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C bis zur Bestimmung des Virusgehaltes durch Titration (siehe 19.6) aufbewahrt.

20. PROTEINBIOCHEMISCHE UND IMMUNOLOGISCHE METHODEN

20.1 Erzeugung von Proteinextrakten aus kultivierten Zellen

Für die Herstellung von Proteinlysaten aus infizierten Zellen wurde zunächst das Medium abgenommen und danach mit 4°C kaltem PBS einmal gewaschen, indem die Zellen in 500 µl PBS geschabt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 13000 rpm für 30 Sekunden zentrifugiert wurden. Danach wurde der PBS-Überstand abgenommen, das Pellet in 100 µl Lysispuffer resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm und 4°C für 30 Minuten. Nach Überführung des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß erfolgte die Lagerung der Proben bei -80°C.

20.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen nach deren Molekülmasse im elektrischen Feld.

20.2.1 Herstellung von SDS-PAGE-Gelen

Bei der SDS-PAGE wird zwischen einem Trenngel und einem niedriger prozentigen Sammelgel mit anderem pH-Wert unterschieden, in das die Proben eingebracht und dort zu einer scharfen Bande „gesammelt“ werden, bevor sie ins Trenngel wandern. Die Herstellung der Gele erfolgte entsprechend der Angaben in Tabelle 17, in der benötigten Dichte des Trenngels (10, 12 oder 14%) und des 5%igen Sammelgels. Nach Aushärtung der Trenngele wurden die Sammelgele in die Gelapparatur gegossen.

Trenngel				Sammelgel	
Komponente	10 %	12 %	14 %	Menge für 5 %	
Acrylamid Bio-Rad	9,9 ml	12 ml	13,8 ml	2,6 ml	
1,5 M Tris-HCL pH 8,8	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	2 M Tris pH 6,8	1,25 ml
SDS 10 %	300 µl	300 µl	300 µl	800 µl	
H ₂ O	12 ml	9,9 ml	8,1 ml	15,7 ml	
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl	20 µl	
10 % APS	150µl	150 µl	150 µl	100 µl	

Tabelle 19: Mischungsverhältnisse der Komponenten zur Herstellung von SDS-PAGE-Gelen

20.2.2 SDS-PAGE

Zunächst wurden 15 µl der Proben mit 5 µl Roti-Load1 reduzierendem Probenauftragspuffer versetzt und bei 95°C für 5 Minuten inkubiert. Dieser enthielt bereits SDS und β-Mercaptoethanol. Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingespannt und diese danach mit 1 x Laufpuffer befüllt. Nach Laden der Geltaschen mit den 20 µl der Proben und einem zusätzlichen Proteingrößenstandard zur Interpretation der Ergebnisse erfolgte die Elektrophorese für etwa 120 Minuten bei einer Spannung von 100 – 120V und einer Stromstärke von maximal 400 mA.

20.3 Westernblot (Tank-Blot-Verfahren)

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine (Pkt. 20.2.2) wurden als nächstes auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran übertragen, wo sie anschließend durch Immun-detektion nachgewiesen werden konnten.

20.3.1 Membrantransfer

Das Tank-Blot-Verfahren ist ein sogenanntes nasses Verfahren, bei dem zuerst die Filterpapiere, die Gewebeschwämme und die Membran mit Blottingpuffer sehr gut durchtränkt wurden. Danach wurden die Komponenten, wie in Abbildung 12 dargestellt, in die dafür vorgesehene Halterung gelegt. Auf einen Gewebeschwamm folgte ein Filterpapier und darauf wurden die PVDF-Membran und das SDS-PAGE-Gel gelegt, sowie abschließend ein weiteres Filterpapier und ein Gewebeschwamm. Die Halterung wurde so in die Blottingapparatur eingehängt, dass die Membranseite in Anodenrichtung zeigte. Nach Befüllen der Blottingkammer mit Transferpuffer und zusätzlichem Einhängen eines Kühlakkus, erfolgte der Transfer für 70 Minuten bei 100V und 4°C.

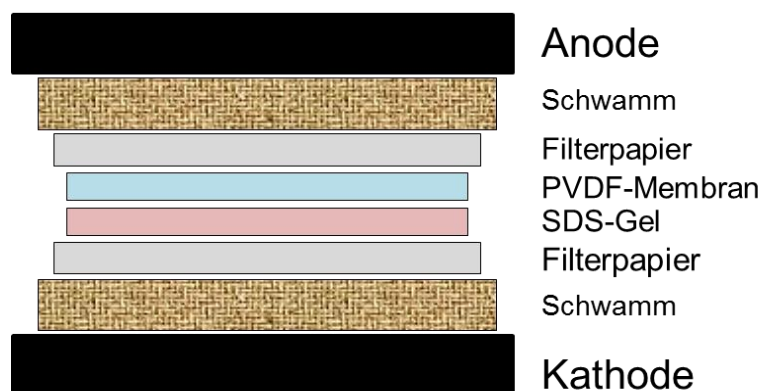


Abbildung 12: Membrantransfer

20.3.2 Proteinnachweis

Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, wurde die Membran nach dem Transfer der Proteine (Pkt. 20.3.1) für 1 Stunde in Blockinglösung (PBS-T mit 5% Magermilchpulver) bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Danach erfolgte der Proteinnachweis durch indirekte Antikörperfärbung. Der antigenspezifische Antikörper wurde 1:10000 in PBS-T 2,5% (PBS-T mit 2,5% Magermilchpulver) verdünnt, mit der Membran in ein 50 ml Falcon überführt und auf einem Roller über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend

erfolgte ein dreimaliges Waschen für je 15 Minuten mit PBS-T. Nach der 1:5000 Verdünnung (in PBS-T 2,5%) des peroxidase-marktierten Antikörpers erfolgte damit der nächste Inkubationsschritt der Membran für 1 Stunde unter Schwenken bei Raumtemperatur. Die Membran wurde danach nochmals dreimal für je 15 Minuten mit PBS gewaschen. Zur Detektion wurde das Entwicklersubstrat *SuperSignal West Dura Chemiluminescent Substrate* laut Herstellerangaben gemischt, 1 ml auf die Membran aufgetragen, für 2 Minuten inkubiert, die Membran anschließend in Frischhaltefolie verpackt und mit dem Chemilumineszenzimager MicroChemi dokumentiert.

20.4 ELISA zum Nachweis WNV E-spezifischer Antikörper

Zum Nachweis WNV E-spezifischer Antikörper in Serumproben von immunisierten Mäusen wurden 6 - 8 Wochen alte weibliche Balb/c-Mäuse (Charles River, Sulzfeld) mit den rekombinanten MVA einer „Prime-Boost“ Immunisierung unterzogen. Die Einzeldosis je Immunisierung und Maus bestand aus 1×10^8 PFU. Insgesamt wurden zwei Injektionen (Tag 0/Erstimmunisierung und Tag 21/zweite Immunisierung) durchgeführt und an den Tagen 18 und 31 Blutproben entnommen (1. und 2. Bluten). Eine Impfgruppe bestand aus 5 Mäusen und es wurden zwei Negativkontrollgruppen verwendet, die aus nicht-geimpften Mäusen und mit MVA-F6 geimpften Mäusen bestanden.

Für die ELISA wurden MaxiSorp-Platten mit Zelllysaten (freundlicherweise erhalten von Dr. Gorben Pijlman, Universität Wageningen) über Nacht bei 4°C beschichtet. Die Zelllysate enthielten eine hohe Konzentration an rekombinantem WNV E-Protein. Nach dreimaligem Waschen der Platten mit PBS-T wurden sie mit 100 µl/Vertiefung für 1 Stunde bei 37°C mit Blockingpuffer inkubiert, um danach wieder dreimal mit PBS-T gewaschen zu werden. Die Serumverdünnungen wurden mit je 100 µl pro Vertiefung in die Platte gegeben und für eine 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach anschließendem dreimaligem Waschen mit PBS-T erfolgte die Zugabe von 1:2000 verdünntem, HRP-konjugiertem anti-Maus IgG-Antikörper (100µl/Well) und eine weitere Inkubation von 1 Stunde bei 37°C. Nach dreimaligem Waschen der Platten mit PBS-T erfolgte die Zugabe von 100 µl TMB-Substrat pro Vertiefung. Die Entwicklungsdauer betrug 20 Minuten und nach ausreichend starker Blaufärbung wurde die Reaktion mittels ELISA-Stopplösung (100µl/well; Stop Reagent, Sigma) gestoppt und die Absorption bei 450 nm im ELISA-Reader gemessen.

20.5 Interferon- γ ELISpot

Zum Nachweis der Zytokinreaktionen von T-Zellen wurde ein ELISpot verwendet. Die nach Peptidstimulation sezernierten Zytokine, in dieser Arbeit Interferon- γ , wurden auf einer Membran immobilisiert und danach mittels einer Farbreaktion detektiert. Hierfür wurden Milzzellen von transgenen HLA-A2.1 Mäusen verwendet, welche vorher mit den in dieser Arbeit hergestellten, rekombinanten Viren geimpft worden waren. Die Splenozyten wurden mit dem HLA-A2.1-restringierten Peptidepitop SVG9 des WNV E-Proteins für 48 Stunden stimuliert und anschließend das sezernierte IFN- γ detektiert und gemessen. Die Impfdosis je Maus betrug 1×10^8 PFU und die Entnahme der Milzen erfolgte an Tag 8 nach der Immunisierung. Eine Impfgruppe bestand aus 3 Mäusen.

Die Durchführung des ELISpots erfolgte mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits (mIFN- γ ELISpot; Mabtech) nach Herstellerangaben. Zunächst wurden die im Kit enthaltenen Mikrotiterplatten mit 70%igem Ethanol (50 μ l/Vertiefung) für 5 Minuten aktiviert und nachfolgend fünfmal mit 100 μ l/Well Aqua dest. gewaschen. Als nächstes wurde der Erstantikörper mit sterilem PBS verdünnt, 100 μ l/Vertiefung davon aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit sterilem PBS erfolgte ein Blockschritt durch Zugabe von Medium (200 μ l/Well) und Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde das Medium abgenommen und durch 150 μ l/Well Milzzell-Peptidmischung ersetzt. Diese bestand aus 2×10^4 Milzzellen (Pkt. 17.2) und der Peptidverdünnung (1 μ g/ml Endkonzentration) pro Vertiefung. Die Positivkontrolle beinhaltete PMA (Endkonzentration 1 μ g/ml) und Ionomycin (Endkonzentration 25 ng/ml). Die Platten wurden anschließend mit Alufolie lichtdicht umwickelt und für 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit sterilem PBS erfolgte die Zugabe (100 μ l/Vertiefung) des in PBS mit 0,5% FCS verdünnten Sekundärantikörpers, dessen Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur erfolgte. Nach erneutem fünfmaligem Waschen wurde mit 100 μ l/Well Streptavidin-konjugierter ALP (alkalischer Phosphatase) für 1 Stunde inkubiert und wiederum fünfmal gewaschen. Durch die Zugabe des vorher sterilfiltrierten NBT/BCIP-Substrats (100 μ l/Well) erfolgte die Färbung der Spots, die nach etwa 20 – 30 Minuten Einwirkzeit deutlich sichtbar wurde. Danach wurde die Reaktion mit Leitungswasser gestoppt und die Platten über Nacht im Dunklen getrocknet. Anschließend erfolgte der Transfer der Membranen (Unterseite der ELISpot-Platte) mit Hilfe eines Ausstanzgerätes auf eine Folie, die dann gescannt und die Spots mittels A-EL-VIS Software ausgezählt, sowie analysiert werden konnten.

20.6 Deglykosylierung

Die Deglykosylierung von Proteinen erfolgte mit dem PNGase F-Deglykosylierungskit der Firma NEB. Hierzu wurden zuerst Überstände und Zelllysate von, mit den rekombinanten MVA infizierten, Zellen geerntet bzw. generiert und danach laut Herstellerangaben mit dem Kit behandelt. Die so erhaltenen Proben wurden mittels Westernblot (Pkt. 20.3) analysiert.

20.7 Immunfluoreszenz

Für die Lokalisation der, von den Konstrukten exprimierten, E-Proteine wurden HeLa-Zellen mit den rekombinanten MVA infiziert (MOI 0,05) und 12 Stunden später mit 4%igem Paraformaldehyd für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem antigenspezifischen Antikörper für 30 Minuten (1:5000 in PBS verdünnt). Der markierte Sekundärantikörper (Alexa Fluor 488) wurde 1:1000 in PBS verdünnt. Nach weiterem zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS erfolgte die Zugabe des zweiten Antikörpers und eine Inkubation für eine Stunde. Nach einem letztmaligen Waschschrift wurden die Zellen auf einem Objektträger mit Mounting Medium fixiert und nach 24-stündiger Trocknung unter dem Konfokalmikroskop analysiert.

IV. ERGEBNISSE

1. Konstruktion rekombinanter MVA zur Expression von WNV-Hüllproteinen

Für die Generierung rekombinanter MVA wurden die beiden Hüllproteine prM/M (precursorMembrane/Membrane) und E (Envelope) verwendet. Insgesamt wurden fünf verschiedene Konstrukte entwickelt und hergestellt: MVA-WNVprME₁, MVA-WNVprME₂, MVA-WNVE_{SOL}, MVA-WNVE_{TMC} und MVA-WNVE_{TMV}.

MVA-WNVprME₁ und ₂ kodierten für die prM- und E-Proteine (Abbildung 15A). Die beiden Konstrukte unterschieden sich lediglich in der Codon-Usage bezüglich der Originalsequenzen von Stamm WNV-NY99. MVA-WNVE_{SOL} enthielt die Sequenz eines verkürzten E-Proteins. (Abbildung 15A). MVA-WNVE_{TMC} und _{TMV} kodierten beide für das E-Protein. Die Originalsequenz des Proteins wurde jedoch dahingehend verändert, dass die ursprüngliche Transmembrandomäne entfernt und durch jene des E2-Proteins aus Chikungunyavirus bzw. jene des A56-Proteins aus Vacciniaviurs ersetzt wurde (Abbildung 15A).

1.1 Wahl der Insertionsstelle im MVA-Genom

Als Insertionsort für die WNV-Gensequenzen wurde die Stelle der Deletion III im MVA-Genom gewählt (Abbildung 13). Sie wurde bereits bei einer Vielzahl rekombinanter MVA erfolgreich als Insertionsstelle verwendet und hier zur Generierung aller rekombinanten MVA herangezogen.

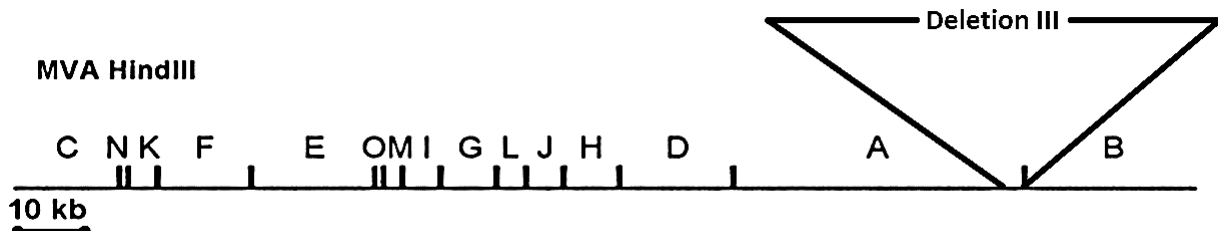


Abbildung 13: Schematische Darstellung des MVA-Genoms als *HindIII*-Restriktionskarte und Lage der Deletion III.

1.2 Konstruktion der Vektorplasmide

Zur Insertion der Zielgene in die Deletion III des MVA-Genoms diente das Vektorplasmid pIIIH5RedK1L (Abbildung 14). Dieses enthielt bereits die zur homologen Rekombination benötigten MVA-Gensequenzen (Flank-Regionen: Flank1, Flank2 und Flank1-repeat), den Vacciniavirus-spezifischen Promotor PmH5, zwei Restriktionsenzymschnittstellen (*NotI* und *PmeI*) zwischen PmH5 und dem Flank1-repeat, sowie die Sequenz des Selektionsmarkers mCherry mit Promotor P11.

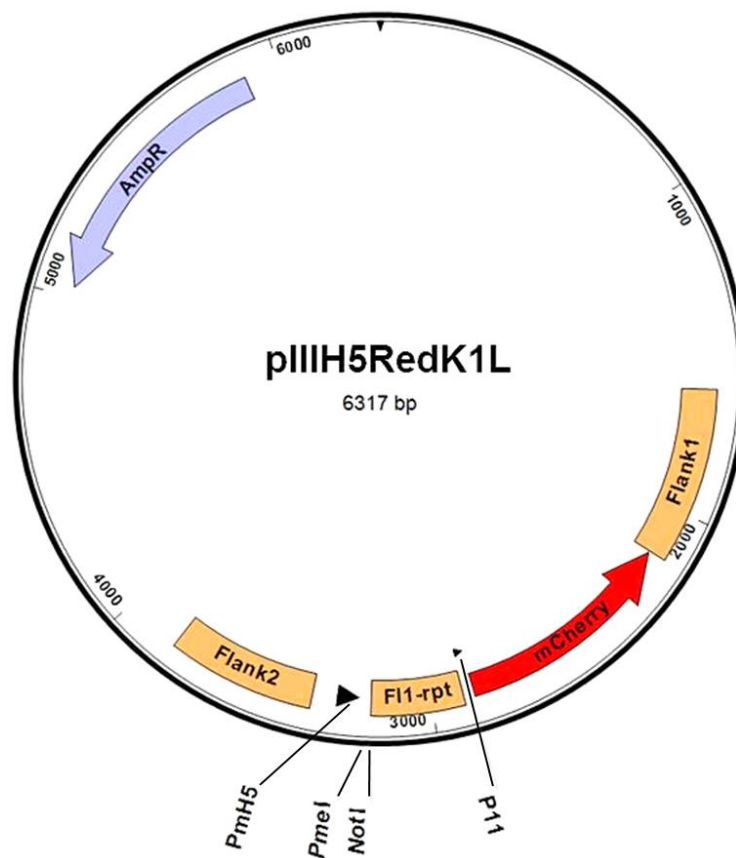


Abbildung 14: Ausgangsvektor pIIIH5RedK1L. Die Restriktionsenzymschnittstellen *NotI* und *PmeI* dienen der Integration der Zielgene. AmpR: Ampicillin-Resistenzgen; Fl1-rpt: Flank1-repeat; P11 und PmH5: Vaccinia-Promotoren.

Die verschiedenen Zielsequenzen für die Konstrukte (Abbildung 15A) wurden mit Hilfe des Programms SeqBuilder (DNASTAR Inc.) *in silico* geplant und die im Anhang dargestellten Sequenzen zur Synthese und nachfolgenden Klonierung in das Ausgangsplasmid an die Firma GeneArt® übermittelt. Die finalen fünf Vektorplasmide unterschieden sich lediglich in der eingefügten Zielsequenz, in Abbildung 15B als „Gene of Interest“ bezeichnet.

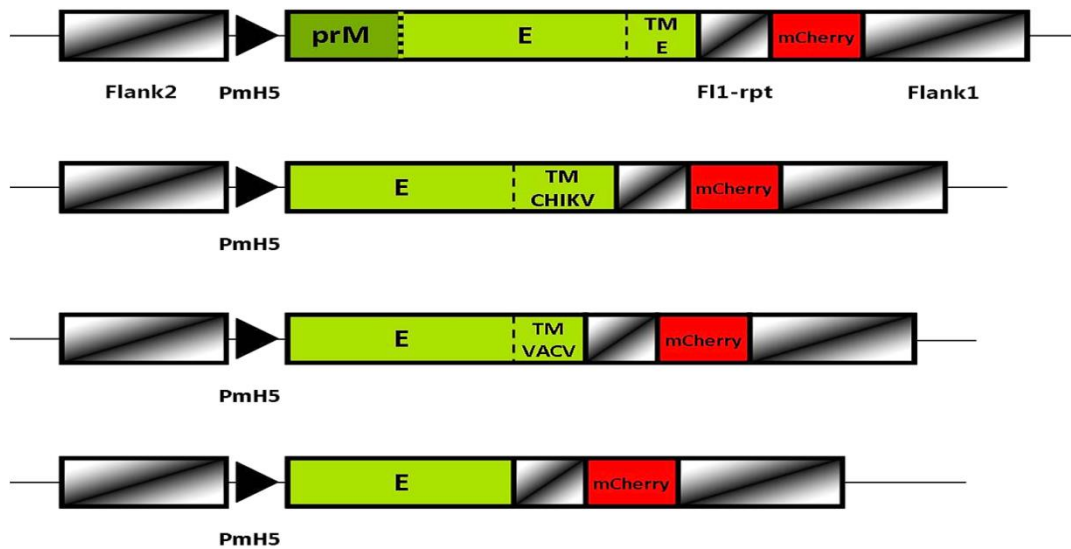
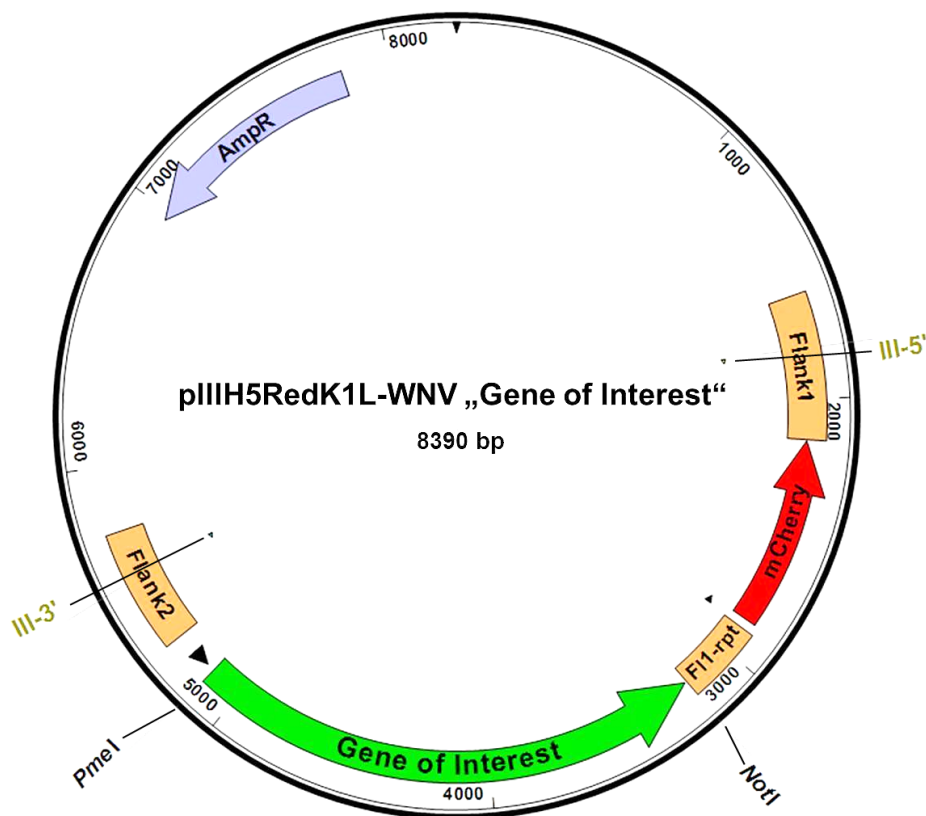
A**B**

Abbildung 15: Schematische Darstellungen der geplanten Konstrukte. A) WNV-Genkonstrukte zur Integration in die Del III des MVA-Genoms. E: E-Protein aus WNV; TM: Transmembrandomäne; CHIKV: Chikungunyavirus; VACV: Vacciniavirus; PmH5: Vaccinia-Promotor, schwarz-graue Kästchen: Flank-Regionen. B) Transferplasmid mit „Gene of Interest“ (Zielgen) zur Generierung rekombinanter MVA. Alle fünf Plasmide sind gleichartig aufgebaut und unterscheiden sich lediglich in der eingefügten Zielgenesequenz, „Gene of Interest“ genannt. Die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *PmeI* und *NotI*, sowie die Bindestellen der Oligonukleotide (III-5'/III-3') für die PCR-Analyse zur Insertionskontrolle in die Del III sind eingezeichnet.

1.3 Charakterisierung der Plasmide mittels Restriktionsanalyse und Nachweis der Synthese der rekombinanten Proteine

Die Kontrolle der erhaltenen Vektorplasmide erfolgte durch Behandlung mit den Restriktionsendonukleasen *Pf*MI und *EcoRV*-HF, sowie nachfolgender Analyse der erhaltenen DNA-Fragmente im Agarosegel. Abbildung 16 zeigt das Bandenmuster der aufgetrennten Plasmid-DNA, das den für jedes Konstrukt erwarteten Molekulargewichten entsprach.

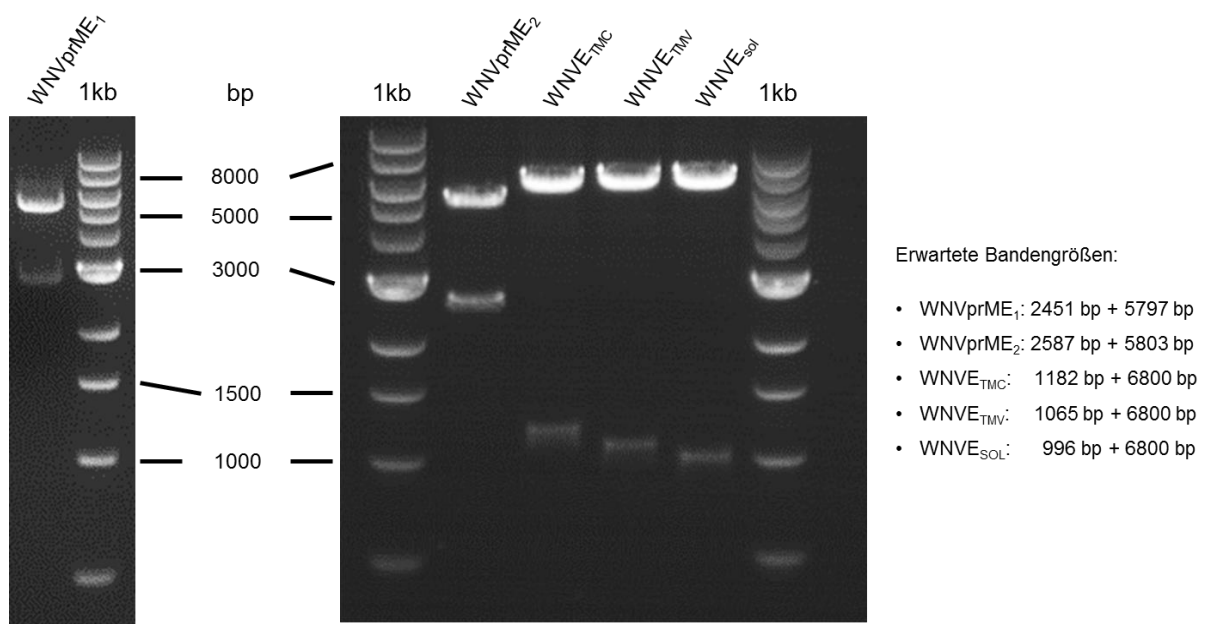


Abbildung 16: Charakterisierung der Vektorplasmide mittels Restriktionsanalyse. Verwendete Restriktionsenzyme: *Pf*MI und *EcoRV*-HF. Die Auftrennung der DNA erfolgte im 1% Agarosegel. 1kb: DNA-Größenstandard zur Bestimmung des Molekulargewichts.

Bevor die Plasmide für die Generierung rekombinanter Viren eingesetzt werden konnten, war eine Überprüfung der Expression der rekombinanten Gene erforderlich. Hierfür wurden CEF-Zellen mit MVA Wildtypvirus (MOI 5) infiziert und mit je 1 µg der Transferplasmid-DNA transfiziert. Die Western-Blot-Analyse mit einem Anti-WNV-E-Antikörper erlaubte in den 48 Stunden p.i. hergestellten Zelllysaten den spezifischen Nachweis eines Proteins mit der Größe von ~45 kDa (Abbildung 17), dem erwarteten Molekulargewicht des E-Proteins von WNV.

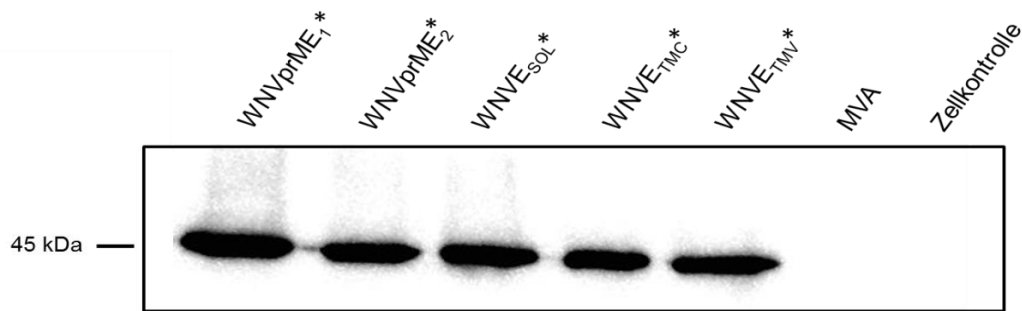


Abbildung 17: Nachweis der transienten Expression von WNV E-Protein durch Western-Blot-Analyse. MVA: MVA-Wildtyp infizierte Zellen; ZK: Zellkontrolle; *: Transfektion des jeweiligen Plasmids und Koinfektion mit MVA.

1.4 Generierung rekombinanter Viren mittels homologer Rekombination und klonale Isolierung der rekombinanten Viren in Plaquepassagen

Nach erfolgreicher Konstruktion, sowie genetischer und funktioneller Charakterisierung der Transferplasmide, konnte mit der Generierung rekombinanter MVA begonnen werden. Jedes Vektorplasmid wurde zur Transfektion von, vorher mit MVA-Wildtyp infizierten, CEF-Zellen verwendet. Die Integration der Zielgene und des rot fluoreszierenden Markers mCherry in die Del III des MVA-Genoms erfolgte durch homologe Rekombination der im Plasmid vorhandenen Flank1 und Flank2 MVA-Sequenzen mit den homologen Sequenzen im MVA-Genom (Abbildung 18).

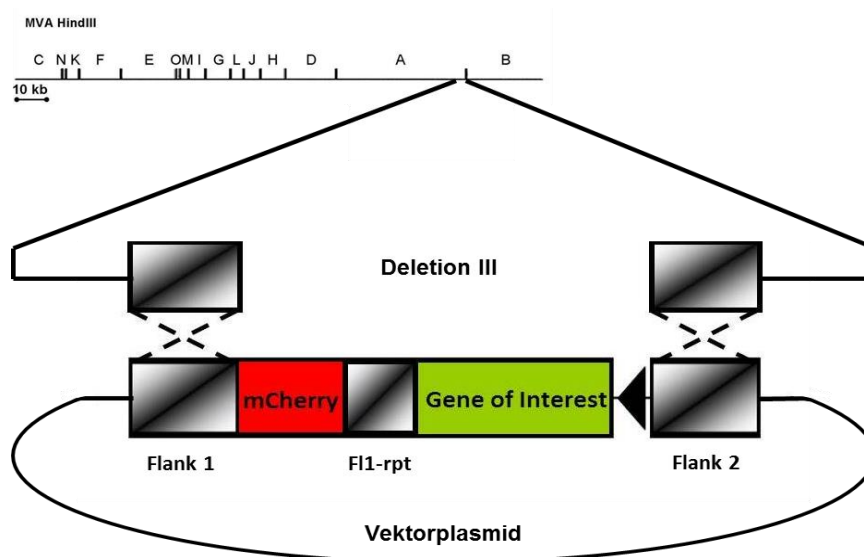


Abbildung 18: Konstruktionsschema der rekombinanten MVA durch homologe Rekombination. Die im Vektorplasmid zwischen Flank1 und Flank2 liegenden Sequenzen, werden stabil in die Deletion III inseriert. Das so entstandene Virus enthält auch das Gen des rot-fluoreszierenden Markerproteins mCherry.

Zwei Tage nach der Transfektion/Infektion konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop erste rot leuchtende Zellen beobachtet werden. In diesen Zellen konnte die Insertion der gewünschten Zielgene in das MVA-Genom erfolgen. Die Expression des mCherry-Gens und die Sichtung rot fluoreszierender Zellen ermöglichte eine einfache Identifizierung und klonale Isolierung rekombinanter Viren. Die ersten Herde mit "roten" Zellen wurden geerntet und für weitere Passagen der Viren auf CEF-Zellen verwendet. Im Laufe der klonalen Passagierungen erhöhte sich der Anteil der "roten" Plaques und ihre Größe nahm zu, wie Abbildung 19 stellvertretend für alle Konstrukte zeigt, während sich die Menge des Wildtypvirus verringerte.

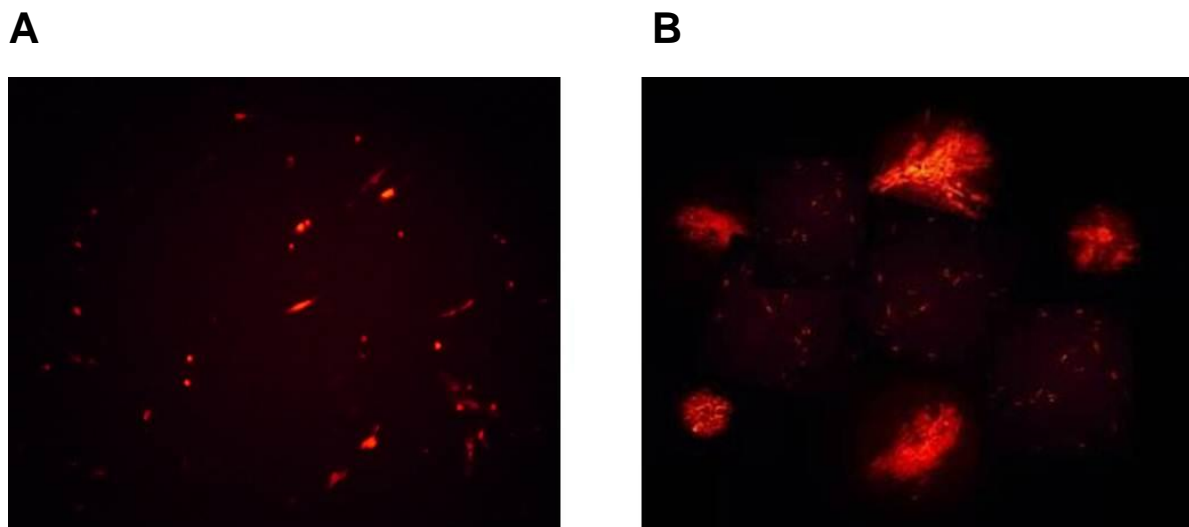


Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen infizierter CEF-Zellen. A) CEF-Zellen 48 Stunden nach Transfektion/Infektion mit MVA-Wildtypvirus (MOI 0,05) und Transferplasmid pIIH5RedK1L-WNVprME₁. Einzelne rote Zellen sind sichtbar. Vergrößerung: 40x. B) MVA-WNVprME₁ infizierte CEF-Zellen in der 7. Plaquepassage nach Transfektion/Infektion. Große Plaques mit vielen rot-fluoreszierenden Zellen sind sichtbar. Vergrößerung: 4x.

Zur Überprüfung der genetischen Reinheit der isolierten Virusklone, wurden ab der 5. Passage PCR-Analysen der genomischen Virus-DNA durchgeführt. Dies erfolgte mit den Oligonukleotiden III-5' und III-3' für die Kontrolle der Fremdgen-Insertion in Del III. Abbildung 20 zeigt als Beispiel eine Kontroll-PCR von drei klonalen Isolaten des rekombinanten Virus MVA-WNVprME₁. Hierbei ist auch die bereits größtenteils erfolgte Deletion des Markergens mCherry erkennbar. Es wurden immer nur jene Klone weiterpassagiert und amplifiziert, deren PCR-Analyse möglichst kein oder geringes Wildtypsignal zeigte und die vollständige Integration der Zielgene vermuten ließ.

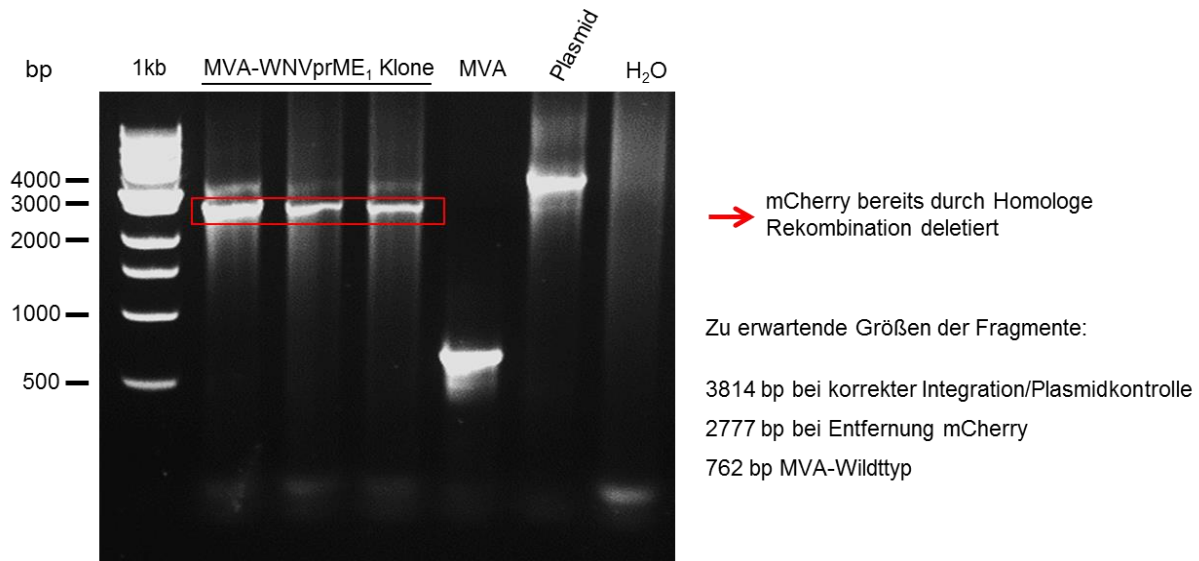


Abbildung 20: PCR-Analyse viraler DNA einzelner Virusplaques von MVA-WNVprME₁. Die Integration des Zielgens wurde mit den spezifischen Del III Primern (III-5'/III-3') überprüft. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 1% Agarosegel.

Nach der erfolgreichen Selektion klonaler rekombinanter Viren wurden diese noch drei zusätzlichen Passagen auf CEF-Zellen unterzogen. Da die Funktion des rot-fluoreszierenden Proteins mCherry nicht mehr benötigt wurde, konnte dessen Gensequenz, wiederum durch homologe Rekombination gleichartiger DNA-Sequenzen, effektiv entfernt werden. Hierfür enthielten die Vektorplasmide die Sequenz Flank1-repeat (FI1-rpt, Abbildung 18), welche homolog zu einer Teilsequenz der Flank1 ist. Der Nachweis für die Entfernung des Markergens mCherry im Genom rekombinanter Viren erfolgte visuell durch den Verlust roter Fluoreszenz in Foci virusinfizierter Zellen und mittels PCR-Analyse genomischer Virus-DNA. Nachdem die Überprüfungen der fünf Konstrukte erfolgreich verlaufen waren, erfolgten mit je einem ausgewählten Klon Amplifizierungsschritte zur Generierung primärer und finaler sucrosegereinigter Virusstocks.

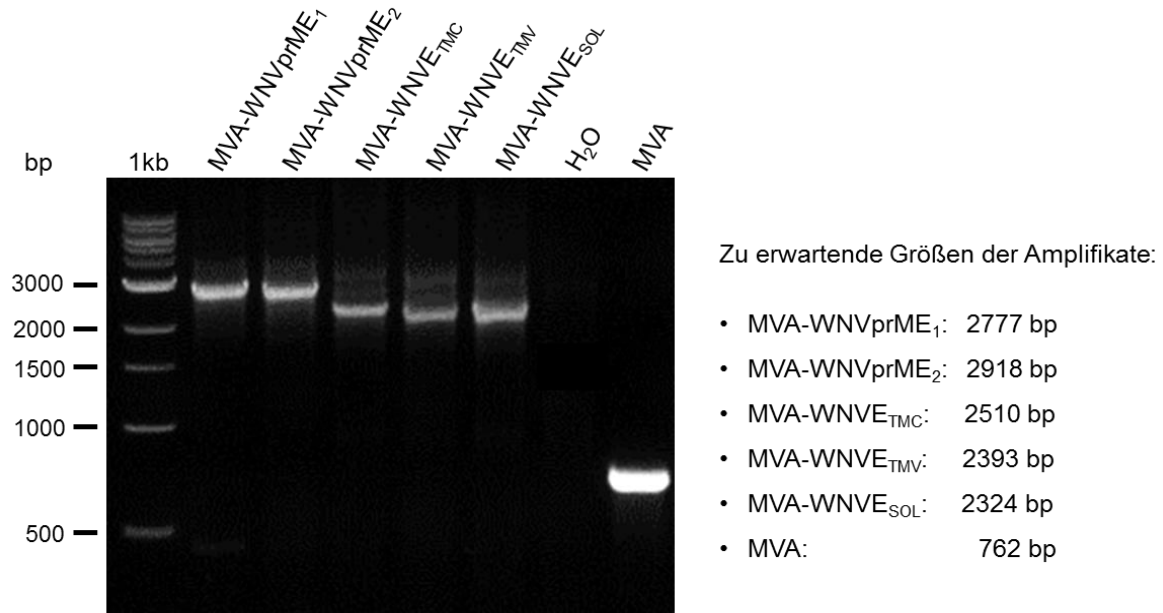
2. Charakterisierung der rekombinanten Viren

2.1 Molekulare Charakterisierung der finalen Konstrukte

Die fertigen sucrosegereinigten Virusstocks wurden einer nochmaligen PCR-Analyse zur Konfirmation der genetischen Reinheit und Stabilität unterzogen. Zunächst erfolgte die Analyse der viralen DNA zur Kontrolle der stabilen Insertion der Zielgene in die Deletion III (Abbildung 21A) und zur zusätzlichen Absicherung eine Insert-PCR (Abbildung 21B). Die

Ergebnisse bestätigten die korrekte Insertion der Zielsequenzen bei allen fünf rekombinanten Viren.

A



B

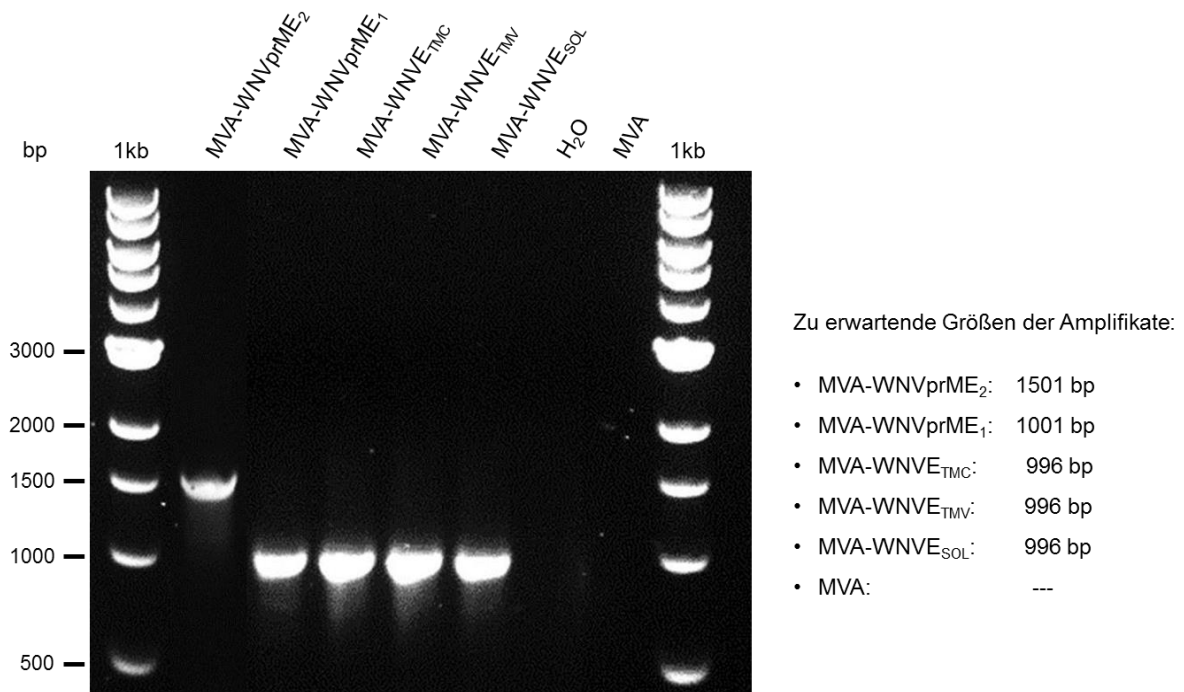


Abbildung 21: PCR-Analysen sucrosegereinigter Viruspräparationen der finalen rekombinanten MVA. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte im 1% Agarosegel. A) Überprüfung der Insertion der Zielsequenzen in die Del III des MVA-Genoms mit den spezifischen Oligonukleotiden III-5'/III-3'. B) Überprüfung mittels Insert-PCR mit den Zielsequenz-spezifischen Primern: prMME-31/prMME-32 für MVA-WNVprME₁, prMME-for/prMME-rev für MVA-WNVprME₂ und WNVE-for/WNVE-rev für die anderen drei Konstrukte.

Zur Kontrolle der genomischen Stabilität der generierten Viren wurde das C7L-Gen von MVA amplifiziert. Seine Präsenz im Genom der rekombinanten Viren, dient als Referenz für die genomische Stabilität. Aus Abbildung 22 geht hervor, dass in allen Konstrukten C7L erfolgreich amplifiziert wurde und somit keine Instabilität detektiert werden konnte.

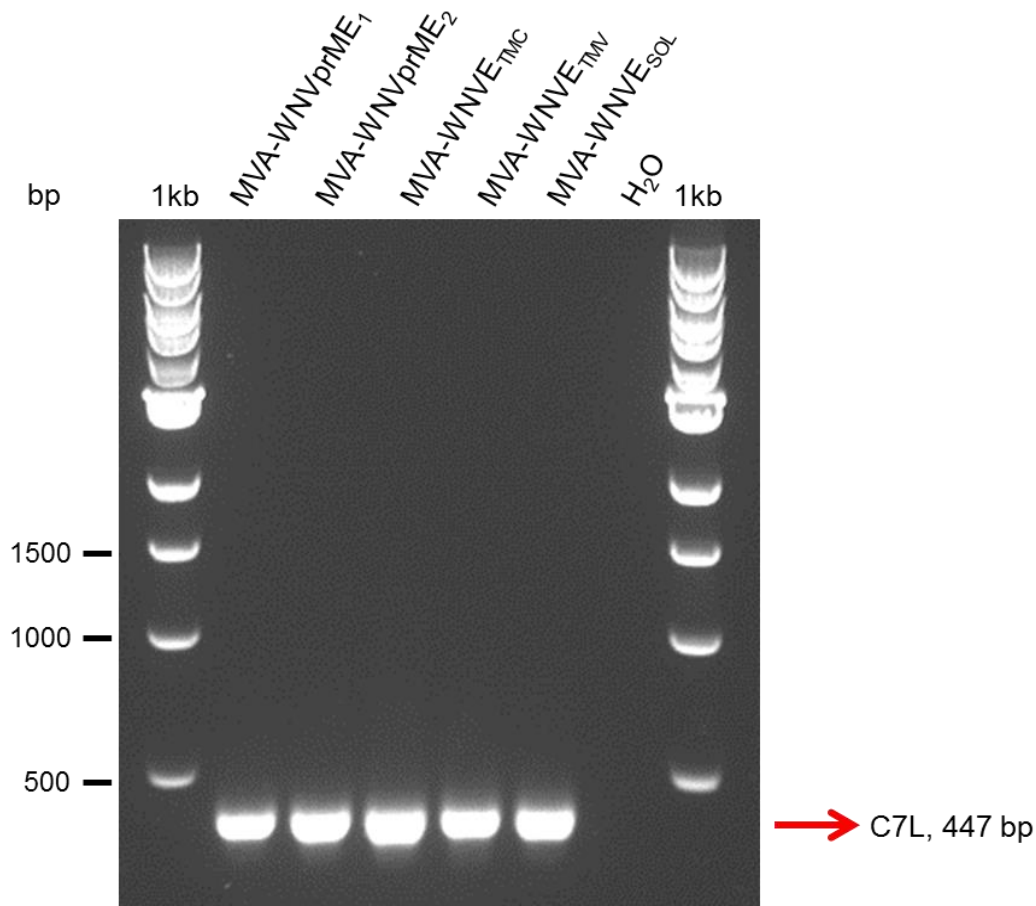
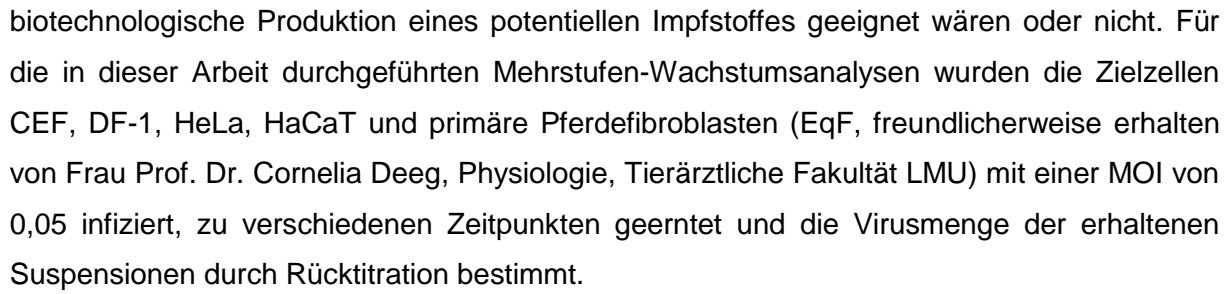


Abbildung 22: Amplifikation des C7L-Gens der finalen rekombinanten MVA. Die PCR-Analyse wurde mit den für das Gen spezifischen Oligonukleotiden C7L-for/C7L-rev durchgeführt und im 1% Agarosegel dargestellt.

2.2 Wachstumsanalysen auf verschiedenen Zelllinien

Zur Charakterisierung der Viren hinsichtlich ihrer Effizienz sich in bestimmten Zellen zu vermehren, wurden Wachstumsanalysen durchgeführt. Dies erfolgte zur Verifizierung des Erhalts der MVA-typischen Replikationsdefizienz der rekombinanten Viren auf ausgewählten Zellen und Zelllinien. Außerdem sollte festgestellt werden, ob einzelne Konstrukte besonders gut oder schlecht auf permissiven Zellen (CEF oder DF-1) wachsen und somit für die



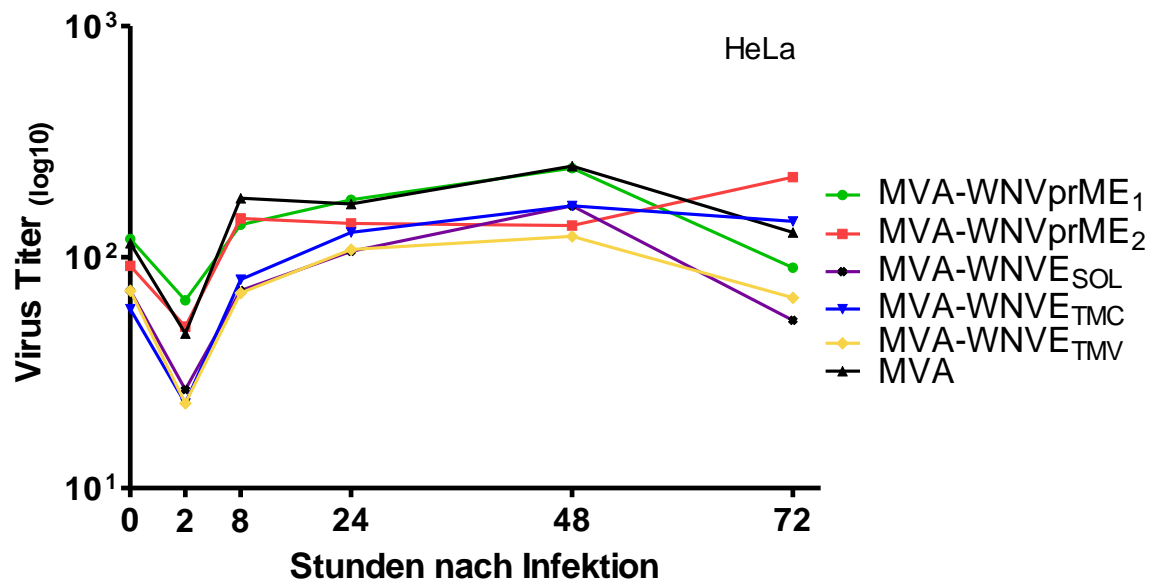
C

Abbildung 23: Mehrstufen-Wachstumsanalysen der rekombinanten MVA und MVA-Wildtyp auf fünf verschiedenen Zelllinien. Die Infektionen erfolgten mit einer MOI von 0,05. A) CEF und HaCaT, B) DF-1 und EqF, C) HeLa.

Die durchgeführten Wachstumsanalysen zeigen für die fünf rekombinanten Viren und das Wildtyp-MVA ein sehr ähnliches Replikationsverhalten auf allen untersuchten Zelllinien. Auf den permissiven CEF und DF-1 Zellen (Abbildungen 23A und 23B) konnte gezeigt werden, dass es allen rekombinanten Viren möglich war, eine Steigerung des Virustiters gegenüber der eingesetzten Menge um bis zu vier Zehnerpotenzen zu erreichen. Beginnend mit einem Ausgangstiter von 1×10^2 bis 1×10^3 PFU/ml erhöhte sich die Virusmenge innerhalb der nächsten 48 Stunden auf bis knapp 1×10^6 oder 1×10^7 PFU/ml. Auf permissiven Zellkulturen (CEF, DF-1) wiesen die rekombinanten MVA daher ein gutes Vermehrungspotential auf. Außerdem war zu erkennen, dass nach 48 Stunden der Titerhöchststand der rekombinanten MVA erreicht wurde und danach bis zum Ende des Experiments nach 72 Stunden stabil blieb oder wieder leicht abfiel. Im Gegensatz hierzu erfolgte in HaCaT und EqF (Abbildungen 23A und 23B) keine Replikation und in HeLa-Zellen (Abbildung 21C) höchstens in sehr geringem Ausmaß, mit einer maximalen Steigerung von einer halben Zehnerpotenz bei MVA-WNVprME₂ 72 Stunden nach der Infektion.

3. Analyse der rekombinanten Proteine

3.1 Rekombinante Proteinexpression in verschiedenen Zelllinien

Zur detaillierten Untersuchung und vor allem zum Vergleich der generierten MVA hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Produktion der rekombinanten Proteine während des viralen Lebenszyklus wurden die Zielzellen CEF, DF-1, HaCaT, HeLa und E9F mit den Viren infiziert, zu verschiedenen Zeitpunkten Proteinlysate hergestellt und mittels Immunoblot und WNV E-spezifischer, monoklonaler Antikörper analysiert.

3.1.1 CEF

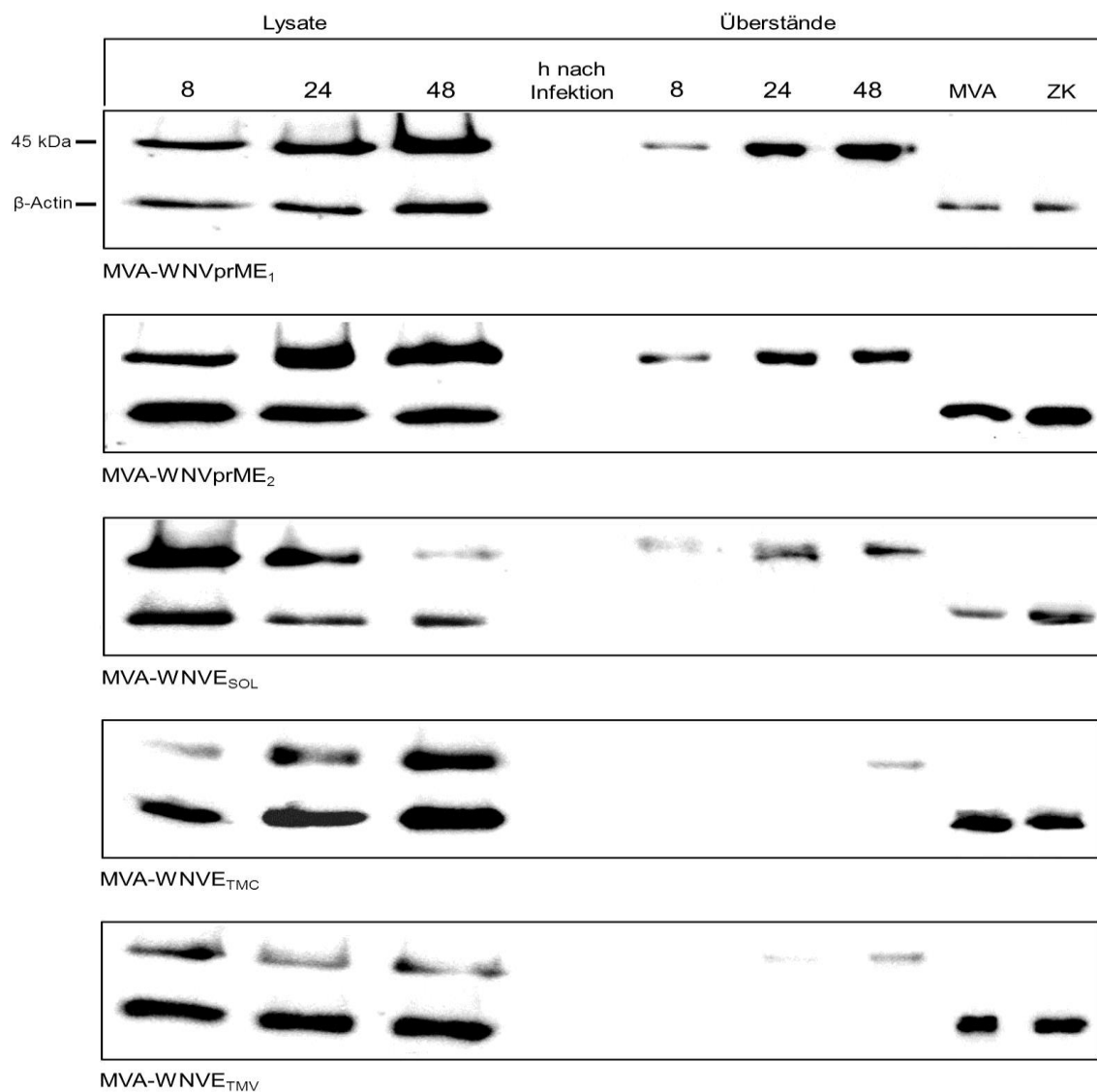


Abbildung 24: WNV E-Proteinexpression nach Infektion von CEF-Zellen. Die Probenentnahme erfolgte 8, 24 und 48 Stunden nach Infektion. Als Ladekontrolle diente β-Actin. MVA-WNVx: rekombinante Viren, MVA: Wildtyp-MVA-Kontrolle, ZK: Zellkontrolle, h: Stunden.

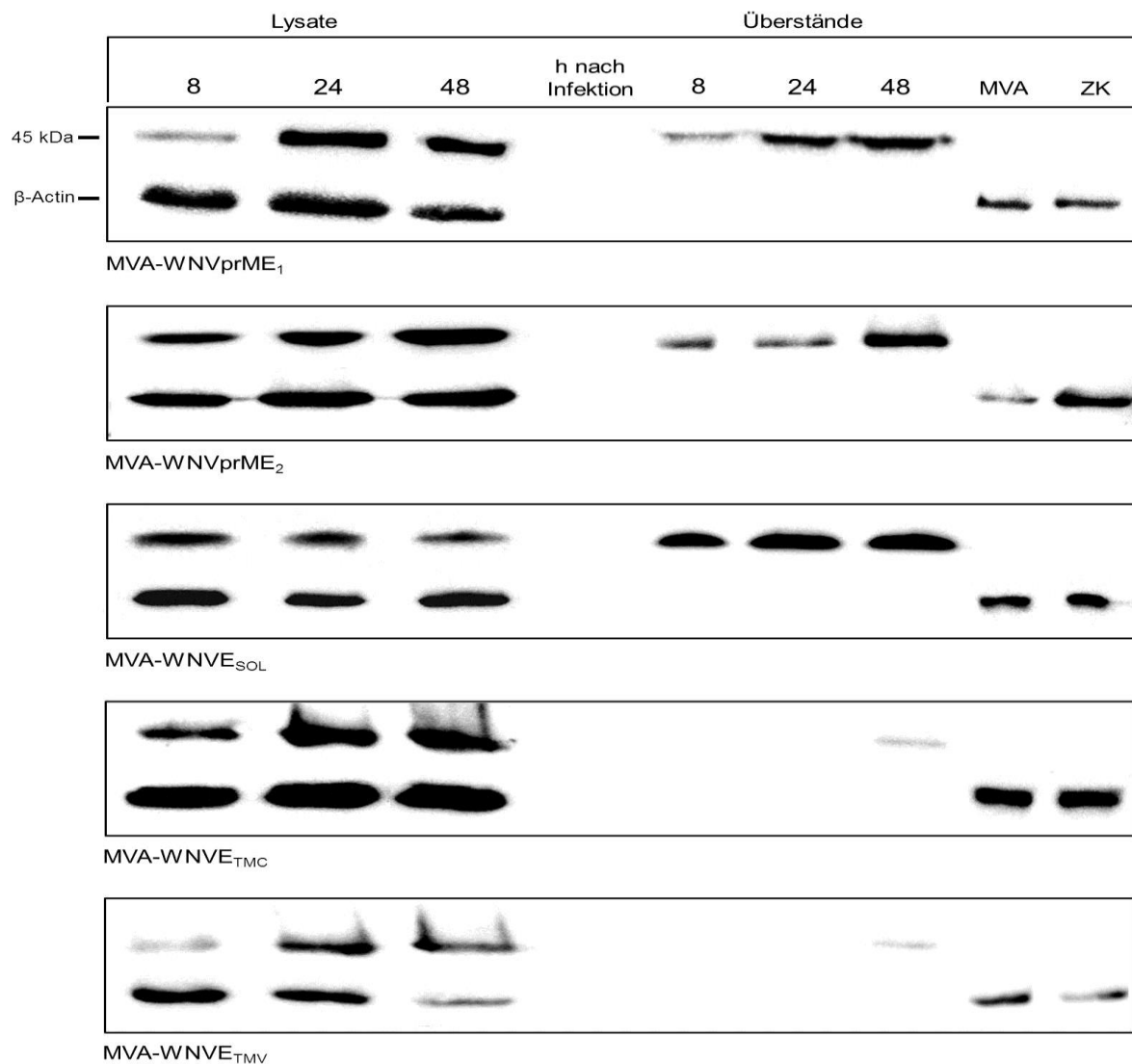
3.1.2 DF-1

Abbildung 25: WNV E-Proteinexpression nach Infektion von DF-1-Zellen. Die Probenentnahme erfolgte 8, 24 und 48 Stunden nach Infektion. Als Ladekontrolle diente β -Actin. MVA-WNVx: rekombinante Viren, MVA: Wildtyp-MVA-Kontrolle, ZK: Zellkontrolle, h: Stunden.

Die Westernblot-Analysen von Lysaten bzw. Überständen infizierter primärer Hühnerfibroblasten (Abbildung 24) und DF-1-Zellen (Abbildung 25) bestätigen die stabile Produktion rekombinanter WNV E-Proteine nach Infektion mit allen fünf Vektorviren. In den Zelllysaten waren grundsätzlich größere Mengen an E-Protein zu finden und bei einigen Viren, wie MVA-WNVE_{TMC} und auch den beiden MVA-WNVprMEs, konnte eine Zunahme der Proteinmenge in den Proben im Zeitverlauf beobachtet werden. Es war möglich in den Überständen von, mit MVA-WNVprME₁ und ₂, sowie MVA-WNVE_{SOL}, infizierten Zellen Banden

zunehmender Intensität zu detektieren. Dies wies auf eine Sekretion der Proteine aus den Zellen hin. Hingegen waren kaum bis gar keine E-Proteine in den Überständen von MVA-WNVE_{TMC} und MVA-WNVE_{TMV} nachzuweisen. Dies sprach für die erfolgreiche Verankerung der Proteine in den Zellmembranen infizierter Zellen.

3.1.3 HaCaT

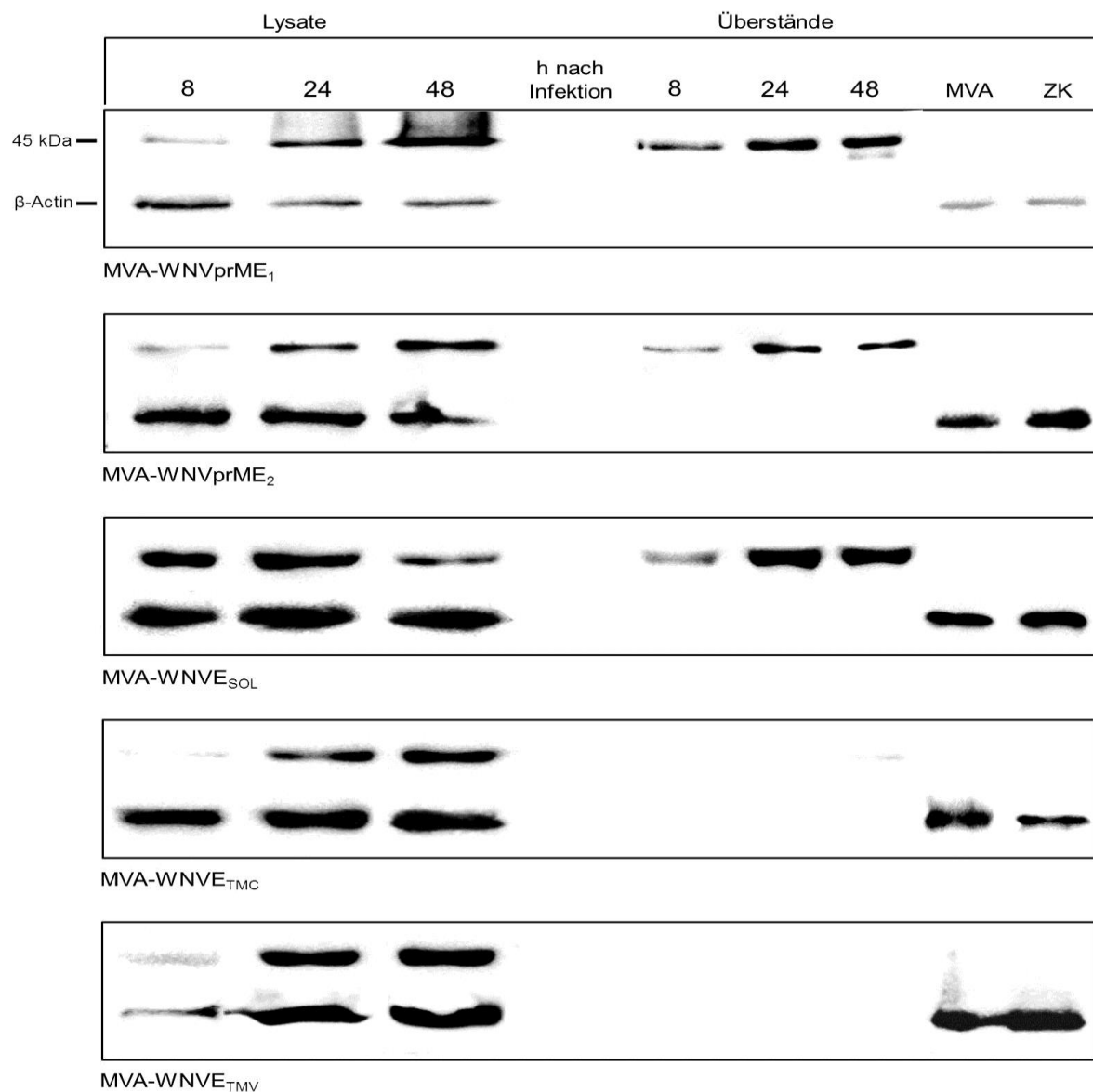


Abbildung 26: WNV E-Proteinexpression nach Infektion von HaCaT-Zellen. Die Probenentnahme erfolgte 8, 24 und 48 Stunden nach Infektion. Als Ladekontrolle diente β -Actin. MVA-WNVx: rekombinante Viren, MVA: Wildtyp-MVA-Kontrolle, ZK: Zellkontrolle, h: Stunden.

3.1.4 HeLa

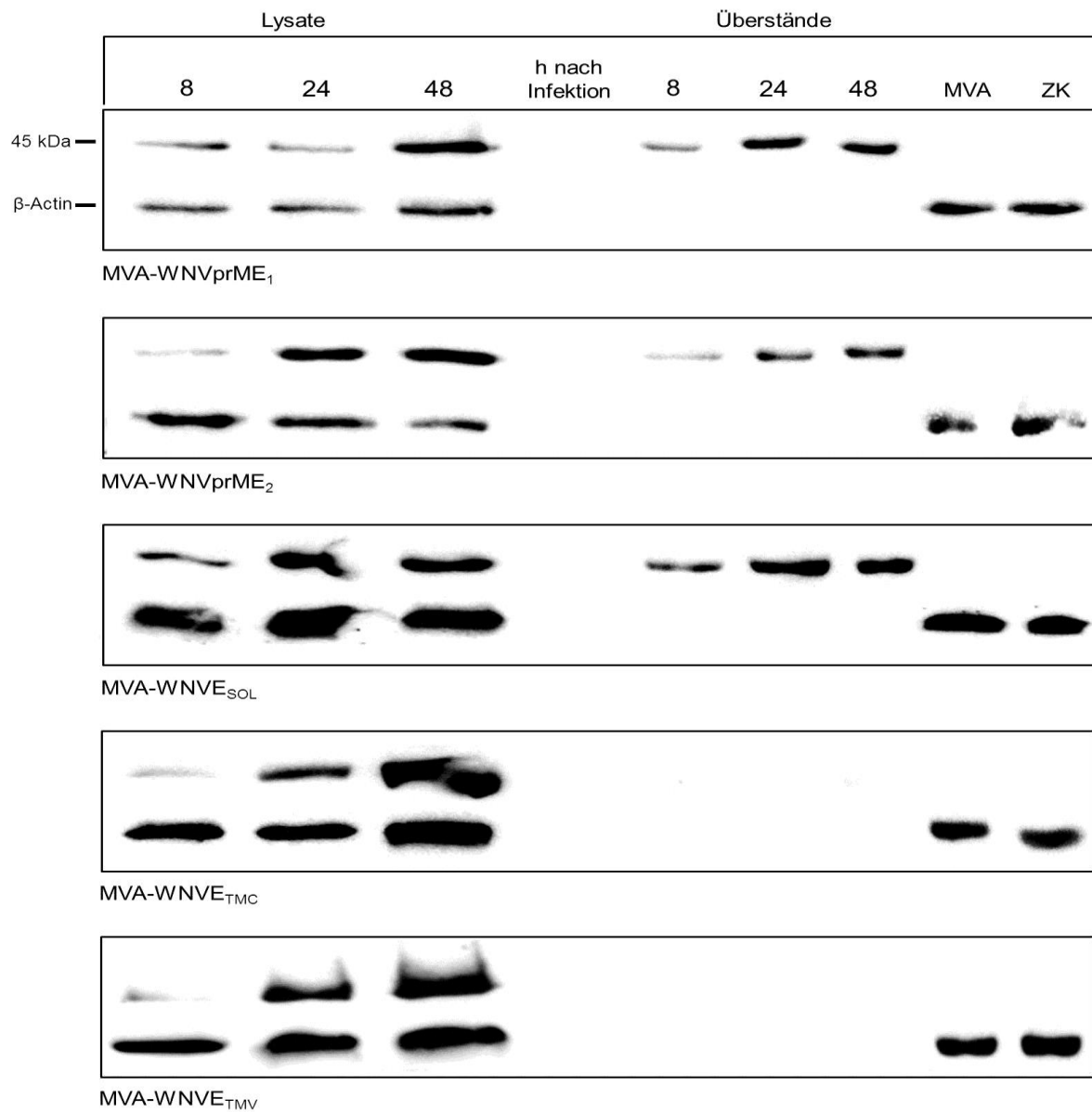


Abbildung 27: WNV - Proteinexpression nach Infektion von HeLa-Zellen. Die Probenentnahme erfolgte 8, 24 und 48 Stunden nach Infektion. Als Ladekontrolle diente β-Actin. MVA-WNVx: rekombinante Viren, MVA: Wildtyp-MVA-Kontrolle, ZK: Zellkontrolle, h: Stunden.

3.1.5 EqF

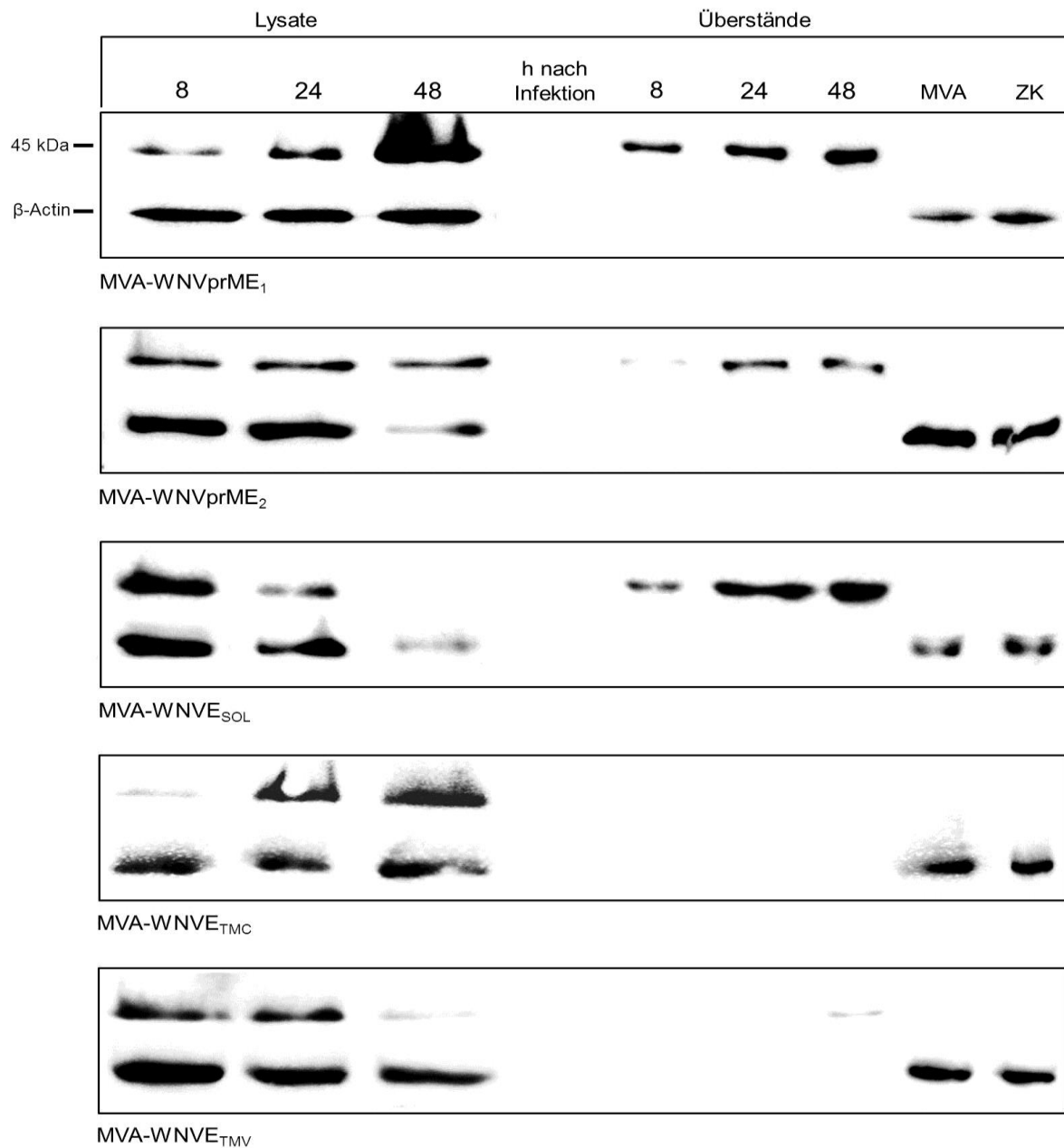


Abbildung 28: WNV E-Proteinexpression nach Infektion von Pferdefibroblasten. Die Probenentnahme erfolgte 8, 24 und 48 Stunden nach Infektion. Als Ladekontrolle diente β-Actin. MVA-WNVx: rekombinante Viren, MVA: Wildtyp-MVA-Kontrolle, ZK: Zellkontrolle, h: Stunden.

Auch nach Infektion von nicht-permissiven humanen und equinen Zellen war eine Proteinexpression nachzuweisen. Die Abbildungen 26, 27 und 28 veranschaulichen dies für HaCaT-, HeLa- und Pferdezellen. In den Zelllysaten waren ansteigende Mengen an E-

Protein zu finden. Die Zunahme der Konzentration an E-Protein in den Überständen konnte bei MVA-WNVprME₁ und ₂, sowie MVA-WNVE_{SOL} gezeigt werden, wohingegen MVA-WNVE_{TMC} und MVA-WNVE_{TMV} keine detektierbaren Mengen an E-Protein im Überstand aufwiesen. In der Darstellung der Ergebnisse bei den Pferdefibroblasten (Abbildung 28) war zum 48-Stunden-Zeitpunkt bei MVA-WNVE_{SOL} keine Bande erkennbar. Dieser Befund ergab sich daraus, dass hier weniger Protein aufgetragen wurde. Dies wurde durch den Nachweis einer verringerten Menge an β -Actin, welches als Ladekontrolle für die gesamte Proteinmenge verwendet wurde, bestätigt.

Insgesamt konnte eine produktive und stabile Proteinexpression aller rekombinanten Viren in den untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden.

3.2 Glykosylierung

Fast alle bekannten WNV besitzen im E-Protein eine einzige N-glykosidische Bindungsstelle für Zuckerreste. Diese liegt in der bei dieser Arbeit verwendeten Sequenz des Stammes WNV-NY99 an der Aminosäureposition 154. Die Glykosylierung des WNV E-Proteins wird häufig mit verstärkter Virulenz und Neuroinvasivität des Virus in Verbindung gebracht (Beasley et al. 2005) und scheint auch das Assembly und die Infektiosität zu beeinflussen (Hanna et al. 2005, Whiteman et al. 2010). Die rekombinanten Proteine wurden auf die Funktion der Glykosylierungsstelle untersucht. Hierfür wurden CEF-Zellen mit den rekombinanten MVA infiziert, nach 48 Stunden Infektion Überstände und Zelllysate gewonnen und die darin enthaltenen Proteine mit PNGase F (NEB, Schwalbach) laut Herstellerangaben behandelt. Die Westernblot-Analyse mit E-spezifischen Antikörpern bestätigte die Glykosylierung der WNV E-Proteine nach Infektion mit allen fünf rekombinanten Viren. Die Behandlung mit PNGase F erlaubte den Nachweis eines im Vergleich zu dem unbehandelten WNV E um etwa 2 kDa kleineren Proteins (Abbildung 29). Diese Größe entspricht dem erwarteten Molekulargewicht des an einer einzelnen Stelle deglykosylierten WNV E.

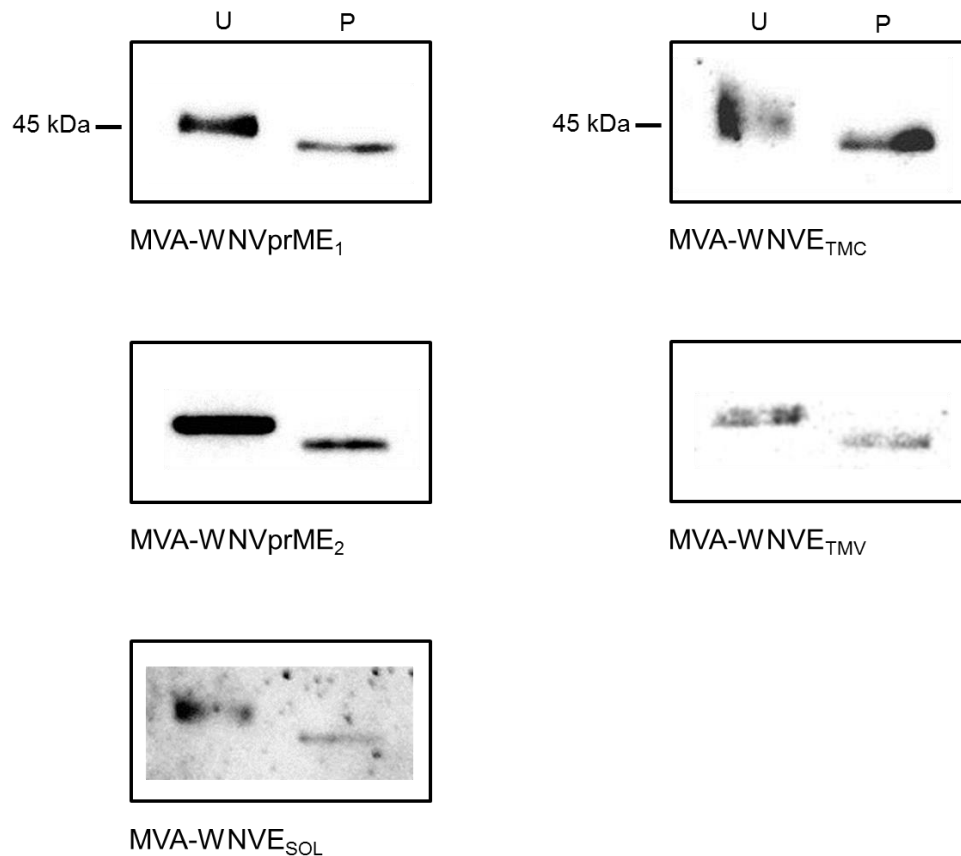


Abbildung 29: Deglykosylierung der rekombinanten E-Proteine. Westernblot-Untersuchung von Proteinlysaten mit E-spezifischen Antikörpern. Die Proben wurden 48h nach Infektion von CEF-Zellen mit dem jeweiligen Virus gewonnen und mit PNGase F (P) oder mock (U) behandelt.

3.3 Lokalisation der rekombinanten WNV-Proteine in infizierten HeLa-Zellen mittels Immunfluoreszenz und Konfokalmikroskopie

Mit den fünf konstruierten rekombinanten Viren wurde die Produktion verschiedener Formen von WNV E-Antigen beabsichtigt. Drei der generierten Viren sollten ein Ausschleusen der produzierten E-Proteine aus der infizierten Zelle ermöglichen. Durch die Expression der WNV-spezifischen cDNA in MVA-WNVprME₁ bzw. 2 sollten sich Virus-ähnliche Partikel (VLP - virus-like-particles) bilden, welche dann aus der Zelle transportiert werden. MVA-WNVE_{TMC} und MVA-WNVE_{TMV} hingegen sollten zur Verankerung des E-Proteins an der Plasmamembran infizierter Zellen führen. Zur Untersuchung der Expression und Lokalisation der rekombinanten Zielproteine wurden HeLa-Zellen mit den verschiedenen Vektoren

infiziert und 24 Stunden nach Infektion mittels Immunfluoreszenz und Konfokalmikroskopie analysiert.

3.3.1 MVA-WNVprME₁

Das Ziel der Konstruktion der rekombinanten MVA-WNVprME-Viren war es, durch die simultane Expression beider Hüllproteine des WNV (prM/M und E) VLPs zu erzeugen, die aus den Zellen über den natürlichen Sekretionsweg des Golgi-Apparates ausgeschleust werden sollten.

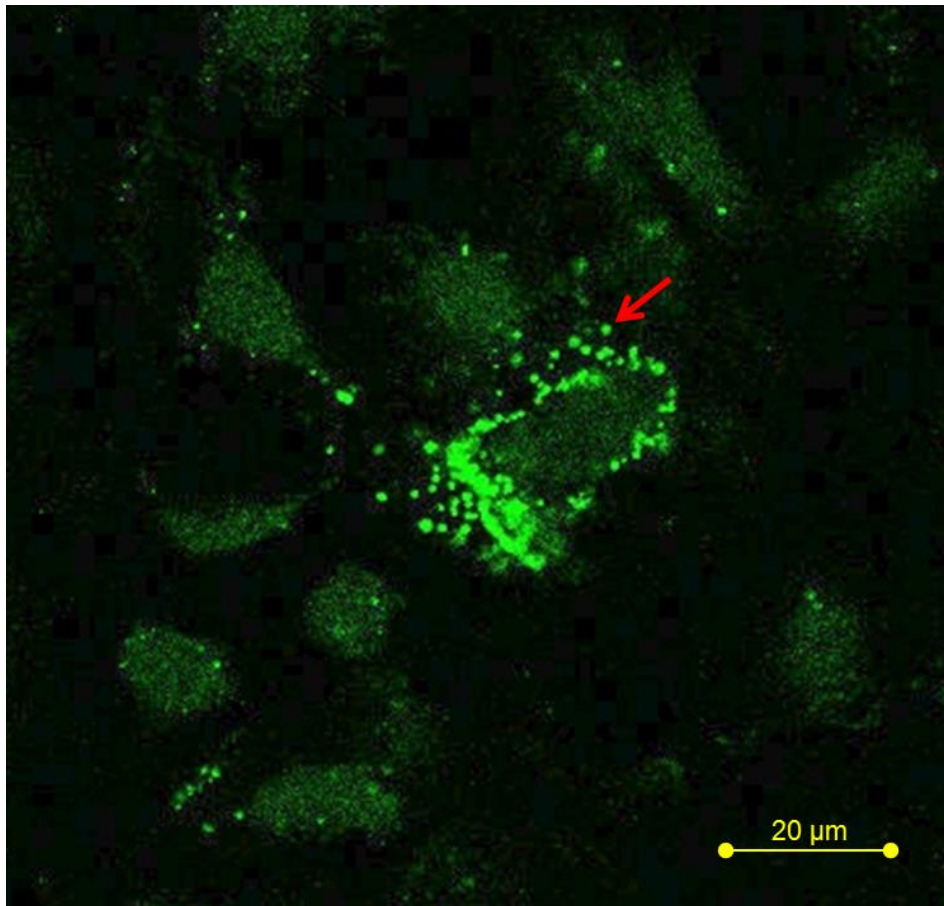


Abbildung 30: Konfokalmikroskopische Aufnahme einer mit MVA-WNVprME₁ infizierten HeLa-Zelle. Die Detektion der E-Proteine erfolgte mittels monoklonalem WNV-E-Antikörper und des grün fluoreszierenden Sekundärantikörpers Alexa Fluor 488 F(ab)₂. → Pfeil: grün-fluorisierendes Partikel.

Wie aus Abbildung 30 hervorgeht, konnten im Konfokalmikroskop infizierte HeLa-Zellen detektiert werden, die im Gegensatz zu nicht-infizierten Zellen, eine deutliche Anfärbung der Zellmembranen und deren Randbereiche aufwiesen. Dieses Ergebnis bestätigte zunächst die Synthese von E-Proteinen in infizierten Zellen. Außerdem erschien die spezifische Fluoreszenz vor allem kleinere Partikel (Pfeil) zu betreffen, welche rund um die Zellen oder in der Nähe zu finden waren. Da dies häufig zu beobachten war und infizierte Zellen nur so aussahen, wurden diese Partikel als mögliche VLPs oder aufgrund ihrer Größe als VLP-Aggregate interpretiert, welche gerade aus der Zelle ausgeschleust wurden oder schon waren.

3.3.2 MVA-WNVE_{SOL}

Die Entfernung der Transmembrandomäne des WNV E-Proteins sollte, die Synthese eines nicht in zellulären Membranen verankerten E-Proteins ermöglichen, welches in Virus infizierten Zellen als ein lösliches (soluble) Protein aus der Zelle sezerniert werden sollte. Der Nachweis eines löslichen E-Proteins mittels Immunfluoreszenzfärbung ist jedoch schwierig.

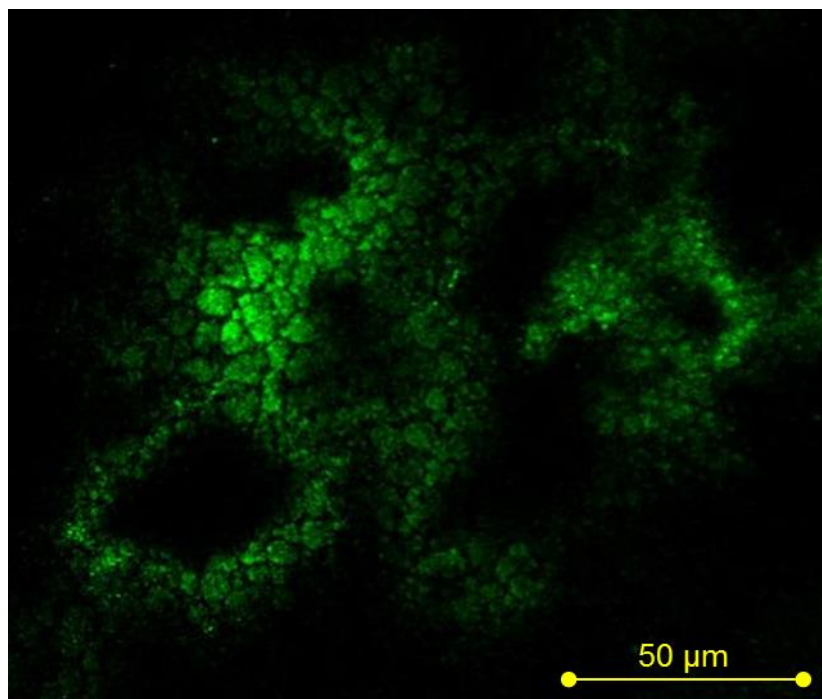


Abbildung 31: Konfokalmikroskopische Aufnahme von MVA-WNVE_{SOL} infizierten HeLa-Zellen. Die Detektion der E-Proteine erfolgte mittels monoklonalem WNV-E-Antikörper und des grün fluoreszierenden Sekundärantikörpers Alexa Fluor 488 F(ab)₂.

Wie in Abbildung 31 zu sehen, konnte in infizierten Zellkulturen eine spezifische grüne Fluoreszenz detektiert werden. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um die Anfärbung intrazellulär lokalisierter E-Proteine. Eine Einordnung der vorhandenen Fluoreszenz war jedoch nicht möglich.

3.3.3 MVA-WNVE_{TMC} und MVA-WNVE_{TMV}

Hinter der Konstruktion dieser beiden rekombinanten Viren stand die Idee das E-Protein auf der Zelloberfläche zu exponieren. Hierfür wurde angenommen, dass der Austausch der ursprünglichen Transmembrandomäne des WNV E mit der des E2-Proteins (Hüllprotein) von Chikungunyavirus oder der des A56-Proteins (Hämagglutinin) von Vacciniavirus zur Verankerung von E an der Plasmamembran führen könnte.

MVA-WNVE_{TMC}

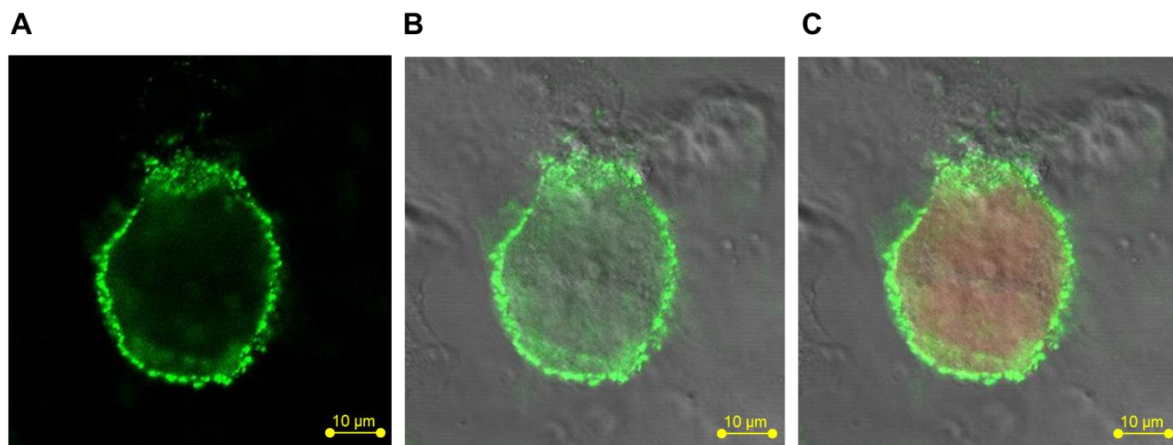


Abbildung 32: Konfokalmikroskopische Aufnahmen einer mit MVA-WNVE_{TMC} infizierten HeLa-Zelle. A) Fluoreszenzaufnahme, B) Phasenkontrastaufnahme mit Überlagerung des grünen Fluoreszenzkanals, C) Phasenkontrastaufnahme und zusätzlichem roten, mCherry-Fluoreszenzkanal. Die Detektion der E-Proteine erfolgte mittels monoklonalem WNV-E-Antikörper und des grün fluoreszierenden Sekundärantikörpers Alexa Fluor 488 F(ab)₂. Die Ko-Expression von mCherry erlaubte die Darstellung Virus-infizierter Zellen durch Sichtung auf rote Fluoreszenz.

Das E-Protein mit der Transmembrandomäne aus Chikungunyavirus konnte nach Infektion mit MVA-WNVE_{TMC} an der Plasmamembran infizierter Zellen mittels grüner Fluoreszenz detektiert werden (Abbildung 32). Zur Überprüfung, ob es sich bei den grün geränderten Gebilden tatsächlich um Zellen handelte, wurden Phasenkontrastaufnahmen erzeugt

(Abbildung 32B und 32C). In diesen war die Struktur einer Zelle erkennbar und in Abbildung 32C wies die zusätzliche Detektion des rot fluoreszierenden mCherry darauf hin, dass die Struktur als Zelle identifiziert werden konnte. Für die Infektion wurde ein noch mCherry-enthaltendes Stockvirus verwendet.

MVA-WNVE_{TMV}

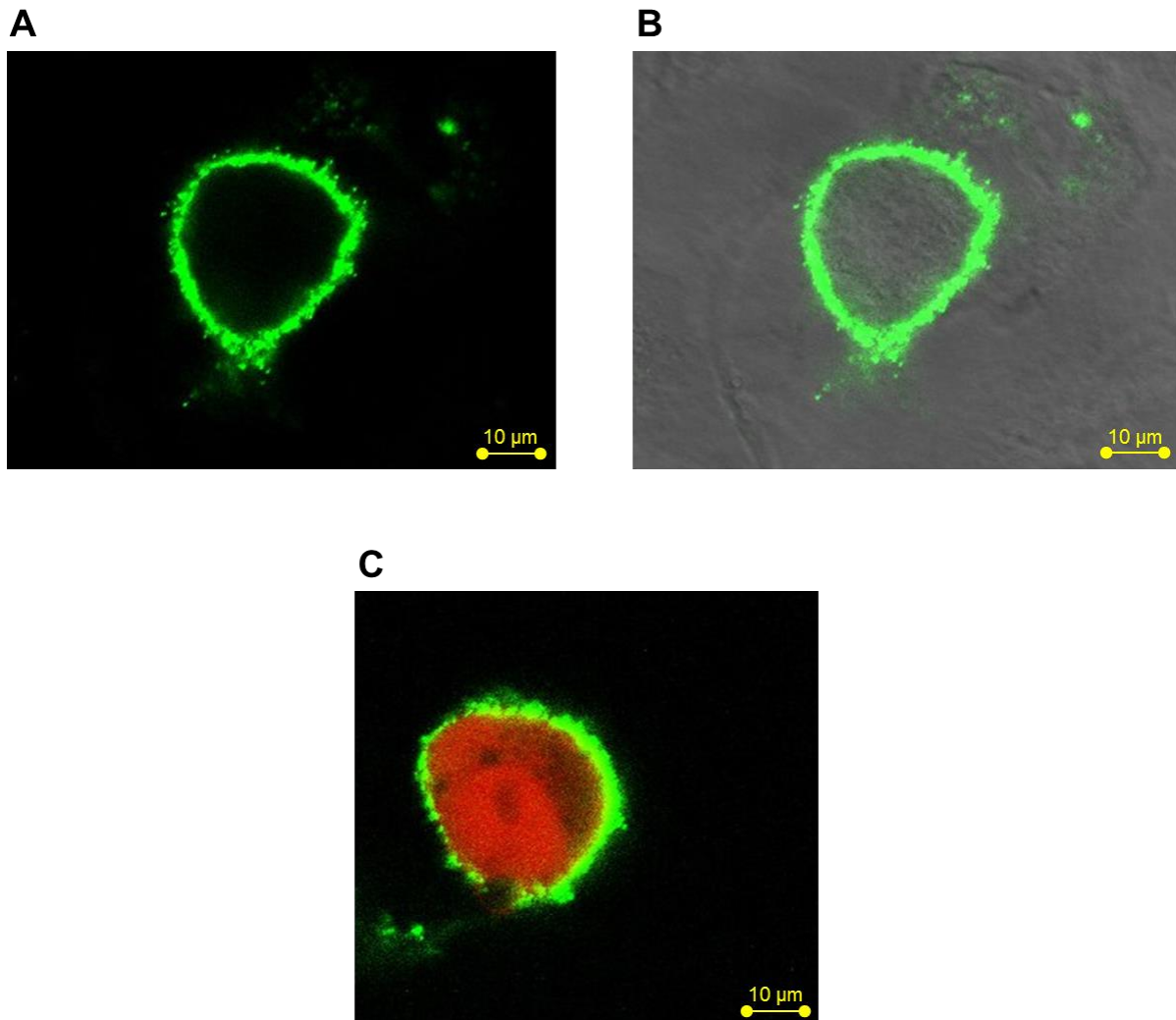


Abbildung 33: Konfokalmikroskopische Aufnahmen einer mit MVA-WNVE_{TMV} infizierten HeLa-Zelle. A) Fluoreszenzaufnahme, B) Phasenkontrastaufnahme mit Überlagerung des grünen Fluoreszenzkanals, C) Aufnahme mit zusätzlichem roten, mCherry-Fluoreszenzkanal. Die Detektion der E-Proteine erfolgte mittels monoklonalem WNV-E-Antikörper und des grün fluoreszierenden Sekundärantikörpers Alexa Fluor 488 F(ab)₂. Die Ko-Expression von mCherry erlaubte die Darstellung Virus-infizierter Zellen durch Sichtung auf rote Fluoreszenz.

Das rekombinante MVA-WNVE_{TMV} mit der Transmembrandomäne von Vacciniavirus lieferte das gleiche Ergebnis wie MVA-WNVE_{TMC}. Auch hier waren im Phasenkontrast und mit roter Fluoreszenz die Zellen und deren E-Proteinexpression auf den Plasmamembranen deutlich zu erkennen (Abbildung 33).

4. Immunogenität im Mausmodell

4.1 Antikörperantwort (Antigen-ELISA)

Die Überprüfung der Immunogenität der rekombinanten MVA erfolgte nach Impfung im Mausmodell. Hierfür wurden 6 - 8 Wochen alte weibliche Balb/c-Mäuse (Charles River, Sulzfeld) mit jeweils 1×10^8 PFU der rekombinanten Viren im Abstand von 21 Tagen zweimal immunisiert. Die Induktion einer WNV-spezifischen humoralen Immunantwort und somit die Bildung von WNV E-spezifischen Antikörpern wurde im ELISA getestet. Als Antigen für den ELISA diente, im Baculovirus-Expressionssystem hergestelltes, WNV E-Protein (freundlicherweise erhalten von Dr. Gorben Pijlman, Universität Wageningen).

Die Abbildung 34 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse und den Vergleich der Antikörperimmunantwort nach Erstimmunisierung und Auffrischungsimpfung (Abbildung 34A und 34B). Die Immunisierungen mit allen rekombinanten Viren induzierten eine WNV-Antikörperantwort. Interessanterweise zeigten sich jedoch Unterschiede zwischen den Konstrukten. Nach der ersten Immunisierung von Mäusen mit MVA-WNVE_{SOL} konnte die größte Menge an WNV-spezifischen Antikörpern detektiert werden, gefolgt von MVA-WNVE_{TMV}. Die zweite Immunisierung führte grundsätzlich bei allen Impfstoffen zur Detektion WNV E-spezifischer Antikörper. MVA-WNV_{TMC} erzielte nach der ersten Immunisierung annähernd gleiche Werte wie MVA-WNV_{TMV}, nach der Auffrischungsimpfung fiel die Antikörperreaktion jedoch ab. Gleichbleibende Antikörpermengen im Serum nach erster und zweiter Immunisierung konnten bei MVA-WNVprME₁ infizierten Mäusen beobachtet werden. Insgesamt glichen sich die Antikörpertiter aller rekombinanten MVA nach beiden erfolgten Immunisierungen an. In den negativen Kontrollmäusen konnten keine WNV-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden.

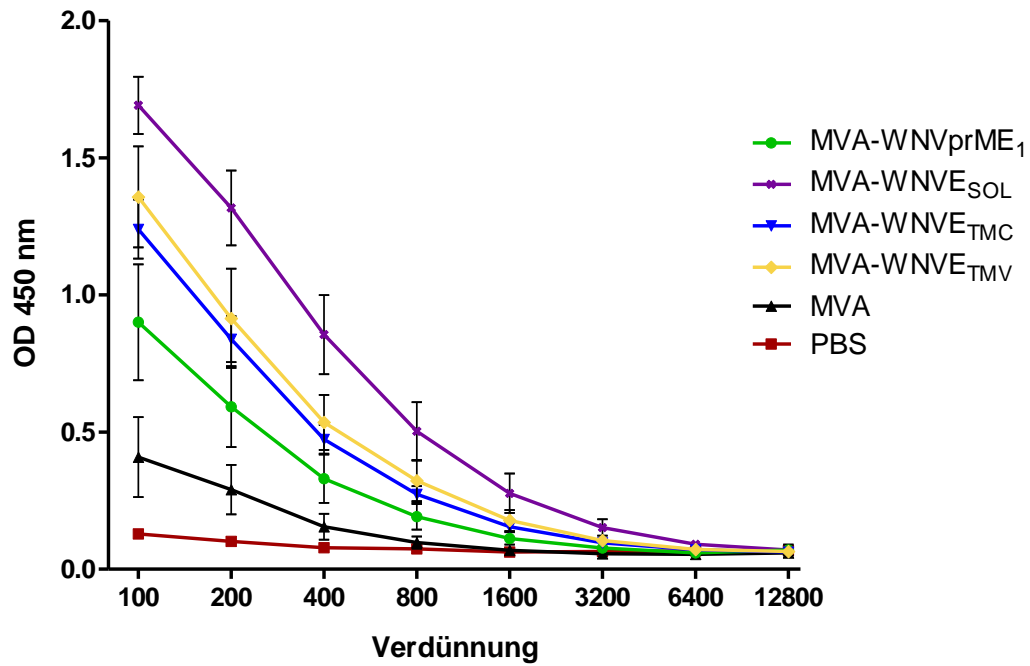
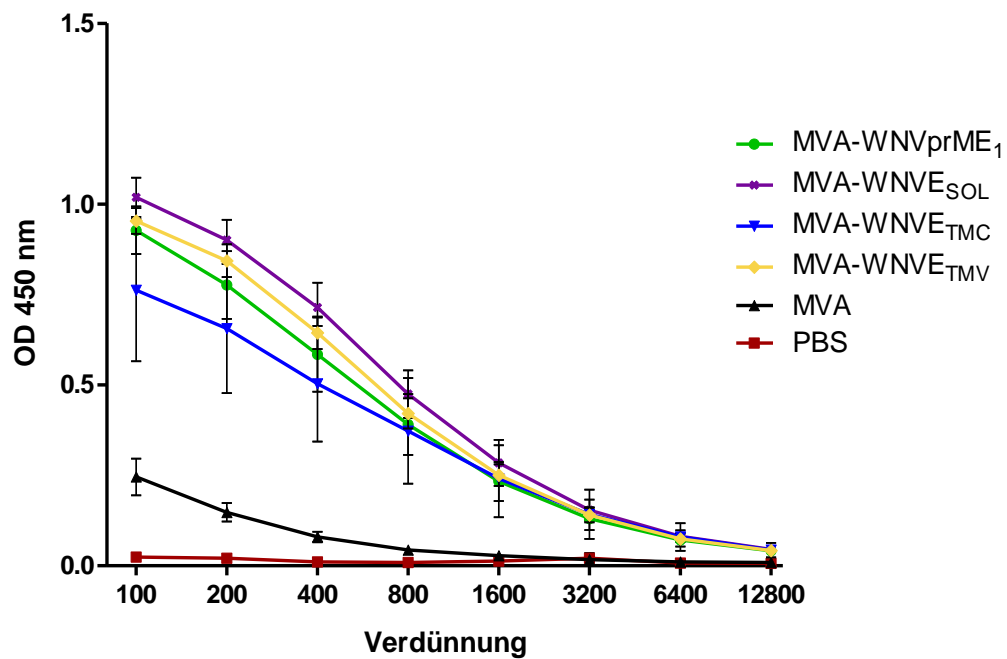
A**B**

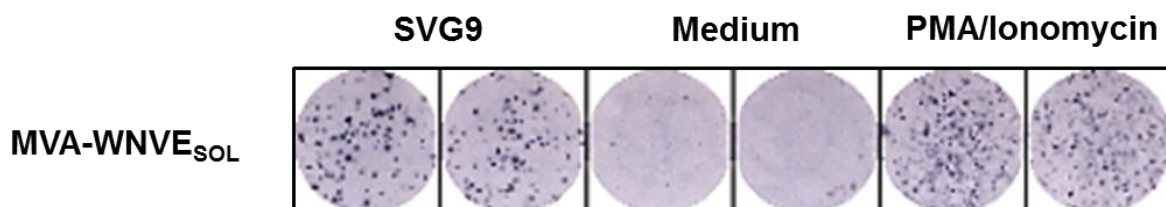
Abbildung 34: Detektion WNV-spezifischer Antikörper mittels ELISA. A) nach der Erstimmunisierung (Tag 18 p.i.), B) nach der zweiten Immunisierung (Tag 31 p.i.). Die Verdünnungen der Seren erfolgte von 1:100 bis 1:12800. Zelllysate mit hoher Konzentration an WNV E-Protein dienen als Antigen. Die Seren der Mäuse jeder Impfgruppe wurden zusammengesfasst. Mittelwerte aus Duplikaten \pm SEM.

4.2 T-Zell-Antwort (IFN- γ -ELISpot)

Eine Nachweismöglichkeit induzierter zellulärer Immunreaktionen ist die Messung der Interferon- γ -Produktion der CD8⁺ T-Zellen nach Stimulation mit einem entsprechenden Antigen. Dies erfolgte mittels ELISpot-Analyse. Hierfür wurden Milzzellen geimpfter transgener HLA-A2.1 Mäuse verwendet. Als Positivkontrolle wurde PMA/Ionomycin und als Negativkontrolle nur das Zellkulturmedium angewendet.

Die Abbildung 35A zeigt die exemplarische Darstellung einer ELISpot-Analyse des Konstrukts MVA-WNVE_{SOL}. Es ist visuell ein Unterschied in der Spot-Anzahl zwischen den Peptid (SVG9), den Zellkulturmedium und den PMA/Ionomycin stimulierten Splenozyten erkennbar. Dieses Ergebnis ließ sich auch quantitativ bestätigen (Abbildung 35B). Insgesamt induzierten alle Konstrukte eine deutliche WNV-spezifische IFN- γ -Aktivität (Abbildung 35B). Mit rund 400 gezählten Spots konnte MVA-WNVE_{TMC} die beste IFN- γ -Antwort induzieren, jedoch dicht gefolgt von MVA-WNVprME₁ und MVA-WNVE_{TMV} mit auch jeweils über 300 gezählten Farbpunkten. Im Vergleich hierzu konnte kein IFN- γ durch die Inkubation der Zellen mit Zellkulturmedium, jedoch aber eine gute Stimulation durch PMA/Ionomycin als Positivkontrolle nachgewiesen werden. Auffällig war jedoch der Unterschied zwischen MVA-WNVE_{SOL} und den anderen drei rekombinanten Viren, der sich als signifikant herausstellte. Im direkten Vergleich zeigte sich die INF- γ -Aktivität dieses Konstrukts mehr als um die Hälfte niedriger, als jene von MVA-WNVE_{TMC}.

A



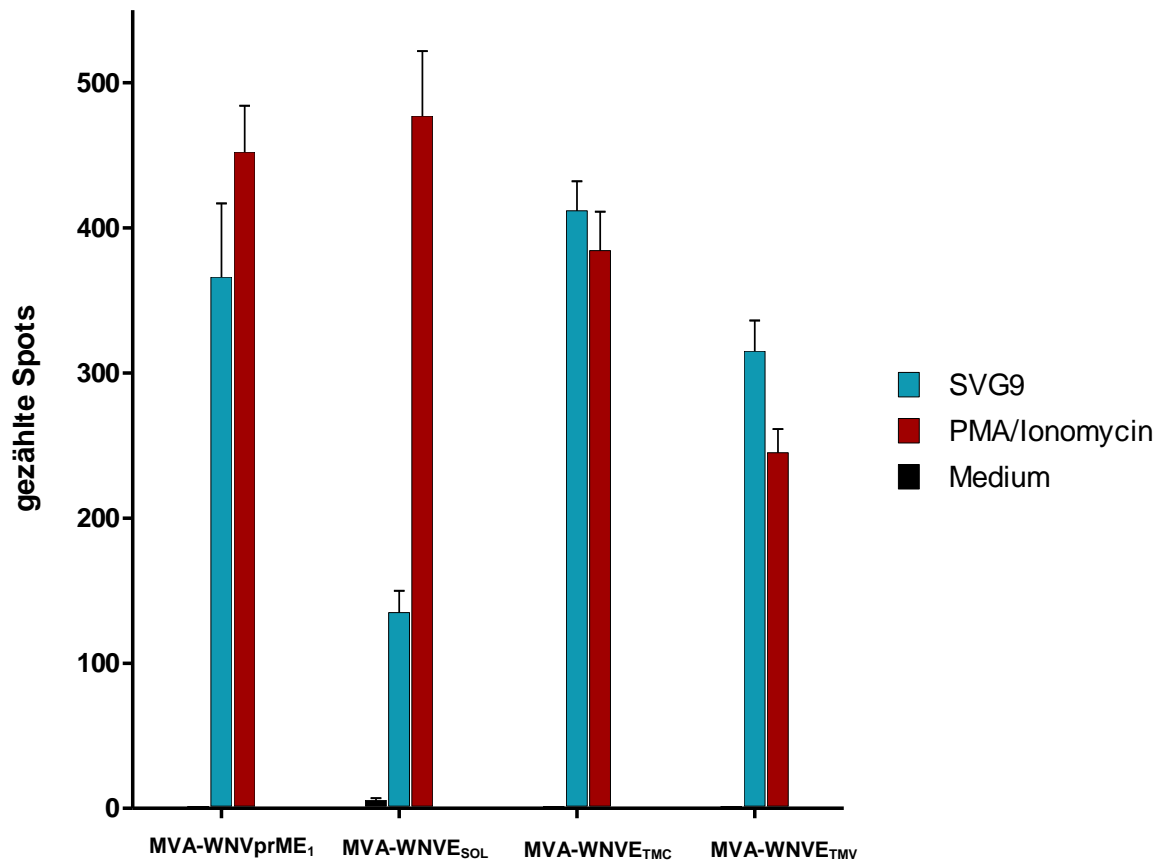
B

Abbildung 35: Darstellung des INF- γ -ELISpots nach Immunsierung mit den rekombinanten MVA. A) Exemplarische Darstellung der Spot-Anzahl einer ELISpot-Analyse des MVA-WNVE_{SOL}-Virus. B) Graphische Auswertung des INF- γ -ELISpots der Konstrukte. Splenozyten geimpfter Mäuse wurden 48 Stunden mit SVG9, PMA/Ionomycin und reinem Zellkulturmedium stimuliert und danach die INF- γ -Aktivität gemessen. PMA/Ionomycin diente als Positiv- und das Medium als Negativkontrolle. Darstellung der Mittelwerte aus Quadruplikaten \pm SEM.

V. DISKUSSION

Pockenviren werden bereits seit längerem als anerkannte Werkzeuge zur Expression von Fremd-DNA und in der Impfstoffforschung verwendet. Vor allem das Modifizierte Vacciniavirus Ankara (MVA) gilt als besonders geeignet für die präklinische und klinische Forschung auf diesem Gebiet. Eine Vielzahl von Untersuchungen, Tierstudien und auch Patientendaten bestätigen die effiziente Expression verschiedener rekombinanter Antigene, sowie die erfolgreiche Induktion von Immunantworten durch MVA (Amara et al. 2001, Bender et al. 1996, Gherardi et al. 2004, Hanke et al. 1999, Sutter et al. 1994, Wyatt et al. 1996). Ziel dieser Arbeit war (1) die Generierung fünf verschiedener rekombinanter MVA zur Produktion rekombinanter WNV-Antigene, (2) deren Charakterisierung, (3) deren Untersuchung hinsichtlich ihrer Immunogenität, sowie (4) die Bewertung auf ihre Eignung als potentielle Vakzinkandidaten. Nachfolgend werden diese vier Arbeitsbereiche näher diskutiert:

1. Generierung rekombinanter MVA zur Produktion von WNV-Antigenen

Die Gensequenzen des nordamerikanischen WNV-Stammes NY99 wurden für diese Arbeit als Ausgangsbasis gewählt, da dieser Stamm in der WNV-Impfstoffforschung zu den am häufigsten verwendeten Stämmen zählt (Davis et al. 2001, Lieberman et al. 2007, Martin et al. 2007, Martina et al. 2008b). Als Antigene wurden die beiden Hüllproteine des WNV, prM/M (precursor Membrane/Membrane) und E (Envelope), verwendet. Insgesamt wurden fünf verschiedene rekombinante Viren hergestellt, die die Produktion unterschiedlicher Formen des E-Proteins erlauben sollten. Das E-Antigen ist von besonderer Bedeutung, da es nach einer Infektion das Hauptzielantigen der humoralen und zellulären Immunantwort darstellt und eine Vielzahl an immunogenen und protektiven Epitopen aufweist (Colombage et al. 1998, Oliphant et al. 2007, Throsby et al. 2006).

Zur Generierung aller fünf Transferplasmide wurde der Ausgangsvektor pIIIH5RedK1L herangezogen (Kremer et al. 2012). Die WNV-Zielgensequenzen wurden in die Deletion III des MVA-Genoms inseriert. Die Del III ist eine von sechs natürlich vorkommenden Deletionen und wird bereits seit langem erfolgreich als Insertionsstelle eingesetzt. Sie eignet sich hervorragend für den stabilen Einbau und die Expression von Fremd-DNA (Drexler et al. 2004, Sutter und Moss 1992). Homologe Sequenzen zu den Flank-Regionen dieses Insertionsortes befanden sich im Vektorplasmid, da die Generierung der rekombinanten MVA mittels homologer Rekombination erfolgen sollte. Diese Methode gilt als sehr effizient, um Fremd-DNA in das MVA-Genom zu inserieren (Mackett et al. 1982, 1984). Die Anwesenheit des rot-fluoreszierenden mCherry als Selektionsmarker ermöglichte es, die erfolgreich

verlaufenen, Rekombinationsevents einfach und schnell mittels Fluoreszenzmikroskopie zu detektieren. Durch die kontinuierliche Weiterpassagierung, der von den rekombinanten Viren verursachten, rot-fluoreszierenden Plaques war es schnell und effektiv möglich, auf rekombinante MVA zu selektieren. Die Verwendung eines fluoreszierenden Selektionsmarkers war die Methode der Wahl, da die hergestellten Vektorviren als potentielle Vakzinkandidaten für klinische Studien geeignet sein sollten. Andere Selektions-Methoden, wie etwa die „host-range“-Selektion mittels RK-13 Zellen, sind dafür nicht zugelassen (Kremer et al. 2012).

Bei dem im Transferplasmid bereits vorhandenen synthetischen Vaccinia-Promotor PmH5 handelt sich um einen früh/spät-Promotor, der hauptsächlich für die Verwendung in Vakzinkandidaten entwickelt wurde. Er soll eine potente, während des Replikationszyklus andauernde, Genexpression induzieren und enthält einen besonders starken frühen Anteil. Es ist bekannt, dass dies für die Initiation einer zellulären Immunantwort von Vorteil ist (Wyatt et al. 1996). Die fertigen Vektorplasmide unterschieden sich nur in der integrierten Zielgenesequenz („Gene of Interest“). Dies bedeutete, dass alle rekombinanten MVA, bis auf die inserierten Gene, identisch waren. Damit sollte die Vergleichbarkeit der rekombinanten Vakzinkandidaten gewährleistet werden.

Im Zuge der Viruspassagen bei der Herstellung rekombinanter MVA kann es zu genomischen Rearrangements kommen. Das Gen C7L ist durch seine Lage in den terminalen Sequenzwiederholungen des MVA-Genoms anfällig für solche genomischen Rearrangements und kann daher als Referenz für die genomische Stabilität herangezogen werden. Die Überprüfung der Anwesenheit und der korrekten Größe des C7L-Gens im Genom der hergestellten Vektorviren war notwendig, da die Konstrukte für die potentielle spätere Anwendung in klinischen Studien entwickelt wurden und hierfür die Stabilität der Virusgenome besonders wichtig ist. Außerdem ist bekannt, dass eine späte Genexpression von MVA in nicht-permissiven humanen Zellen von der C7L-Genfunktion abhängig ist (Backes et al. 2010). Da der Promotor PmH5 auch späte Anteile besitzt, ist eine optimale Proteinausbeute nur möglich, wenn eine späte Genexpression nicht gestört ist.

2. Charakterisierung der rekombinanten MVA

Bei der Herstellung neuer rekombinanter Viren für die Impfstoffproduktion ist es wichtig nachzuweisen, dass diese die gleichen Sicherheitsmerkmale wie das Wildtyp-MVA, aufweisen. Es ist belegt, dass MVA ein sehr enges Wirtsspektrum besitzt und sich in vom Menschen stammenden und den meisten Säugerzellen, außer Baby Hamster Kidney-Zellen (BHK-21), nicht produktiv replizieren kann (Drexler et al. 1998). Diese Replikationsdefizienz

sollten auch die rekombinanten Viren aufweisen und somit ihre biologische Sicherheit belegt werden. In permissiven Zellen (CEF, DF-1) hingegen war es wichtig, dass sich die in das MVA-Genom integrierten DNA-Sequenzen nicht negativ auf den Replikationszyklus auswirkten, um bei der Amplifikation für die Virusstock-Erzeugung hohe Titer zu gewährleisten. Die Analyse des Wachstumsverhaltens ist daher ein wichtiger Schritt zur Charakterisierung von MVA-Vektorvakzinen. Für die Bewertung der Vermehrungsfähigkeit der Viren ist die Mehrstufen-Wachstumsanalyse eine geeignete Methode. Sie zeigt die Fähigkeit von Virionen sich auf einem Zellrasen auszubreiten und lässt die quantitative Bestimmung neu gebildeter infektiöser Viruspartikel zu (Staib et al. 2004). Hierfür wurden in dieser Arbeit, neben den permissiven CEF und DF-1, die beiden humanen Zelllinien HeLa und HaCaT, sowie primäre Pferdefibroblasten (EqF) als Zielzellen für die Untersuchungen verwendet. Der Vergleich zwischen CEF- und DF-1-Zellen war deshalb interessant, da die Möglichkeit zur Produktion von rekombinantem MVA in größerem Maßstab durch die Verwendung einer permanenten Zelllinie, wie den DF-1, wesentlich erleichtert würde. Obwohl in der Vergangenheit auch andere Zelllinien als potentielle Wirtszellen zur MVA-Produktion untersucht wurden (Drexler et al. 1998), finden CEF-Zellen am häufigsten Anwendung. Als primäre Zellen sind sie jedoch für die biotechnologische Produktion in größerem Maßstab in einigen Belangen von Nachteil. So erfordert die Produktion und die Kultur von CEF-Zellen Erfahrung in der Präparation von primären Zellen und ist von der Qualität und Verfügbarkeit von SPF-Eiern abhängig. Außerdem ist die Lebensdauer dieser Zellen auf einige, wenige Passagen begrenzt und erfordert eine wöchentliche Neupräparation (Drexler et al. 1998). Die Ergebnisse der DF1-Zellen sind mit denen der CEF-Zellen vergleichbar, wobei ein deutlicher Titerabfall bei den rekombinanten Viren 72 Stunden nach Infektion in den DF-1-Zellen erkennbar war (siehe Abbildung 23B). Bei einem Erntezeitpunkt von 48 Stunden p.i. waren jedoch keine Unterschiede in der Höhe der erzielten Virustiter in CEF- und DF-1-Zellen beobachtbar. Es wäre daher auch möglich die Amplifikation zur Herstellung von hochtitrigen Virusstocks in der permanenten Zelllinie DF-1 durchzuführen.

Die Replikationsdefizienz der rekombinanten Viren in den Zielzellen konnte in den beiden humanen Zelllinien, sowie den Pferdefibroblasten eindeutig nachgewiesen werden. In HaCaT und den EqF blieb die Quantität der ermittelten PFU über die gesamte Dauer des Experiments auf dem gleichen Niveau der eingesetzten Menge (siehe Abbildungen 23A und 23B) und zeigt somit, dass keine Vermehrung der Viren stattfinden konnte. In den HeLa-Zellen zeigte sich zwar eine Replikation, aber in äußerst geringem Ausmaß (siehe Abbildung 23C). Dass dies bei diesem Zelltyp möglich ist, wurde bereits in der Vergangenheit beschrieben (Caroll und Moss 1997, Drexler et al. 1998, Meyer et al. 1991, Wyatt et al. 1998).

Die Fähigkeit zur rekombinanten Proteinsynthese in den Zielzellen ist eine wichtige Eigenschaft von MVA-Vektorvakzinen. Die Untersuchung der fünf Konstrukte hierzu erfolgte mittels Westernblot-Analysen, in denen auch eine Zeitkinetik (8, 24 und 48 Stunden) des Infektionsverlaufs dargestellt wurde. Außerdem wurde die Lokalisation der von den Vektorviren exprimierten rekombinanten E-Proteine ermittelt. Hierfür fanden die Methoden der Konfokalmikroskopie und Immunfluoreszenzfärbung Anwendung. HeLa-Zellen wurden, stellvertretend für nicht-permissive Zielzellen, mit den Viren infiziert. Die low-MOI-Infektion von 0,05 bewirkte, dass einzelne infizierte Zellen sich deutlich von den, um sie herum liegenden, nicht-infizierten Zellen unterscheiden ließen.

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Proteinsynthese- und Lokalisationsanalysen für die Konstrukte im Einzelnen besprochen:

MVA-WNVprME₁ und MVA-WNVprME₂

Die Infektion von Zellen mit diesen Vektorviren sollte die Produktion von VLPs (virus-like particles) erlauben, die nachfolgend von den infizierten Zellen freigesetzt werden sollten. Die Bildung von kleinen, kapsidlosen und nicht-infektiösen VLPs oder RSPs (recombinant subviral particles) durch eine Ko-Expression der prM- und E-Gene des WNV, wurde bereits mehrfach beschrieben (Ohtaki et al. 2010, Wang et al. 2009, Qiao et al. 2004). Außerdem sind VLPs allgemein für die Impfstoffentwicklung von Interesse, da sie den Vorteil bieten die Struktur von Viruspartikeln zu imitieren, ohne dabei infektiöses, genetisches Material zu beinhalten (Roy und Noad 2008). Sie präsentieren so virale Antigene in nahezu authentischer Konformation (Grgacic und Anderson 2006, Noad und Roy 2003), werden binnen kurzer Zeit vom Immunsystem erkannt und sind in der Lage zelluläre und humorale Immunantworten effektiv zu induzieren. MVA-WNVprME₁ und MVA-WNVprME₂ unterschieden sich in ihrer Codon-Usage bezüglich der Originalsequenz von WNV-NY99, die bei MVA-WNVprME₁ entsprechend zu Vacciniavirus optimiert wurde (siehe Sequenzen Anhang 2.1 und 2.2). Ziel hiervon war die Untersuchung eines eventuellen Einflusses der Codon-Usage auf die Proteinexpression, was jedoch nicht bestätigt werden konnte.

MVA-WNVprME_{1 und 2} zeigten eine deutliche Proteinexpression in den Westernblot-Analysen. Die Proteinmenge nahm vor allem in den Überstandproben im Zeitverlauf zu (siehe Abbildungen 24 bis 28). Dadurch ließ sich die Funktionalität der Viren in permissiven, als auch humanen und equinen Zellen belegen. Die beiden MVA-WNVprME-Viren wiesen zudem eine meist kontinuierliche Zunahme der Proteinmenge auch in den Zelllysaten auf. Diese Anhäufung im Zellinneren ließe sich dadurch erklären, dass VLPs über den natürlichen Transportweg von WNV-Virionen aus der Zelle geschleust werden (Wang et al. 2009). Dies beinhaltet das Assembly am Endoplasmatischen Retikulum, die Akkumulation in

Vesikeln sowie die nachfolgende Glykosylierung während des Transports im Trans-Golgi-Netzwerk (Lindenbach et al. 2007, Wang et al. 2009). Dieser Vorgang nimmt längere Zeit in Anspruch und es wäre möglich, dass sich, vor allem durch die Konzentration in Vesikeln, mehr rekombinantes Protein in den Zellen akkumuliert, als fertige VLPs innerhalb eines bestimmten Zeitraumes sezerniert werden können.

Die Abbildung 30 zeigt eine mit MVA-WNVprME₁ infizierte HeLa-Zelle, die sich von den anderen Zellen durch eine stark grün-fluoreszierende Zellmembran und deren Randbereiche unterschied. Die Fluoreszenz schien vor allem kleinere Partikel zu betreffen, welche um die Zelle herum verstreut lagen. Durch weiteres Screening mit dem Mikroskop konnten noch mehr dieser grün leuchtenden Partikel um die Zelle herum gefunden und in vielen anderen detektierten Zellen beobachtet werden. Es wäre denkbar, dass diese Partikel VLPs darstellen. Dass die Produktion von VLPs durch virale Expressionsvektoren realisierbar ist, konnte bereits mehrfach bestätigt werden. Mittels rekombinanter Baculo-, aber auch rekombinanter Vacciniaviren wurden erfolgreich Vogelgrippe- (H9N2), Influenza- (H5N1), Hantaan- und auch West-Nil-VLPs hergestellt (Betenbaugh et al. 1995, Pushko et al. 2005, Qiao et al. 2004, Schmeisser et al. 2012).

MVA-WNVE_{SOL}

Dieses Virus wurde zur Produktion eines löslichen (soluble) E-Proteins, das von infizierten Zellen sezerniert werden sollte, generiert. Hierfür wurde die Transmembrandomäne von E, die für die Verankerung des Proteins in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (Lindenbach et al. 2007, Zhang W et al. 2003) und somit für die Präsentation des Proteins an der Virusoberfläche verantwortlich ist, entfernt. Dass dies ein möglicher Weg zur Herstellung von löslichem WNV E-Protein ist, wurde durch die Entfernung des carboxy-terminalen Endes von E nachgewiesen (Allison et al. 1995b, Men et al. 1991).

In der Zeitkinetik der Westernblot-Analyse war bei MVA-WNVE_{SOL} im Gegensatz zu den anderen Konstrukten in den Zelllysat-Proben eine Abnahme der Proteinmenge 48 Stunden nach Infektion messbar (siehe Abbildungen 24, 25 und 26). Dies ließe sich dadurch erklären, dass sich durch den schnellen Transport in das Zellkulturmedium, keine großen Mengen des Proteins in den Zellen akkumulieren können. Dass lösliches E-Protein schneller als membranständiges E durch Zellen transportiert wird, wurde bei der Untersuchung des Masernvirus als WNV-Vakzine gezeigt (Deprès et al. 2005). Somit wäre es möglich, dass die Konzentration an E-Protein in den Zellen im Zeitverlauf ab- und im Überstand zunimmt.

MVA-WNVE_{TMC} und MVA-WNVE_{TMV}

Mit MVA-WNVE_{TMC} und MVA-WNVE_{TMV} wurde eine Verankerung des E-Proteins auf den Plasmamembranen infizierter Zellen beabsichtigt. Hierfür wurde die ursprüngliche Transmembrandomäne von E entfernt und durch die Transmembrandomäne des E2-Proteins aus Chikungunyavirus oder des A56-Proteins aus Vacciniavirus ersetzt (siehe Abbildung 15A). Diese beiden Proteine sind an der Oberfläche infizierter Zellen verankert (DeHaven et al. 2011, Ichihashi und Dales 1971, Kuhn 2007, Mukhopadhyay et al. 2006, Shida 1986).

Die Immunoblot-Daten von MVA-WNVE_{TMC} und MVA-WNVE_{TMV} zeigten in allen Zelllinien eine Zunahme der Proteinmenge in den Zelllysaten während des Experiments von 8 bis 48 Stunden. In den Überständen hingegen waren keine oder äußerst geringe detektierbare Mengen an E-Protein vorhanden. Dies lieferte den Nachweis, dass die rekombinanten E-Proteine nicht von den Zellen sezerniert wurden. Die dennoch detektierten hellen Banden im Überstand in den Abbildungen 24, 25, 26 und 28 lassen sich durch die experimentellen Bedingungen erklären. Beim Abnehmen des Überstandes infizierter Monolayer kann es häufiger vorkommen, dass vor allem nach 48 Stunden bereits einige Zellen abgestorben sind, im Überstand schwimmen und ihre Zellmembran sich bereits in der Auflösung befindet. Zwar erfolgte ein Zentrifugationsschritt des Überstandes, um möglichst viel Verunreinigung durch totes Zellmaterial und Detritus zu entfernen, jedoch bleiben immer vereinzelte Reste übrig. Die mittels Konfokalmikroskopie detektierte grüne Fluoreszenz an den Plasmamembranen infizierter Zellen, belegte die Verankerung der rekombinanten E-Proteine an den Zellmembranen. Dies geht aus den Abbildungen 32 und 33 deutlich hervor.

In natürlichen Viruspartikeln des in dieser Arbeit verwendeten Stammes WNV-NY99 befindet sich im E-Protein eine N-glykosidische Bindungsstelle. Diese beeinflusst unter anderem die Infektiosität und das Assembly (Hanna et al. 2005, Whiteman et al. 2010), was vor allem in dieser Arbeit für den Zusammenbau der VLPs von Bedeutung sein könnte. Für das durchgeführte Experiment zur Deglykosylierung wurden die Zellkulturüberstände von, mit MVA-WNVprME_{1/2} und MVA-WNVE_{SOL} infizierten, Monolayern verwendet. Da bei MVA-WNVE_{TMC/V} keine Sekretion der synthetisierten Proteine stattfand, wurden die Zelllysate für die Untersuchung herangezogen. Abbildung 29 lässt eine potentielle Deglykosylierung aller Konstrukte durch die Behandlung mit PNGase F erkennen. Dies bedeutet, dass eine Glykosylierung bei allen rekombinanten E-Proteinen wahrscheinlich war. Für MVA-WNVprME₁ und ₂ stimmt dieses Ergebnis auch mit den von Othaki et al. gefundenen Erkenntnissen überein, dass WNV E-Proteine auf VLPs einen positiven Glykolysierungsstatus aufweisen (Othaki et al. 2010). Da in dieser Arbeit jedoch gezeigt

werden konnte, dass nicht nur sezernierte, sondern auch auf der Zelloberfläche verankerte E-Proteine glykosyliert waren, ist anzunehmen, dass auch jene während des Transports an die Plasmamembran einem Glykosylierungsschritt unterzogen werden.

3. Immunogenität

Die Maus ist für Untersuchungen der Pathogenese von WNV-Infektionen, sowie der Immunogenität von potentiellen Vakzinkandidaten im Moment der beste Modellorganismus. Sie hat sich deshalb als nützliches Modell erwiesen, da das klinische Erscheinungsbild neurologischer, WNV-induzierter Erkrankung in vielen Punkten dem von schweren Fällen beim Menschen ähnelt. Außerdem ist das Mausmodell bisher extensiv für die Erforschung von WNV-Tropismus (Kramer und Bernard 2001), Neuroinvasivität (Chambers et al. 2008, Hunsperger und Roehrig 2006), der Immunantwort auf WNV-Infektionen, sowie zur Untersuchung potentieller antiviraler Therapien und Vakzinkandidaten herangezogen worden (Diamond et al. 2003b, Shrestha und Diamond 2004, Wang et al. 2003). Es ist allgemein akzeptiert, dass spezielle neutralisierende Antikörper für die Beendigung der Virämie in der Maus verantwortlich sind und CD8⁺ T-Zellen eine wichtige Funktion bei der Beseitigung von WNV besitzen (Engle und Diamond 2003, Shrestha und Diamond 2006, Shrestha et al. 2006). Im fortschreitenden Verlauf einer Impfstoffentwicklung sind klinische Studien am Mensch und Pferd jedoch unumgänglich.

Zur Einschätzung der humoralen Immunantwort auf eine Impfung mit den potentiellen Vakzinkandidaten wurden Balb/c-Mäuse immunisiert. Mittels Antigen-ELISA konnte gezeigt werden, dass alle rekombinanten Viren WNV-spezifische Antikörper induzieren. Es waren jedoch Unterschiede, vor allem zwischen erster und zweiter Immunisierung, zu erkennen (siehe Abbildungen 34A und 34B). Nach der Erstimpfung zeigte MVA-WNVE_{SOL} die stärkste Antikörperantwort. Dies lässt darauf schließen, dass gerade in der ersten Phase der Immunisierung das Immunsystem auf das lösliche E-Protein besonders stark reagiert. Nach der zweiten Impfung näherten sich die Antikörpertiter der Konstrukte einander an, MVA-WNVE_{SOL} erwies sich jedoch weiterhin als effizient. Dies bestätigt die Ergebnisse anderer Untersuchungen, in denen hohe Antikörperlevel nach Immunisierung mit einem rekombinanten Masernvirus, welches lösliches E-Protein exprimiert, nachgewiesen werden konnten (Desprès et al. 2005). Auch andere Vakzine, welche E oder die Domäne III des WNV E-Proteins als lösliches Peptid verwenden, induzieren hohe Antikörpertiter (Chu et al. 2007, Martina et al. 2008b, Wang et al. 2001). Ein Grund dafür könnte sein, dass das E-Antigen durch die Sekretion aus den Zellen zusätzlich von weiteren APCs aufgenommen und über MHC Klasse II-Moleküle dem Immunsystem präsentiert wird, was wiederum die Produktion WNV E-spezifischer Antikörper induziert.

Bei der Untersuchung der Ko-Expression von prM und E in verschiedenen Systemen, wie dem Canarypox-Vektor, Vaccinia-Vektoren oder Eukaryonten-Zelllinien, wurden ebenso hohe Antikörpermengen nachgewiesen (El Garch 2008, Fonseca et al. 1994, Konishi et al. 1992, Othaki et al. 2010). Das MVA-WNVprME₁-Virus hingegen konnte nach der Erstimmunisierung keine so starke Antikörperantwort auslösen. Dies widerspricht der Annahme, dass auch dieses Virus durch seine Ko-Expression von prM und E in der Lage sein würde von Beginn an hohe Antikörpertiter zu induzieren. Nach der Zweitimmunisierung zeigten fast alle rekombinanten Viren vergleichbar hohe Titer. Die von MVA-WNVE_{TMC} induzierte Antikörperantwort erwies sich jedoch als deutlich schwächer im Vergleich zu jener von MVA-WNVE_{TMV}. Dies ist in der Hinsicht erstaunlich, als dass MVA-WNVE_{TMV} eine starke Antikörperreaktion induziert und diese beiden Konstrukte sehr ähnlich sind. Bei beiden wird das rekombinante E-Antigen an der Plasmamembran infizierter Zellen verankert. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied ist, dass bei MVA-WNVE_{TMV} die E-Proteine, wie Hämagglutinin bei Vacciniavirus, auf der gesamten Zelloberfläche präsentiert werden (Blackman und Bubel 1972, DeHaven et al. 2011, Payne und Norrby 1976). Alphaviren hingegen exprimieren ihre E2-Proteine nur an bestimmten Arealen der Zelloberfläche, dort wo später das Budding der fertigen Viruspartikel stattfindet (Birdwell et al. 1973, Garoff et al. 2004, Pavan et al. 1992). Somit wäre es plausibel, dass mit MVA-WNVE_{TMV} infizierte Zellen mehr E-Protein und damit mehr Antigen auf ihrer Zellmembran präsentieren und es so zu einer stärkeren Induzierung der Immunantwort kommt. Inwieweit diese Antikörperantwort neutralisierende Wirkung zeigt, wird in weiterführenden Arbeiten ermittelt werden müssen.

Die zelluläre Immunreaktion wurde durch Analyse der Ausbildung WNV-Antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellantworten untersucht. Die Ermittlung der T-Zellreaktion ist ein wesentlicher Bestandteil der Vakzinentwicklung, da bekannt ist, dass nicht nur die humorale sondern auch die zelluläre Immunantwort einen wichtigen Teil der Immunreaktion nach einer WNV-Infektion darstellt (Shresta und Diamond 2004, 2006). Die Analyse der CD8⁺ T-Zellantwort wurde mittels Messung der Interferon- γ -Produktion von, mit dem Antigen SVG9 stimulierten, Splenozyten erreicht. Studien zur Untersuchung der T-Zellantworten bei Patienten war es gelungen einige HLA-A2.1-restringierte WNV-Epitope zu identifizieren, die sich als effizient in der Interaktion mit WNV herausstellten. Das WNV E-Epitop SVG9 (SVGGVFTSV) ist hiervon das einzige auf dem E-Protein und zugleich eines der effektivsten Epitope (McMurtrey et al. 2008, Kaabinejadian et al. 2013). In der ELISpot-Analyse ist erkennbar, dass alle rekombinanten MVA eine WNV-spezifische zelluläre Immunantwort induzieren, da IFN- γ -Spots nachgewiesen werden konnten (siehe Abbildung 35B). Dies steht im Einklang mit anderen Studien, die mit ihren Vakzinkandidaten WNV-spezifische INF- γ -Antworten induzieren konnten (Chu et al. 2007, El Garch 2008, Monath et al. 2006, Nelson et al. 2011).

Auffällig war jedoch, dass MVA-WNVE_{SOL} eine wesentlich geringere Spot-Zahl und somit Aktivierung von T-Zellen im Vergleich zu den anderen rekombinanten Viren aufwies. Die Ursache hierfür ist nicht bekannt und es wird in zukünftigen Arbeiten zu klären sein, inwieweit dieses Ergebnis reproduzierbar ist.

4. Bewertung der Eignung als mögliche Vektorvakzine

Die Ergebnisse bestätigen, dass alle rekombinanten MVA WNV-Antigene sowohl *in vitro* als auch im Mausmodell effizient exprimieren können und liefern erste positive Daten zur Immunogenität.

Zwar sind in der Veterinärmedizin bereits zugelassene WNV-Vakzine auf dem Markt, diese wie etwa Equip WNV® (Fort Dodge Animal Health) weisen aber meist erhebliche Nachteile auf. So sind bei Verwendung dieses Impfstoffes mindestens zwei initiale Immunisierungen notwendig und es müssen zusätzlich häufige Auffrischungsimpfungen für einen optimalen Schutz durchgeführt werden. Hierbei wäre eine MVA-Vakzine klar im Vorteil, da bereits mehrfach gezeigt werden konnte, dass weniger Impfereignisse (meistens nur eines oder zwei) für eine gute Immunantwort benötigt werden (Earl et al. 2004, Frey et al. 2007, Kreijtz et al. 2009). Ein anderer auf dem Markt befindlicher Impfstoff (West Nile Innovator®) benutzt ein spezielles Adjuvantsystem (MetaStim®), welches eine zusätzliche Stimulation des Immunsystems bewirken soll. Auf rekombinanten MVA-basierende Vakzine benötigen keine zusätzlichen Adjuvantien, da das Virus starke immunstimulatorische Fähigkeiten besitzt und somit selbst als Adjuvant dient (Kreijtz et al. 2013). Allgemein bietet MVA als Vektorvakzin eine vielversprechende Alternative zu herkömmlichen Methoden in der Impfstoffherstellung, nicht nur gegen Infektionskrankheiten, wie HIV, Tuberkulose, RSV und Malaria. Auch gegen die neu in Europa auftretenden „emerging viruses“ wie WNV und zur prophylaktischen und therapeutischen Behandlung von Krebs (Kaufman et al. 2009, Ramlau et al. 2008) kann es eingesetzt werden. Vor allem durch sein stark eingeschränktes Wirtsspektrum und somit seine Replikationsdefizienz bei gleichzeitiger effektiver Genexpression in den meisten Säugerzellen ist MVA einer der vielversprechendsten Impfvektoren geworden. So befinden sich derzeit diverse MVA-basierte Impfstoffe in klinischen Studien der Phasen II und III (Amato et al. 2010, Bejon et al. 2007, Tameris et al. 2013).

Die in dieser Arbeit hergestellten Vektorviren und ermittelten Daten leisten einen wichtigen Erkenntnisbeitrag zur weiteren WNV-Impfstoffforschung. Sie sollen als Grundlage für weiterführende Untersuchungen, wie Neutralisationstests, Challenge-Experimente und klinische Versuche dienen, wobei als übergeordnetes Ziel die Entwicklung und nachfolgende Zulassung eines potenten WNV-Impfstoffes für Mensch und Pferd steht.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Das West-Nil-Virus (WNV) ist ein zur Familie der Flaviviren gehörendes Arbovirus, das weltweit zunehmende Verbreitung findet. Das natürliche Reservoir des Virus sind Vögel. Nach Übertragung durch Stechmücken kann es zu Infektionen von „Fehlwirten“, insbesondere Pferden und Menschen, kommen. Die meisten Infektionen verlaufen asymptomatisch oder mit der Entwicklung des West-Nil-Fiebers, einer relativ milden, Grippe-ähnlichen Erkrankung. In einigen Fällen, vor allem bei immungeschwächten und älteren Individuen, können aber auch lebensbedrohliche Infektionen mit schwerer neurologischer Symptomatik (z.B. Enzephalitiden) die Folge sein. WNV-Impfstoffe sind bisher nur für die Veterinärmedizin zugelassen und diese benötigen für einen effektiven Schutz häufige Auffrischungen. Außerdem gibt es keine effizienten Therapiemöglichkeiten. Aus diesem Grund ist die Entwicklung weiterer wirksamer WNV-Impfstoffe wünschenswert. Ziel dieser Arbeit war es, verschiedene rekombinante Vakzinkandidaten auf Basis des Modifizierten Vacciniavirus Ankara (MVA) zu entwickeln, zu analysieren und bezüglich ihrer Eignung als Vektorvakzin zu bewerten. Das in seiner Replikationsfähigkeit extrem limitierte und hoch attenuierte MVA gehört bei der Entwicklung neuartiger rekombinanter Virusvakzine zu den viel versprechendsten Kandidaten. Potentielle WNV-Vektorvakzine beruhen überwiegend auf der Expression der beiden viralen Hüllproteine prM/M und E oder Teilen davon. Gerade das E-Protein stellt nach einer Infektion das Hauptzielantigen der adaptiven Immunantwort dar, indem es eine Vielzahl an immunogenen und protektiven Epitopen aufweist. Die fünf in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Viren exprimierten zum Teil das E-Protein in unterschiedlicher Ausführung oder prM/M und E simultan. Damit wurden verschiedene Ansätze zur Induktion einer Immunantwort generiert und untersucht:

- **MVA-WNVprME₁** und **MVA-WNVprME₂** wurden entwickelt, um durch eine Ko-Expression der beiden Oberflächenproteine VLPs (virus-like particles) zu erzeugen.
- Mit **MVA-WNVE_{SOL}** wurde, durch Entfernung der Transmembrandomäne des E-Proteins, die Produktion eines löslichen Proteins beabsichtigt.
- **MVA-WNVE_{TMC}** und **MVA-WNVE_{TMV}** waren zur Verankerung der E-Proteine auf den Zellmembranen infizierter Zellen hergestellt worden.

Alle rekombinanten MVA-Vektorviren waren bis auf die inserierten Zielsequenzen identisch und erwiesen sich als genetisch stabil. Die Replikationsdefizienz der Viren in den humanen und equinen Zielzellen konnte eindeutig nachgewiesen und somit ihre biologische Sicherheit

belegt werden. Für die Erzeugung hochtitriger Virusstocks und zur Impfstoffproduktion in größerem Umfang war es notwendig zu zeigen, dass sich die ins MVA-Genom inserierten Sequenzen nicht negativ auf das Vermehrungspotential der Viren in permissiven Zellen auswirkten. Es konnte belegt werden, dass alle Konstrukte dem Wildtypvirus ähnliche, und somit zur Produktion ausreichende, Wachstumsfähigkeiten besaßen. Als weitere wichtige Voraussetzung für die potentielle Verwendung der rekombinanten Viren als Kandidaten-Vakzine galt eine effiziente rekombinante Proteinexpression. Durch die Analyse der Proteinsynthese mittels Westernblot konnte nachgewiesen werden, dass diese bei allen Konstrukten stabil und produktiv verlief. Auch die Lokalisierung der rekombinanten E-Proteine durch Immunfluoreszenzfärbung und nachfolgender Konfokalmikroskopie infizierter Zellen brachte das erwartete Ergebnis. Besonders bei MVA-WNVE_{TMC} und MVA-WNVE_{TMV} zeigte sich deutlich, dass die E-Proteine, wie beabsichtigt, auf den Plasmamembranen der infizierten Zellen zu finden waren.

Abschließend wurden zur ersten Einschätzung der Immunogenität der rekombinanten Viren WNV-spezifische Antikörper- und T-Zellantworten im Mausmodell untersucht. Alle Vektorviren waren in der Lage humorale und zelluläre Immunantworten zu induzieren. Hierbei erwies sich MVA-WNVE_{SOL}, was die, mittels Antigen-ELISA ermittelte, Antikörperantwort anbelangt als viel versprechendster Kandidat. Bezüglich der CD8⁺-T-Zellantwort konnte sich dies jedoch nicht bestätigen. Es ist anzumerken, dass weiterführende Untersuchungen der Testimpfstoffe in anderen präklinischen Modellen in Zukunft noch durchzuführen sein werden.

Die in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Viren und gewonnenen Erkenntnisse belegen die Fähigkeit von MVA als viel versprechenden Vektorvakzin-Kandidaten gegen WNV. Die nachgewiesene Sicherheit und zugleich gute Vermehrungsfähigkeit in permissiven Zellen, die effiziente WNV-Antigen-Expression und die ersten positiven Daten zur Immunogenität aller Konstrukte sprechen für eine zukünftige, weitere Nutzung und Untersuchung dieser Vektorviren, um als langfristiges Ziel einen potenten WNV-Impfstoff zu erhalten.

VII. SUMMARY

West-Nile-Virus (WNV) is a mosquito-borne flavivirus which has disseminated broadly and now is endemic in many parts of the world. It is transmitted primarily between avian hosts and mosquito vectors in an enzootic cycle, but can also infect and cause disease in “incidental-hosts” like humans and horses. Most of the infections with WNV are subclinical, but especially for the elder or immunocompromised individuals there is a risk of establishing disease. Symptomatic infections can range from a mild flu-like illness called West-Nile-Fever to severe neurological manifestations. Currently no efficient treatment is available and no WNV vaccine for human use is approved. There are first vaccines for veterinary use, which still have disadvantages including the requirement of numerous immunisations for effective protection. On this account the development of a potent WNV vaccine is eligible. Objective of this work was to generate, characterise and evaluate different recombinant vector vaccines based on the Modified Vacciniavirus Ankara (MVA). MVA is a highly attenuated and replication deficient Vacciniavirus-strain and is deemed to be one of the most promising candidates for the development of new recombinant vector vaccines. Prospective WNV vaccines are predominantly based on the expression of the viral envelope proteins prM/M and E. Especially the E-protein represents the major target antigen after infection with its high number of immunogenic and protective epitopes. In this work the generated recombinant MVA encoded for the prM/M and E proteins in five different constitutions:

- **MVA-WNVprME₁** und **MVA-WNVprME₂** led to a co-expression of the prM/M and E genes in order to produce VLPs (virus-like particles).
- The infection of cells with **MVA-WNVE_{sol}** resulted in the release of soluble E.
- **MVA-WNVE_{TMC}** und **MVA-WNVE_{TMV}** were designed to present the E-proteins on the plasma membrane of infected cells.

Genetic identity, homogeneity and stability of all five recombinant viruses could be confirmed. Analysing virus growth in primary and established cell culture could demonstrate their replication deficiency in human and equine target cells, which proved their biological safety. In permissive cell lines the recombinant viruses replicated to levels equivalent to those for wildtype MVA. Immunoblot-analyses confirmed that all vector viruses permitted efficient production of recombinant WNV antigens in infected target cells and therefore were qualified for *in vivo* testing in mouse models.

Tested in first vaccination experiments all five recombinant MVA were able to induce humoral and cellular immune responses and thus seem to be suitable for further investigations in other preclinical models. This work shows that the five recombinant MVA delivering WNV antigens are promising candidate vector viruses and can be used as basis for future work in developing a potent WNV vector vaccine.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA** (2001). Recognition of doublestranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413 (6857): 732-738.
- Allison SL, Schlich J, Stiasny K, Mandl CW, Kunz C, Heinz FX** (1995a). Oligomeric Rearrangement of Tick-Borne Encephalitis Virus Envelope Proteins Induced by an Acidic pH. *J Virol* 69 (2): 695-700.
- Allison SL, Stadler K, Mandl CW, Kunz C, Heinz FX** (1995b). Synthesis and Secretion of Recombinant Tick-Borne Encephalitis Virus Protein E in Soluble and Particulate Form. *J Virol* 69 (9): 5816-5820.
- Amara RR, Villinger F, Altman JD, Lydy SL, O'Neil SP, Staprans SI, Montefiori DC, Xu Y, Herndon JG, Wyatt LS, Candido MA, Kozyr NL, Earl PL, Smith JM, Ma H-L, Grimm BD, Hulsey ML, Miller J, McClure HM, McNicholl JM, Moss B, Robinson HL** (2001). Control of a Mucosal Challenge and Prevention of AIDS by a Multiprotein DNA/MVA Vaccine. *Science* 292 (5514): 69-74.
- Amato RJ, Hawkins RE, Kaufman HL, Thompson JA, Tomczak P, Szczyliak C, McDonald M, Eastty S, Shingler WH, de Belin J, Goonewardena M, Naylor S, Harrop R** (2010). Vaccination of metastatic renal cancer patients with MVA-5T4: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study. *Clin Cancer Res* 16 (22): 5539-5547.
- Assenberg R, Mastrangelo E, Walter TS, Verma A, Milani M, Owens RJ, Stuart DI, Grimes JM, Mancini EJ** (2009). Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein: implications for polyprotein processing and viral replication. *J Virol* 83 (24): 12895-12906.
- Backes S, Sperling KM, Zwilling J, Gasteiger G, Ludwig H, Kremmer E, Schwantes A, Staib C, Sutter G** (2010). Viral host-range factor C7 or K1 is essential for modified vaccinia virus Ankara late gene expression in human and murine cells, irrespective of their capacity to inhibit protein kinase R-mediated phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 α . *J Gen Virol* 91 (Pt2): 470-482.
- Bai F, Kong K-F, Dai J, Quian F, Zhang L, Brown CR, Fikrig E, Montgomery R** (2010). A Paradoxical Role for Neutrophils in the Pathogenesis of West Nile Virus. *J Infect Dis* 202 (12): 1804-1812.
- Bai F, Wang T, Pal U, Bao F, Gould LH, Fikrig E** (2005). Use of RNA interference to prevent lethal murine West Nile virus infection. *J Infect Dis* 19 (7): 1148-1154.
- Bakonyi T, Ivanics E, Erdélyi K, Ursu K, Ferenczi E, Weissenböck H, Nowotny N** (2006). Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerg Infect Dis* 12 (4): 618-623.

- Bakonyi T, Hubálek Z, Rudolf I, Nowotny N** (2005). Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe. *Emerg Infect Dis* 11 (2): 225-231.
- Beasley DWC, Li L, Suderman MT, Barrett ADT** (2002). Mouse Neuroinvasive Phenotype of West Nile Virus Strains Varies Depending upon Virus Genotype. *Virology* 296 (1): 17-23.
- Beasley DWC und Barrett ADT** (2002). Identification of Neutralizing Epitopes within Structural Domain III of the West Nile Virus Envelope Protein. *J Virol* 76 (24): 13097-13100.
- Beasley DWC, Whiteman MC, Zhang S, Huang CY-H, Schneider BS, Smith DR, Gromowski GD, Higgs S, Kinney RM, Barrett ADT** (2005). Envelope Protein Glycosylation Status Influences Mouse Neuroinvasion Phenotype of Genetic Lineage 1 West Nile Virus Strains. *J Virol* 79 (13): 8339-8347.
- Bejon P, Ogada E, Mwangi T, Milligan P, Lang T, Fegan G, Gilbert SC, Peshu N, Marsh K, Hill AVS** (2007). Extended Follow-Up Following a Phase 2b Randomized Trial of the Candidate Malaria Vaccines FP9 ME-TRAP and MVA ME-TRAP among Children in Kenya. *PLOS ONE* 2 (8): e707.
- Bender BS, Rowe CA, Taylor SF, Wyatt LS, Moss B, Small Pa Jr** (1996). Oral immunization with a replication-deficient recombinant vaccinia virus protects mice against influenza. *J Virol* 70 (9): 6418-6424.
- Ben-Nathan D, Gershoni-Yahalom O, Samina I, Khinich Y, Nur I, Laub O, Gottreich A, Simanov M, Porgador A, Rager-Zisman B, Orr N** (2009). Using high titer West Nile intravenous immunoglobulin from selected Israeli donors for treatment of West Nile virus infection. *BMC Infect Dis* 9:18 doi: 10.1186/1471-2334-9-18.
- Ben-Nathan D, Lustig S, Tam G, Robinson S, Segal S, Rager-Zisman B** (2003). Prophylactic and therapeutic efficacy of human intravenous immunoglobulin in treating West Nile virus infection in mice. *J Infect Dis* 188 (1): 5-12.
- Berner YN, Lang R, Chowder MY** (2002). Outcome of West Nile fever in older Adults. *J Am Geriatr Soc* 50 (11): 1844-1846.
- Bernkopf H, Levine S, Nerson R** (1953). Isolation of West Nile Virus in Israel. *J Infect Dis* 93 (3): 207-218.
- Berthet FX, Zeller HG, Drouet MT, Rauzier J, Digoutte JP, Deubel V** (1997). Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein Gene of Euro-African West Nile viruses. *J Gen Virol* 78 (9): 2293-2297.
- Betenbaugh M, Yu M, Kuehl K, White J, Pennock D, Spik K, Schmaljohn C** (1995). Nucleocapsid- and virus-like particles assemble in cells infected with recombinant baculoviruses or vaccinia viruses expressing the M and the S segments of Hantaan virus. *Virus Res* 38 (2-3): 111-124.

- Biedenbender R, Bevilacqua J, Gregg AM, Watson M, Dayan G** (2011). Phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter study to investigate the immunogenicity and safety of a West Nile Virus vaccine in healthy adults. *J Infect Dis* 203 (1): 75-84.
- Birdwell CR, Strauss EG, Strauss JH** (1973). Replication of Sindbis virus. III. An electron microscopic study of virus maturation using the surface replica technique. *Virology* 56 (2): 429-438.
- Bishop GA und Hostager BS** (2001). B lymphocyte activation by contact-mediated interaction with T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 13 (3): 278-285.
- Blackman KE und Bubel HC** (1972). Origin of the Vaccinia Virus Hemagglutinin. *J Virol* 9 (2): 290-296.
- Bode AV, Sejvar JJ, Pape WJ, Campbell GL, Marfin AA** (2006). West Nile virus disease a descriptive study of 228 patients hospitalized in a 4-county region of Colorado in 2003. *Clin Infect Dis* 42 (9): 1234-1240.
- Boehme KW, Singh J, Perry ST, Compton T** (2004). Human cytomegalovirus elicits a coordinated antiviral response via envelope glycoprotein B. *J Virol* 78 (3): 1202-1211.
- Bondre VP, Jadi RS, Mishra AC, Yergolkar PN, Arankalle VA** (2007). West Nile virus isolates from India: evidence for a distinct genetic lineage. *J Gen Virol* 88 (3): 875-884.
- Borowski P, Niebuhr A, Mueller O, Bretner M, Felczak K, Kulikowski T, Schmitz H** (2001). Purification and characterization of West Nile virus nucleoside triphosphatase (NTPase)/helicase: evidence for dissociation of the NTPase and helicase activities of the enzyme. *J Virol* 75 (7): 3220-3229.
- Bowen RA und Nemeth NM** (2007). Experimental infections with West Nile virus. *Curr Opin Infect Dis* 20 (3): 293-297.
- Brien JD, Uhrlaub JL, Nikolich-Zugich J** (2007). Protective capacity and epitope specificity of CD8(+) T cells responding to lethal West Nile virus infection. *Eur J Immunol* 37 (7): 1855-1863.
- Bunning ML, Bowen RA, Cropp CB, Sullivan KG, Davis BS, Komar N, Godsey MS, Baker D, Hettler DL, Holmes DA, Biggerstaff BJ, Mitchell CJ** (2002). Experimental infection of horses with West Nile virus. *Emerg Infect Dis* 8 (4): 380-386.
- Burton JM, Kern RZ, Halliday W, Mikulis D, Brunton J, Fearon M, Pepperell C, Jaigobin C** (2004). Neurological manifestations of West Nile virus infection. *Can J Neurol Sci* 31: 185-193.
- Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, Brandt WE** (1989). Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol* 70 (Pt 1): 37-43.

- Cantile C, Del Piero F, Di Guardo G, Arispici M** (2001). Pathologic and immunohistological findings in naturally occurring West Nile virus infection in horses. *Vet Pathol* 38 (4): 414-421.
- Carroll MW 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 (2): 198-211.
- Castle E, Leidner U, Nowak T, Wengler G, Wengler G** (1986). Primary structure of the West Nile flavivirus genome region coding for all nonstructural proteins. *Virology* 149 (1): 10-26.
- Castle E und Wengler G** (1987). Nucleotide sequence of the 5'-terminal untranslated part of the genome of the flavivirus West Nile virus. *Arch Virol* 92 (3-4): 309-313.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC)** (2002a). Intrauterine West Nile virus infection – New York, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 51 (50): 1135-1136.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC)** (2002b). Possible West Nile Virus Transmission to an Infant Through Breast-Feeding – Michigan, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 51 (39): 877-878.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC)** (2010). West Nile virus activity - United States, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 59 (25): 769-772.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC)** (2013a). West Nile Virus Statistics, Surveillance, and Control Archive. Stand Mai 2013
<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/surv&control.htm>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC)** (2013b). West Nile Virus Data and Maps 2012. Stand Mai 2013
<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/index.htm>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC)** (2013c). West Nile Virus Vertebrate Ecology. Stand Mai 2013
<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/birdspecies.htm>
- Chambers TJ, Droll DA, Walton AH, Schwartz J, Wold WSM, Nickells J** (2008). West Nile 25A virus infection of B-cell-deficient (μ MT) mice: characterization of neuroinvasiveness and pseudoreversion of the viral envelope protein. *J Gen Virol* 89 (3): 627-635.
- Charrel RN, Brault AC, Gallian P, Lemasson JJ, Murgue B, Murri S, Pastorino B, Zeller H, de Chesse R, de Micco P, de Lamballerie X** (2003). Evolutionary Relationship between Old World West Nile virus strains. Evidence for viral gene flow between Africa, the Middle East, and Europe. *Virology* 315 (2): 381-388.

- Chu JH, Chiang CC, Ng ML** (2007). Immunization of flavivirus West Nile recombinant envelope domain III protein induced specific immune response and protection against West Nile virus infection. *J Immunol* 178 (5): 2699-2705.
- Chu JJ, Leong PW, Ng ML** (2006). Analysis of the endocytotic pathway mediating the infectious entry of mosquito-borne flavivirus West Nile into *Aedes albopictus* mosquito (C6/36) cells. *Virology* 349 (2): 463-475.
- Chu JJ und Ng ML** (2004). Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *J Virol* 78 (19): 10543-110555.
- Chu PWG und Westaway EG** (1985). Replication strategy of Kunjin virus: evidence for recycling role of replicative form RNA as template in semiconservative and asymmetric replication. *Virology* 140 (1): 68-79.
- Chu PWG und Westaway EG** (1992). Molecular and ultrastructural analysis of heavy membrane fractions associated with the replication of Kunjin virus RNA. *Arch Virol* 125 (1-4): 177-191.
- Chung KM, Thompson BS, Fremont DH, Diamond MS** (2007). Antibody recognition of cell surface-associated NS1 triggers Fc-gamma receptor-mediated phagocytosis and clearance of West Nile Virus-infected cells. *J Virol* 81 (17): 9551-9555.
- Clark L, Hall J, McLean R, Dunbar M, Bowen R, Smeraski CA** (2006). Susceptibility of greater sage-grouse to experimental infection with West Nile virus. *J Wildl Dis* 42 (1): 14-22.
- Cleaves GR, Ryan TE, Schlesinger RW** (1981). Identification and characterization of type 2 dengue virus replicative intermediate and replicative form RNAs. *Virology* 111 (1): 73-83.
- Colombage G, Hall R, Pavy M, Lobigs M** (1998). DNA-based and alphavirus-vectored immunisation with prM and E proteins elicits long-lived and protective immunity against the flavivirus, Murray Valley encephalitis virus. *Virology* 250 (1): 151-163.
- Crichlow R, Bailey J, Gardner C** (2004). Cerebrospinal fluid neutrophilic pleocytosis in hospitalized West Nile virus patients. *J Am Board Fam Pract* 17 (6): 470-472.
- Crill WD und Roehrig JT** (2001). Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *J Virol* 75 (16): 7769-7773.
- Cyrklaff M, Risco C, Fernández JJ, Jiménez MV, Estéban M, Baumeister W, Carrascosa JL** (2005). Cryo-electron tomography of vaccinia virus. *PNAS USA* 102 (8): 2772-2777.
- Daffis S, Samuel MA, Suthar MS, Gale M Jr, Diamond MS** (2008a). Toll-like Receptor 3 has a protective role against West Nile Virus infection. *J Virol* 82 (21): 10349-10358.

- Daffis S, Samuel MA, Suthar MS, Keller BC, Gale M Jr, Diamond MS** (2008b). Interferon regulatory factor IRF-7 induces the antiviral alpha interferon response and protects against lethal West Nile virus infection. *J Virol* 82 (17): 8465-8475.
- Dauphin G, Zientara S, Zeller H, Murgue B** (2004). West Nile: worldwide current situation in animals and humans. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27 (5): 343-355.
- Davis BS, Chang GJ, Cropp B, Roehrig JT, Martin DA, Mitchell CJ, Bowen R, Bunning ML** (2001). West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. *J Virol* 75 (9): 4040-4047.
- Davis CW, Nguyen H-Y, Hanna SL, Sánchez MD, Doms RW, Pierson TC** (2006). West Nile Virus discriminates between DC-SIGN and DC-SIGNR for cellular attachment and infection. *J Virol* 80 (3): 1290-1301.
- De Filette M, Ulbert S, Diamond M, Sanders NN** (2012). Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination. *Vet Res* 43 (1): 16.
- Deas TS, Bennett CJ, Jones SA, Tilgner M, Ren P, Behr MJ, Stein DA, Iversen PL, Kramer LD, Bernard KA, Shi PY** (2007). In vitro resistance selection and in vivo efficacy of morpholino oligomers against West Nile virus. *Antimicrob Agents Chemother* 51 (7): 2470-2482.
- DeHaven BC, Gupta K, Isaacs SN** (2011). The vaccinia virus A56 protein: a multifunctional transmembrane glycoprotein that anchors two secreted viral proteins. *J Gen Virol* 92 (Pt 9): 1971-1980.
- Desprès P, Combredet C, Frenkiel MP, Lorin C, Brahic M, Tangy F** (2005). Live measles vaccine expressing the secreted form of the West Nile virus envelope glycoprotein protects against West Nile virus encephalitis. *J Infect Dis* 191 (2): 207-214.
- Deubel V, Fiette L, Gounon P, Drouet MT, Khun H, Huerre M, Banet C, Malkinson M, Desprès P** (2001). Variations in biological features of West Nile Viruses. *Ann N Y Acad Sci* 951: 195-206.
- Diamond MS, Shrestha B, Marri A, Mahan D, Engle M** (2003a). B cells and antibody play critical roles in the immediate defense of disseminated infection by West Nile encephalitis virus. *J Virol* 77 (4): 2578-2586.
- Diamond MS, Sitati EM, Friend LD, Higgs S, Shrestha B, Engle M** (2003b). A critical role for induced IgM in the protection against West Nile virus infection. *J Exp Med* 198 (12): 1853-1862.
- Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C** (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303 (5663): 1529-1531.

- Dokland T, Walsh M, Mackenzie JM, Khronykh AA, Ee KH, Wang S** (2004). West Nile virus core protein; tetramer structure and ribbon formation. *Structure* 12 (7): 1157-1163.
- Drebot MA, Lindsay R, Barker IK, Buck PA, Fearon M, Hunter F, Sockett P, Artsob H** (2003). West Nile virus surveillance and diagnostics: A Canadian perspective. *Can J Infect Dis* 14 (2): 105-114.
- Drexler I, Heller K, Wahren B, Erfle V, Sutter G** (1998). Highly modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells. *J Gen Virol* 79 (Pt 2): 347-352.
- Drexler I, Staib C, Sutter G** (2004). Modified vaccinia virus Ankara as antigen delivery system: how can we best use its potential? *Curr Opin Biotechnol* 15 (6): 506-512.
- Earl PL, Americo JL, Wyatt LS, Eller LA, Whitbeck JC, Cohen GH, Eisenberg RJ, Hartmann CJ, Jackson DL, Kulesh DA, Martinez MJ, Miller DM, Mucker EM, Shamblin JD, Zwiers SH, Huggins JW, Jahrling PB, Moss B** (2004). Immunogenicity of a highly attenuated MVA smallpox vaccine and protection against monkeypox. *Nature* 428 (6979): 182-185.
- Eidson M, Schmit K, Hagiwara Y, Anand M, Backenson PB, Gotham I, Kramer L** (2005). Dead Crow Density and West Nile Virus Monitoring, New York. *Emerg Infect Dis* 11 (9): 1370-1375.
- El Garch H, Minke JM, Rehder J, Richard S, Edlund Toulemonde C, Dinic S, Andreoni C, Audonnet JC, Nordgren R, Juillard V** (2008). A West Nile virus (WNV) recombinant canarypox virus vaccine elicits WNV-specific neutralizing antibodies and cell-mediated immune responses in the horse. *Vet Immunol Immunopathol* 123 (3-4): 230-239.
- Engle MJ und Diamond MS** (2003). Antibody prophylaxis and therapy against West Nile Virus infection in wild-type and immunodeficient mice. *J Virol* 77 (24): 12941-12949.
- Erbel P, Schiering N, D'Arcy A, Renatus M, Kroemer M, Lim SP, Yin Z, Keller TH, Vasudevan SG, Hommel U** (2006). Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. *Nat Struct Mol Biol* 13 (4): 372-373.
- Estrada-Franco JG, Navarro-Lopez R, Beasley DW, Coffey L, Carrara AS, Travassos da Rosa A, Clements T, Wang E, Ludwig GV, Cortes AC, Ramirez PP, Tesh RB, Barrett AD, Weaver SC** (2003). West Nile virus in Mexico: Evidence of widespread circulation since July 2002. *Emerg Infect Dis* 9 (12): 1604-1607.
- Fenner F** (1982). A successful eradication campaign. Global eradication of smallpox. *Rev Infect Dis* 4 (5): 916-930.

- Fonseca BAL, Pincus S, Shope RE, Paoletti E, Mason PW** (1994). Recombinant vaccinia viruses co-expressing dengue-1 glycoproteins prM and E induce neutralizing antibodies in mice. *Vaccine* 12 (3): 279-285.
- Fredericksen BL, Keller BC, Fornek J, Katze MG, Gale M Jr** (2008). Establishment and maintenance of the innate antiviral response to West Nile Virus involves both RIG-I and MDA-5 signaling through IPS-1. *J Virol* 82 (2): 609-616.
- Fredericksen BL, Smith M, Katze MG, Shi PY, Gale M Jr** (2004). The host response to West Nile Virus infection limits viral spread through the activation of the interferon regulatory factor 3 pathway. *J Virol* 78 (14): 7737-7747.
- Frey SE, Newman FK, Kennedy JS, Sobek V, Ennis FA, Hill H, Yan LK, Chaplin P, Vollmar J, Chaitman BR, Belshe RB** (2007). Clinical and immunologic responses to multiple doses of IMVAMUNE (Modified Vaccinia Ankara) followed by Dryvax challenge. *Vaccine* 25 (51): 8562-8573.
- Frost MJ, Zhang J, Edmonds JH, Prow NA, Gu X, Davis R, Hornitzky C, Arzey KE, Finlaison D, Hick P, Read A, Hobson-Peters J, May FJ, Doggett SL, Haniotis J, Russell RC, Hall RA, Khromykh AA, Kirkland PD** (2012). Characterization of virulent West Nile virus Kunjin strain, Australia, 2011. *Emerg Infect Dis* 18 (5):792-800.
- Garoff H, Sjöberg M, Cheng RH** (2004). Budding of alphaviruses. *Virus Res* 106 (2): 103-116.
- Gherardi MM, Pérez-Jiménez E, Nájera JL, Esteban M** (2004). Induction of HIV immunity in the genital tract after intranasal delivery of a MVA vector: enhanced immunogenicity after DNA prime-modified vaccinia virus Ankara boost immunization schedule. *J Immunol* 172 (10): 6209-6220.
- Grgacic EV und Anderson DA** (2006). Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods* 40 (1): 60-65.
- Grun JB und Brinton MA** (1987). Dissociation of NS5 from Cell Fractions containing West Nile Virus-Specific Polymerase Activity. *J Virol* 61 (11): 3641-3644.
- Guy B, Guirakhoo F, Barban V, Higgs S, Monath TP, Lang J** (2010). Preclinical and clinical development of YFV 17D-based chimeric vaccines against dengue, West Nile and Japanese encephalitis viruses. *Vaccine* 28 (3): 632-649.
- Hall RA, Broom AK, Smith DW, Mackenzie JS** (2002). The ecology and epidemiology of Kunjin virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 267: 253-269.
- Hall RA, Nisbeet DJ, Pham KB, Pyke AT, Smith GA, Khromykh AA** (2003). DNA vaccine coding for the full-length infectious Kunjin virus RNA protects mice against the New York strain of West Nile virus. *PNAS* 100 (18): 10460-10464.

- Hamer GL, Kitron UD, Brawn JD, Loss SR, Ruiz MO, Goldberg TL, Walker ED (2008).** *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): A bridge vector of West Nile virus to humans. *J Med Entomol* 45 (1): 125-128.
- Han LL, Popovici F, Alexander jr. JP, Laurentia V, Tengelsen LA, Cernescu C, Gary jr. HE, Ion-Nedelcu N, Campbell GL, Tsai TF (1999).** Risk Factors for West Nile Virus Infection and Meningoencephalitis, Romania, 1996. *J Infect Dis* 179 (1): 230-233.
- Hanke T, Samuel RV, Blanchard TJ, Neumann VC, Allen TM, Boyson JE, Sharpe SA, Cook N, Smith GL, Watkins DI, Cranage MP, McMichael AJ (1999).** Effective induction of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes in macaques by using a multiepitope gene and DNA prime-modified vaccinia virus Ankara boost vaccination regimen. *J Virol* 73 (9): 7524-7532.
- Hanna SL, Pierson TC, Sanchez MD, Ahmed AA, Murtadha MM, Doms RW (2005).** N-Linked Glycosylation of West Nile Virus Envelope Proteins Influences Particle Assembly and Infectivity. *J Virol* 79 (21): 13262-13274.
- Harrington T, Kuehnert MJ, Kamel H, Lanciotti RS, Hand S, Currier M, Chamberland ME, Petersen LR, Marfin AA (2003).** West Nile virus infection transmitted by blood transfusion. *Transfusion* 43 (8): 1018-1022.
- Hayes CG (2001).** West Nile virus: Uganda, 1937, to New York City, 1999. *Ann N Y Acad Sci* 951: 25-37.
- Hayes EB, Komar N, Nasci RS, Montgomery SP, O'Leary DR, Campbell GL (2005).** Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis* 11 (8): 1167-1173.
- Hayes EB und O'Leary DR (2004).** West Nile virus infection: a pediatric perspective. *Pediatrics* 113 (5): 1375-1381.
- Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschnig C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S (2004).** Species-specific recognition of single-stranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303 (5663): 1526-1529.
- Heinz FX, Collett MS, Purcell RH, Gould EA, Howard CR, Houghton M, Moormann RJM, Rice CM, Thiel HJ (2000).** Family Flaviviridae. In: *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Eds. van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB. San Diego: Academic Press: 860-878.
- Heinz FX, Stiasny K, Püschner-Auer G, Holzmann H, Allison SL, Mandl CW, Kunz C (1994).** Structural changes and functional control of the tick-borne encephalitis virus y glycoprotein E by the heterodimeric association with protein prM. *Virology* 198 (1): 109-117.
- Heinz FX und Stiasny K (2012).** Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine* 30 (29): 4301-4306.

Heller KN, Gurer C, Münz C (2006). Virus-specific CD4+ T cells: ready for direct attack. *J Exp Med* 203 (4): 805-808.

Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 3 (2): 196-200.

Hershkovitz O, Rosental B, Rosenberg LA, Navarro-Sanchez ME, Jivov S, Zilka A, Gershoni-Yahalom O, Briant-Litzler E, Bedouelle H, Ho JW, Campbell KS, Rager-Zisman B, Despres P, Porgador A (2009). NKp44 receptor mediates interaction of the envelope glycoproteins from the West Nile and dengue viruses with NK cells. *J Immunol* 183 (4): 2610-2621.

Hirota J, Nishi H, Matsuda H, Tsunemitsu H, Shimiz S (2010). Cross-reactivity of Japanese encephalitis virus-vaccinated horse sera in serodiagnosis of West Nile virus. *J Vet Med Sci* 72 (3): 369-372.

Hochstein-Mintzel V, Hanichen T, Huber HC, 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.

Hollidge BS, González-Scarano F, Soldan SS (2010). Arboviral encephalitides: mission, emergence, and pathogenesis. *J Neuroimmune Pharmacol* 5 (3): 428-448.

Huang CY, Silengo SJ, Whiteman MC, Kinney RM (2005). Chimeric dengue 2 PDK-53/West Nile NY99 viruses retain the phenotypic attenuation markers of the candidate PDK-53 vaccine virus and protect mice against lethal challenge with West Nile virus. *J Virol* 79 (12): 7300-7310.

Hubálek Z (2000). European experience with the West Nile virus ecology and epidemiology: Could it be Relevant for the New World? *Viral Immunol* 13 (4): 415-426.

Hubálek Z und Halouzka J (1999). West Nile Fever – a Reemerging Mosquito-Borne Viral Disease in Europe. *Emerg Infect Dis* 5 (5): 643-650.

Hunsperger EA und Roehrig JT (2006). Temporal analyses of the neuropathogenesis of a West Nile virus infection in mice. *J Neurovirol* 12 (2): 129-139.

Hurlbut HS, Rizk F, Taylor RM, Work TH (1956). A study of the ecology of West Nile virus in Egypt. *Am J Trop Med Hyg* 5 (4): 579-620.

Iglesias MC, Frenkiel MP, Mollier K, Sougue P, Desprès P, Charneau P (2006). A single immunization with a minute dose of a lentiviral vector-based vaccine is highly effective at eliciting protective humoral immunity against West Nile virus. *J Gene Med* 8 (3): 265-274.

Ichihashi Y und Dales S (1971). Biogenesis of poxviruses: interrelationship between hemagglutinin production and polykaryocytosis. *Virology* 46 (3): 533-543.

- Ivanyi-Nagy R, Lavergne J-P, Gabus C, Ficheux D, Darlix J-L** (2008). RNA chaperoning and intrinsic disorder in the core proteins of *Flaviviridae*. *Nucleic Acids Res* 36 (3): 712-725.
- Iwamoto M, Jernigan DB, Guasch A, Trepka MJ, Blackmore CG, Hellinger WC, Pham SM, Zaki S, Lanciotti RS, Lance-Parker SE, DiazGranados CA, Winquist AG, Perlino CA, Wiersma S, Hillyer KL, Goodman JL, Marfin AA, Chamberland ME, Petersen LR** (2003). Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients. *N Engl J Med* 348 (22): 2196-2203.
- Jia XY, Briese T, Jordan I, Rambaut A, Chi HC, Mackenzie JS, Hall RA, Scherret J, Lipkin WI** (1999). Genetic analysis of West Nile New York 1999 encephalitis virus. *The Lancet* 354 (9194): 1971-1972.
- Johnston LJ, Halliday GM, King NJ** (2000). Langerhans cells migrate to local lymph nodes following cutaneous infection with an arbovirus. *J Invest Dermatol* 114 (3): 560-568.
- Johnson AJ, Martin DA, Karabatsos N, Roehrig JT** (2000). Detection of anti-arboviral immunoglobulin G by using a monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 38 (5): 1827-1831.
- Jones CT, Ma L, Burgner JW, Groesch TD, Post CB, Kuhn RJ** (2003). Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein. *J Virol* 77 (12): 7143-7149.
- Jozan M, Evans R, McLean R, Hall R, Tangredi B, Reed L, Scott J** (2003). Detection of West Nile Virus infection in birds in the United States by blocking ELISA and immunohistochemistry. *Vector Borne Zoonotic Dis* 3 (3): 99-100.
- Julander JG, Winger QA, Olsen AL, Day CW, Sidwell RW, Morrey JD** (2005). Treatment of West Nile virus-infected mice with reactive immunoglobulin reduces fetal titers and increases dam survival. *Antiviral Res* 65 (2): 79-85.
- Kaabinejadian S, Piazza PA, McMurtrey CP, Vernon SR, Cate SJ, Bardet W, Schafer FB, Jackson KW, Campbell DM, Buchli R, Rinaldo CR, Hildebrand WH** (2013). Identification of Class I HLA T Cell Control Epitopes for West Nile Virus. *PLOS ONE* 8 (6): e66298.
- Kanai R, Kar K, Anthony K, Gould LH, Ledizet M, Fikrig E, Marasco WA, Koski RA, Modis Y** (2006). Crystal structure of west nile virus envelope glycoprotein reveals viral surface epitopes. *J Virol* 80 (22): 11000-11008.
- Karaghiosoff M, Neubauer H, Lassnig C, Kovarik P, Schindler H, Pircher H, McCoy B, Bogdan C, Decker T, Brem G, Pfeffer K, Müller M** (2000). Partial impairment of cytokine responses in Tyk2-deficient mice. *Immunity* 13 (4): 549-560.
- Kaufman HL, Taback B, Sherman W, Kim DW, Shingler WH, Moroziewicz D, DeRaffele G, Mitcham J, Carroll MW, Harrop R, Naylor S, Kim-Schulze S** (2009). Phase II trial of Modified Vaccinia Ankara (MVA) virus expressing 5T4 and high dose Interleukin-2 (IL-2) in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Transl Med* 7: 2.

- Kiermayr S, Kofler RM, Mandl CW, Messner P, Heinz FX** (2004). Isolation of capsid protein dimers from the tick-borne encephalitis flavivirus and in vitro assembly of capsid-like particles. *J Virol* 78 (15): 8078-8084.
- Kipp AM, Lehman JA, Bowen RA, Fox PE, Stephens MR, Klenk K, Komar N, Bunning ML** (2006). West Nile virus quantification in feces of experimentally infected American and European crows. *Am J Trop Med Hyg* 75 (4): 688-690.
- Klee AL, Maldin B, Edwin B, Poshni I, Mostashari F, Fine A, Layton M, Nash D** (2004). Long-Term Prognosis for Clinical West Nile Virus Infection. *Emerg Infect Dis* 10 (8): 1405-1411.
- Kleiboeker SB, Loiacono CM, Rottinghaus A, Pue HL, Johnson GC** (2004). Diagnosis of West Nile virus infection in horses. *J Vet Diagn Invest* 16 (1): 2-10.
- Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, Hettler D, Davis B, Bowen R, Bunning M** (2003). Experimental Infection of North American Birds with the New York 1999 strain of West Nile Virus. *Emerg Infect Dis* 9 (3): 311-322.
- Konishi E und Mason PW** (1993). Proper maturation of the Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein requires cosynthesis with the premembrane protein. *J Virol* 67 (3): 1672-1675.
- Konishi E, Pincus S, Paoletti E, Shope RE, Burrage T, Mason PW** (1992). Mice immunized with a subviral particle containing the Japanese encephalitis virus prM/M and E proteins are protected from lethal JEV infection. *Virology* 188 (2): 714-720.
- Koonin EV** (1993). Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lambda 2 protein of reovirus. *J Gen Virol* 74 (4): 733-740.
- Kramer LD, Li J, Shi P-J** (2007). West Nile virus. *Lancet Neurol* 6 (2): 171-181.
- Kramer LD und Bernard KA** (2001). West Nile virus infection in birds and mammals. *Ann NY Acad Sci* 951: 84-93.
- Kreijtz JH, Gilbert SC, Sutter G** (2013). Poxvirus vectors. *Vaccine* 31 (39): 4219-4219.
- Kreijtz JH, Suezer Y, de Mutsert G, van Amerongen G, Schwantes A, van den Brand JMA, Fouchier RAM, Löwer J, Oserhaus ADME, Sutter G, Rimmelzwaan GF** (2009). MVA-Based H5N1 Vaccine Affords Cross-Clade Protection in Mice against Influenza A/H5N1 Viruses at Low Doses and after Single Immunization. *PLOS ONE* 4 (11): e7790.
- Kremer M, Volz A, Kreijtz JH, Fux R, Lehmann MH, Sutter G** (2012). Easy and efficient protocols for working with recombinant vaccinia virus MVA. *Methods Mol Biol* 890: 59-92.

Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG, Baker TS, Strauss JH (2002). Structure of Dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 108 (5): 717-725.

Kuhn RJ (2007). Togaviridae: The Viruses and Their Replication. In: *Fields Virology*. 5th Edition. Eds. Knipe DM, Howley PM. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins: 1001-1023.

Kumar P, Lee SK, Shankar P, Manjunath N (2006). A single siRNA supresses fatal encephalitis induced by two different flaviviruses. *PLoS Med* 3 (4): e96.

Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabastos N, Cropp CB (1998). Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *Journal of Virology* 72 (1): 73-83.

LaDeau SL, Kilpatrick AM, Marra PP (2007). West Nile virus emergence and large-scale declines of North American bird populations. *Nature* 447: 710-713.

Lanciotti RS, Ebel G, Deubel V, Kerst AJ, Murri S, Meyer R, Bowen M, McKinney N, Morrill WE, Crabtree MB, Kramer LD, Roehrig JT (2002). Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. *Virology* 298 (1): 96-105.

Lanciotti RS, Kerst AJ, Nasci RS, Godsey MS, Mitchell CJ, Savage HM, Komar N, Panella NA, Allen BC, Volpe KE, Davis BS, Roehrig JT (2000). Rapid detection of west nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J Clin Microbiol* 38 (11): 4066-4071.

Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V, Smith J, Parker M, Steele K, Crise B, Volpe KE, Crabtree MB, Scherret JH, Hall RA, Mackenzie JS, Cropp CB, Panigraphy B, Ostlund E, Schmitt B, Malkinson M, Banet C, Weissman J, Komar N, Savage HM, Stone W, McNamara T, Gubler DJ (1999). Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science* 286 (5448): 2333-2337.

Langevin SA, Brault AC, Panella NA, Bowen RA, Komar N (2005). Variation in virulence of West Nile virus strains for house sparrows (*Passer domesticus*). *Am J Trop Med Hyg* 72 (1): 99-102.

Lanteri MC, O'Brien KM, Purtha WE, Cameron MJ, Lund JM, Owen RE, Heitman JW, Custer B, Hischkorn DF, Tobler LH, Kiely N, Prince HE, Ndhlovu LC; Nixon DF, Kamel HT, Kelvin DJ, Busch MP, Rudensky AY, Diamond MS, Norris PJ (2009). Tregs control the development of symptomatic West Nile virus infection in humans and mice. *J Clin Invest* 119 (11): 3266-3277.

Lawrie CH, Uzcátegui NY, Gould EA, Nuttall PA (2004). Ixodid and Argasid Tick Species and West Nile Virus. *Emerg Infect Dis* 10 (4): 653-657.

Ledgerwood JE, Pierson TC, Hubka SA, Desai N, Rucker S, Gordon IJ, Enama ME, Nelson M, Gu W, Bundrant N, Koup RA, Bailer RT, Mascola JR, Nabel GJ, Graham BS (2011). A West Nile virus DNA vaccine utilizing a modified promoter induces neutralizing antibody in younger and older healthy adults in a phase I clinical trial. *J Infect Dis* 203 (10): 1396-1404.

Lee E, Hall RA, Lobigs M (2004). Common E Protein Determinants for Attenuation of Glycosaminoglycan-Binding Variants of Japanese Encephalitis and West Nile Virus. *J Virol* 78 (15): 8271-8280.

Lieberman MM, Clements DE, Ogata S, Wang G, Corpuz G, Wong T, Martyak T, Gilson L, Collier B-A, Leung J, Watts DM, Tesh RB, Siirin M, Travassos da Rosa A, Humphreys T, Weeks-Levy C (2007). Preparation and immunogenic properties of a recombinant West Nile subunit vaccine. *Vaccine* 25 (3): 414-423.

Lim PY, Behr MJ, Chadwick CM, Shi PY, Bernard KA (2011). Keratinocytes are cell targets of West Nile virus in vivo. *J Virol* 85 (10): 5197-5201.

Lindenbach BD, Thiel H-J, Rice CM (2007). Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: *Fields Virology*. 5th Edition. Eds. Knipe DM, Howley PM. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins: 1101-1152.

Liu WJ, Wang XJ, Clark DC, Lobigs M, Hall RA, Khromykh AA (2006). A single amino acid substitution in the West Nile virus nonstructural protein NS2a disables its ability to inhibit alpha/beta interferon induction and attenuates virus virulence in mice. *J Virol* 80 (5): 2396-2404.

Long MT, Jeter W, Hernandez J, Sellon DC, Gosche D, Gillis K, Bille E, Gibbs EP (2006). Diagnostic performance of the equine IgM capture ELISA for serodiagnosis of West Nile virus infection. *J Vet Intern Med* 20 (3): 608-613.

Lorenz IC, Allison SL, Heinz FX, Helenius A (2002). Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. *J Virol* 76 (11): 5480-5491.

Lvov DK, Butenko AM, Gromashevsky VL, Kovtunov AI, Prilipov AG, Kinney R, Aristova VA, Dzharkenov AF, Samokhvalov EI, Savage HM, Shchelkanov MY, Galkina IV, Deryabin PG, Gubler DJ, Kulikova LN, Alkhovsky SK, Moskvina TM, Zlobina LV, Sadykova GK, Shatalov AG, Lvov DN, Usachev VE, Voronina AG (2004). West Nile virus and other zoonotic viruses in Russia: examples of emerging-reemerging situations. *Arch Virol Suppl* 18: 85-96.

Macdonald J, Tonry J, Hall RA, Williams B, Palacios G, Ashok MS, Jabado O, Clark D, Tesh RB, Briese T, Lipkin WI (2005). NS1 Protein Secretion during the Acute Phase of West Nile Virus Infection. *J Virol* 79 (22): 13924-13933.

Mackenzie JM, Jones MK, Young PR (1996). Immunolocalization of the dengue virus Nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology* 220 (1): 232-240.

- Mackenzie JM, Khromykh AA, Jones MK, Westaway EG** (1998). Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2a and NS4a. *Virology* 245 (2): 203-215.
- Mackett M, Smith GL, Moss B** (1984). General Method for Production and Selection of Infectious Vaccinia Virus Recombinants Expressing Foreign Genes. *J Virol* 49 (3): 857-864.
- Mackett M, Smith GL, Moss B** (1982). Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 79 (23): 7415-7419.
- Malan AK, Stipanovich PJ, Martins TB, Hill HR, Litwin CM** (2003). Detection of IgG and IgM to West Nile virus. Development of an immunofluorescence assay. *Am J Clin Pathol* 119 (4): 508-515.
- Mandl CW, Allison SL, Holzmann H, Meixner T, Heinz FX** (2000). Attenuation of Tick-Borne Encephalitis Virus by Structure-Based Site-Specific Mutagenesis of a Putative Flavivirus Receptor Binding Site. *J Virol* 74 (20): 9601-9609.
- Martin DA, Biggerstaff BJ, Allen B, Johnson AJ, Lanciotti RS, Roehrig JT** (2002). Use of immunoglobulin m cross-reactions in differential diagnosis of human flaviviral encephalitis infections in the United States. *Clin Diagn Lab Immunol* 9 (3): 544-549.
- Martin DA, Muth DA, Brown T, Johnson AJ, Karabatsos N, Roehrig JT** (2000). Standardization of Immunoglobulin M Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Routine Diagnosis of Arboviral Infections. *J Clin Microbiol* 38 (5): 1823-1826.
- Martin JE, Pierson TC, Hubka S, Rucker S, Gordon IJ, Enama ME, Andrews CA, Xu Q, Davis BS, Nason MC, Fay MP, Koup RA, Roederer M, Bailer RT, Gomez PL, Mascola JR, Chang G-JJ, Nabel GJ, Graham BS** (2007). A West Nile virus DNA vaccine induces neutralizing antibody in healthy adults during a phase 1 clinical trial. *J Infect Dis* 196 (12): 1732-1740.
- Martina BEE, Koraka P, van den Doel P, Rimmelzwaan GF, Haagmans BL, Osterhaus ADME** (2008a). DC-SIGN enhances infection of cells with glycosylated West Nile virus in vitro and virus replication in human dendritic cells induces production of IFN- α and TNF- α . *Virus Res* 135 (1): 64-71.
- Martina BEE, Koraka P, van den Doel P, van Amerongen G, Rimmelzwaan GF, Osterhaus ADME** (2008b). Immunization with West Nile virus envelope domain III protects mice against lethal infection with homologous and heterologous virus. *Vaccine* 26 (2): 153-157.
- Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, Oshiumi H, Shingai M, Seto Y, Yamamoto A, Seya T** (2003). Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* 171 (6): 3154-3162.

- May FJ, Davis CT, Tesh RB, Barrett ADT** (2011). Phylogeography of West Nile Virus: from the Cradle of Evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas. *Journal of Virology* 85 (6): 2964-2974.
- Mayr A, Hochstein-Mintzel V, Stickl H** (1975). Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes MVA. *Infection* 3 (1): 6-14.
- Mayr A, Stickl H, Müller HK, Danner K, 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 Bakteriell B* 167 (5-6): 375-390.
- McLean RG, Ubico SR, Docherty DE, Hansen WR, Silea L, McNamara TS** (2001). West Nile virus transmission and ecology in birds. *Ann N Y Acad Sci* 951 (1): 54-57.
- McMurtrey CP, Lelic A, Piazza P, Chakrabarti AK, Yablonsky EJ, Wahl A, Bardet W, Eckerd A, Cook RL, Hess R, Buchli R, Loeb M, Rinaldo CR, Bramson J, Hildebrand WH** (2008). Epitope discovery in West Nile virus infection: Identification and immune recognition of viral epitopes. *PNAS* 105 (8): 2981-2986.
- Mehlhof E, Whitby K, Oliphant T, Marri A, Engle M, Diamond MS** (2005). Complement activation is required for induction of a protective antibody response against West Nile virus infection. *J Virol* 79 (12): 7466-7477.
- Mehlhof E und Diamond MS** (2006). Protective immune responses against West Nile virus are primed by distinct complement activation pathways. *J Exp Med* 203 (5): 1371-1381.
- Men RH, Bray M, Lai CJ** (1991). Carbox-terminally truncated dengue virus envelope glycoproteins expressed on the cell surface and secreted extracellularly exhibit increased immunogenicity in mice. *J Virol* 65 (3): 1400-1407.
- Meyer H, Sutter G, 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.
- Minke JM, Siger L, Karaca K, Austgen L, Gordy P, Bowen R, Renshaw RW, Loosmore S, Audonnet JC, Nordgren B** (2004). Recombinant canarypoxvirus vaccine carrying the prM/E genes of West Nile virus protects horses against a West Nile virus-mosquito challenge. *Arch Virol Suppl* 18: 221-230.
- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC** (2003). A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (12): 6986-6991.
- Modrow S, Falke D, Tuyen U, Schätzl H** (2010). *Molekulare Virologie*. 3. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Monath TP, Liu J, Kanesa-Thasan N, Myers GA, Nichols R, Deary A, McCarthy K, Johnson C, Ermak T, Shin S, Arroyo J, Guirakhoo F, Kennedy JS, Ennis FA, Green S, Bedford P (2006). A live, attenuated recombinant West Nile virus vaccine. *PNAS* 103 (17): 6694-6699.

Moss B (2007). Poxviridae: The Viruses and their Replication. In: *Fields Virology*. 5th Edition. Eds. Knipe DM, Howley PM. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins: 2905-2946.

Mostashari F, Bunning ML, Kitsutani PT, Singer DA, Nash D, Cooper MJ, Katz N, Liljebjelke KA, Biggerstaff BJ, Fine AD, Layton MC, Mullin SM, Johnson AJ, Martin DA, Hayes EB, Campbell GL (2001). Epidemic West Nile encephalitis, New York, 1999: results of a household-based seroepidemiological survey. *The Lancet* 358 (9287): 261-264.

Mukhopadhyay S, Kim BS, Chipman PR, Rossmann MG, Kuhn RJ (2003). Structure of West Nile virus. *Science* 302: 248.

Mukhopadhyay S, Zhang W, Gabler S, Chipman PR, Strauss EG, Strauss JH, Baker TS, Kuhn RJ, Rossmann MG (2006). Mapping the structure and function of the E1 and E2 glycoproteins in alphaviruses. *Structure* 12 (1): 63-73.

Mumcuoglu KY, Banet-Noach C, Malkinson M, Shalom U, Galun R (2005). Argasid ticks as possible vectors of West Nile virus in Israel. *Vector Borne Zoonotic Dis* 5 (1): 65-71.

Munoz-Jordán JL, Sánchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, Garcia-Sastre A (2003). Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (24): 14333-14338.

Murgue B, Zeller H, Deubel V (2002). The ecology and epidemiology of West Nile virus in Africa, Europe and Asia. *Curr Top Microbiol Immunol* 267: 195-221.

Murray KO, Mertens E, Despres P (2010). West Nile virus and its emergence in the United States of America. *Vet Res* 41 (6): 67.

Nash D, Mostashari F, Fine A, Miller J, O'leary D, Murray K, Huang A, Rosenberg A, Greenberg A, Sherman M, Wong S, Layton M (2001). The outbreak of West Nile Virus Infection in the New York City area in 1999. *N Engl J Med* 344 (24): 1807-1814.

Nathanson N (2007). Epidemiology. In: *Fields Virology*. 5th Edition. Eds. Knipe DM, Howley PM. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins: 423-446.

Nelson MH, Winkelmann E, Ma Y, Xia J, Mason PW, Bourne N, Milligan GN (2011). Immunogenicity of RepliVAX WN, a novel single-cycle West Nile virus vaccine. *Vaccine* 29 (2): 174-182.

Nemeth N, Gould D, Bowen R, Komar N (2006). Natural and experimental West Nile virus infection in five raptor species. *J Wildl Dis* 42 (1): 1-13.

Ng T, Hathaway D, Jennings N, Champ D, Chiang YW, Chu HJ (2003). Equine vaccine for West Nile virus. *Dev Biol* 114: 221-227.

Niedrig M, Sonnenberg K, Steinhagen K, Paweska JT (2007). Comparison of ELISA and immunoassays for measurement of IgG and IgM antibody to West Nile virus in human sera against virus neutralisation. *J Virol Methods* 139 (1): 103-105.

Noad R und Roy P (2003). Virus-like particles as immunogens. *Trends Microbiol* 11 (9): 438-444.

Nowak T, Färber PM, Wengler G, Wengler G (1989). Analyses of the terminal sequences of West Nile virus structural proteins and of the in vitro translation of these proteins allow the proposal of a complete scheme of the proteolytic cleavages involved in their synthesis. *Virology* 169 (2): 365-376.

Ohtaki N, Takahashi H, Kaneko K, Gomi Y, Ishikawa T, Higashi Y, Kurata T, Sata T, Kojima A (2010). Immunogenicity and efficacy of two types of West Nile virus-like particles different in size and maturation as a second-generation vaccine candidate. *Vaccine* 28 (40): 6588-6596.

Oliphant T, Engle M, Nybakken GE, Doane C, Johnson S, Huang L, Gorlatov S, Mehlhop E, Marri A, Chung KM, Ebel GD, Kramer LD, Fremont DH, Diamond MS (2005). Development of a humanized monoclonal antibody with therapeutic potential against West Nile virus. *Nat Med* 11: 522-530.

Oliphant T, Nybakken GE, Austin SK, Xu Q, Bramson J, Loeb M, Throsby M, Fremont DH, Pierson TC, Diamond MS (2007). Induction of Epitope-Specific Neutralizing Antibodies against West Nile Virus. *J Virol* 81 (21): 11828-11839.

Ostlund EN, Crom RL, Pedersen DD, Johnson DJ, Williams WO, Schmitt BJ (2001). Equine West Nile Encephalitis, United States. *Emerg Infect Dis* 7 (4): 665-669.

Padgett KA, Cahoon-Young B, Carney R, Woods L, Read D, Husted S, Kramer V (2006). Field and laboratory evaluation of diagnostic assays for detecting West Nile virus in oropharyngeal swabs from California wild birds. *Vector Borne Zoonotic Dis* 6 (2): 183-191.

Paisley JE, Hinckley AF, O'Leary DR, Kramer WC, Lanciotti RS, Campell GL, Hayes BB (2006). West Nile virus infection among pregnant women in a northern Colorado Community, 2003 to 2004. *Pediatrics* 117 (3): 514-520.

Papa A, Xanthopoulou K, Gewehr S, Mourelatos S (2011). Detection of West Nile virus Lineage 2 in mosquitoes during a human outbreak in Greece. *Clin Microbiol Infect* 17 (8): 1176-1180.

Papin JF, Vahrson W, Dittmer DP (2004). SYBR green-based real-time quantitative PCR assay for detection of West Nile Virus circumvents false-negative results due to strain variability. *J Clin Microbiol* 42 (4): 1511-1518.

- Pavan A, Covelli E, Pascale MC, Lucania G, Bonatti S, Pinto da Silva P, Torrisi MR** (1992). Dynamics of transmembrane proteins during Sindbis virus budding. *J Cell Sci* 102 (Pt 1): 149-155.
- Payne LG und Norrby E** (1976). Presence of haemagglutinin in the envelope of extracellular vaccinia virus particles. *J Gen Virol* 32 (1): 63-72.
- Pealer LN, Marfin AA, Petersen LR, Lanciotti RS, Page PL, Stramer SL, Stobierski MG, Signs K, Newman B, Kapoor H, Goodman JL, Chamberland ME** (2003). Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States 2002. *N Engl J Med* 349 (13): 1236-1245.
- Petersen LR und Marfin AA** (2002). West Nile Virus: A Primer for the Clinician. *Ann Intern Med* 137 (3): 173-179.
- Peterson AT, Vieglaiss DA, Andreassen JK** (2003). Migratory birds modeled as critical Transport agents for West Nile Virus in North America. *Vecotor-Borne and Zoonotic Diseases* 3 (1): 27-37.
- Pletnev AG, Putnak R, Speicher J, Wagar EJ, Vaughn DW** (2002). West Nile virus/dengue type 4 virus chimeras that are reduced in neurovirulence and peripheral virulence without loss of immunogenicity or protective efficacy. *PNAS* 99 (5): 3036-3041.
- Pletnev AG, Swayne DE, Speicher J, Rummyantsev AA, Murphy BR** (2006). Chimeric West Nile/dengue virus vaccine candidate: preclinical evaluation in mice, geese and monkeys for safety and immunogenicity. *Vaccine* 24 (40-41): 6392-6404.
- Poidinger M, Hall RA, Mackenzie JS** (1996). Molecular characterization of the Japanese encephalitis serocomplex of the flavivirus genus. *Virology* 218 (2): 417-421.
- Porter MB, Long MT, Getman LM, Giguère S, MacKay RJ, Lester GD, Alleman AR, Wamsley HL, Franklin RP, Jacks S, Buergeit CD, Detrisac CJ** (2003). West Nile virus Encephalomyelitis in horses: 46 cases (2001). *J Am Vet Med Assoc* 222 (9): 1241-1247.
- Puig-Basagoiti F, Deas TS, Ren P, Tilgner M, Ferguson DM, Shi PY** (2005). High throughput assays using a luciferase-expressing replicon, virus-like particles, and full-length virus for West Nile virus drug discovery. *Antimicrob Agents Chemother* 49 (12): 4980-4988.
- Purtha WE, Myers N, Mitaksov V, Sitati E, Connolly J, Fremont DH, Hansen TH, Diamond MS** (2007). Antigen-specific cytotoxic T lymphocytes protect against lethal West Nile virus encephalitis. *Eur J Immunol* 37 (7): 1845-1854.
- Pushko P, Tumpey TM, Bu F, Knell J, Robinson R, Smith G** (2005). Influenza virus-like particles comprised of the HA, NA and M1 proteins of H9N2 influenza virus induce protective immune responses in BALB/c mice. *Vaccine* 23 (50): 5751-5759.

- Qiao M, Ashok M, Bernard KA, Palacios G, Zhou ZH, Lipkin WI, Liang TJ** (2004). Induction of sterilizing immunity against West Nile Virus (WNV), by immunization with WNV-like particles produced in insect cells. *J Infect Dis* 190 (12): 2104-2108.
- Ramlau R, Quoix E, Rolski J, Pless M, Lena H, Lévy E, Krzakowski M, Hess D, Tartour E, Chenard MP, Limacher JM, Bizouarne N, Acres B, Halluard C, Velu T** (2008). A phase II study of Tg4010 (Mva-Muc1-II2) in association with chemotherapy in patients with stage III/IV Non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 3 (7): 735-744.
- Ramos HJ, Lanteri MC, Blahnik G, Negash A, Suthar MS, Brassil MM, Sodhi K, Treuting PM, Busch MP, Norris PJ, Gale M Jr.** (2012). IL-1 signaling promotes CNS-intrinsic immune control of West Nile virus infection. *PLoS Pathog* 8 (11): e1003039.
- Reisen W, und Brault AC** (2007). West Nile virus in North America: perspectives on epidemiology and intervention. *Pest Manag Sci* 63 (7): 641-646.
- Reisen WK, Fang Y, Martinez VM** (2005). Avian Host and Mosquito (Diptera: Culicidae) Vector Competence Determine the Efficiency of West Nile and St. Louis Encephalitis Virus Transmission. *J Med Entomol.* 42 (3): 367-375.
- Rey FA, Heinz FX, Mandl C, Kunz C, Harrison SC** (1995). The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375 (6529): 291-298.
- Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL, Strauss JH** (1985). Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* 229 (4715): 726-733.
- Roehr B** (2012a). US hit by massive West Nile virus outbreak centred around Texas. *British Medical Journal* 2012; 345:e5633.
- Roehr B** (2012b). Texas records worst outbreak of West Nile virus on record. *BMJ* 2012; 345:e6019.
- Roehrig JT, Nash D, Maldin B, Labowitz A, Martin DA, Lanciotti RS, Campbell GL** (2003). Persistence of virus-reactive serum immunoglobulin m antibody in confirmed west nile virus encephalitis cases. *Emerg Infect Dis* 9 (3): 376-379.
- Roy P und Noad R** (2008). Virus-like particles as a vaccine delivery system: myths and facts. *Hum Vaccin* 4 (1): 5-12.
- Salazar P, Traub-Dargatz JL, Morley PS, Wilmot DD, Steffen DJ, Cunningham WE, Salman MD** (2004). Outcome of equids with clinical signs of West Nile virus infection and factors associated with death. *J Am Vet Med Assoc* 225 (2): 267-274.
- Samuel MA und Diamond MS** (2005). Alpha/beta interferon protects against lethal West Nile virus infection by restricting cellular tropism and enhancing neuronal survival. *J Virol* 79 (21): 13350-13361.

Sánchez MD, Pierson TC, McAllister D, Hanna SL, Puffer BA, Valentine LE, Murtadha MM, Hoxie JA, Doms RW (2005). Characterization of neutralizing antibodies to West Nile virus. *Virology* 336 (1): 70-82.

Sayao AL, Suchowersky O, Al-Khathaami A, Klassen B, Katz NR, Sevick R, Tilley P, Fox J, Patry D (2004). Calgary experience with West Nile virus neurological syndrome during the late summer of 2003. *Can J Neurol Sci* 31 (2): 194-203.

Scherret JH, Poidinger M, Mackenzie JS, Broom AK, Deubel V, Lipkin WI, Briese T, Gould EA, Hall RA (2001). The Relationships between West Nile and Kunjin viruses. *Emerg Infect Dis* 7 (4): 697-705.

Schmeisser F, Adamo JE, Blumberg B, Friedman R, Muller J, Soto J, Weir JP (2012). Production and characterization of mammalian virus-like particles from modified vaccinia virus Ankara vectors expressing influenza H5N1 hemagglutinin and neuraminidase. *Vaccine* 30 (23): 3413-3422.

Schmidt JR und Elmansoury HK (1963). Natural and experimental infection of Egyptian equines with West Nile virus. *Ann Trop Med Parasitol* 57: 415-427.

Sejvar JJ, Bode AV, Marfin AA, Campbell GL, Ewing D, Mazowiecki M, Pavot PV, Schmitt J, Pape J, Biggerstaff BJ, Petersen LR (2005). West Nile Virus – associated Flaccid Paralysis. *Emerg Infect Dis* 11 (7): 1021-1027.

Sejvar JJ, Lindsey NP, Campbell GL (2011). Primary causes of death in reported cases of fatal West Nile Fever, United States, 2002-2006. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11 (2): 161-164.

Sfakianos JN und Hecht A (2009). *West Nile Virus*. 2nd Edition. New York: Chelsea House Books.

Shida H (1986). Nucleotide Sequence of the Vaccinia Virus Hemagglutinin Gene. *Virology* 150 (2): 451-462.

Shimoda K, Kato K, Aoki K, Matsuda T, Miyamoto A, Shibamori M, Yamashita M, Numata A, Takase K, Kobayashi S, Shibata S, Asano Y, Gondo H, Sekiuchi K, Nakayama K, Nakayama T, Okamura T, Okamura S, Niho Y, Nakayama K (2000). Tyk2 Plays a restricted role in IFN alpha signaling, although it is required for IL-12-mediated T cell function. *Immunity* 13 (4): 561-571.

Shrestha B und Diamond MS (2004). Role of CD8⁺ T cells in control of West Nile virus infection. *J Virol* 78 (15): 8312-8321.

Shrestha B und Diamond MS (2006). CD8⁺ T cells require perforin to clear West Nile Virus from infected neurons. *J Virol* 80 (1): 119-129.

Shrestha B und Diamond MS (2007). Fas Ligand Interactions Contribute to CD8⁺ T-Cell-Mediated Control of West Nile Virus Infection in the Central Nervous System. *J Virol* 81 (21): 11749-11757.

- Shrestha B, Pinto AK, Green S, Bosch I, Diamond MS** (2012). CD8+ T cells use TRAIL to restrict West Nile virus pathogenesis by controlling infection in neurons. *J Virol* 86 (17): 8937-8948.
- Shrestha B, Wang T, Samuel MA, Whitby K, Craft J, Fikrig E, Diamond MS** (2006). Gamma Interferon plays a crucial early antiviral role in protection against West Nile Virus infection. *J Virol* 80 (11): 5338-5348.
- Sitati EM und Diamond MS** (2006). CD4⁺ T-Cell responses are required for clearance of West Nile Virus from the Central Nervous System. *J Virol* 80 (24): 12060-12069.
- Smith GW und Wright PJ** (1985). Synthesis of proteins and glycoproteins in dengue type 2 virus-infected vero and *Aedes albopictus* cells. *J Gen Virol* 66 (3): 559-571.
- Smithburn KC; Hughes TP, Burke AW, Paul JH** (1940). A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am J Trop Med Hyg* 20: 471-492.
- Solomon T, Ooi MH, Beasley DWC, Mallewa M** (2003). West Nile encephalitis. *British Medical Journal* 326 (7394): 865-869.
- Stadler K, Allison SL, Schlich J, Heinz FX** (1997). Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J Virol* 71 (11): 8475-8481.
- Staib C, Drexler I, Sutter G** (2004). Construction and isolation of recombinant MVA. *Methods Mol Biol* 269: 77-100.
- Stickl H, Hochstein-Mintzel V, Mayr A, Huber HC, Schäfer H, Holzner A** (1974). MVA-Stufenimpfung gegen Pocken. Klinische Erprobung des attenuierten Pocken-Lebendimpfstoffes, Stamm MVA. *Dtsch Med Wochenschr* 99 (74): 2386-2396.
- Stittelaar KJ, Kuiken T, de Swart RL, van Amerongen G, Vos HW, Niersers HG, van Schalkwijk P, van der Kwast T, Wyatt LS, Moss B, Osterhaus AD** (2001). Safety of modified vaccinia virus Ankara (MVA) in immune-suppressed macaques. *Vaccine* 19 (27): 3700-3709.
- Sutter G und Moss B** (1992). Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *PNAS* 89 (22): 10847-10851.
- Sutter G, Wyatt LS, Foley PL, Bennink JR, Moss B** (1994). A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus. *Vaccine* 12 (11): 1032-1040.
- Takaoka A, Hayakawa S, Yanai H, Stoiber D, Negishi H, Kikuchi H, Sasaki S, Imai K, Shibue T, Honda K, Taniguchi T** (2003). Integration of interferon- α/β signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature* 424 (6948): 516-523.
- Tameris MD, Hatherill M, Landry BS, Scriba TJ, Snowden MA, Lockhart S, Shea JE, McClain JB, Hussey GD, Hanekom WA, Mahomed H, McShane H** (2013). Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with

BCG: a randomised, placebo-controlled phase 2b trial. *The Lancet* 381 (9871): 1021-1028.

Throsby M, Geuijen C, Goudsmit J, Bakker AQ, Korimbocus J, Kramer RA, Clijsters-van der Horst M, de Jong M, Jongeneelen M, Thijsse S, Smit R, Visser TJ, Bijl N, Marissen WE, Loeb M, Kelvin DJ, Preiser W, ter Meulen J, de Kruif J (2006). Isolation and characterization of human monoclonal antibodies from individuals infected with West Nile Virus. *J Virol* 80 (14): 6982-6992.

Town T, Bai F, Wang T, Kaplan AT, Qian F, Montgomery RR, Anderson JF, Flavell RA, Fikrig E (2009). Toll-like receptor 7 mitigates lethal West Nile encephalitis via interleukin 23-dependent immune cell infiltration and homing. *Immunity* 30 (2): 242-253.

Tsai TF, Popovici F, Cernescu C, Campell GL, Nedelcu NI (1998). West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *The Lancet* 352 (9130): 767-771.

Turell MJ, Sardelis MR, Dohm DJ, O'Guinn ML (2001). Potential North American vectors of West Nile viurs. *Ann N Y Acad Sci* 951 (1): 317-324.

United States Department of Agriculture (USDA) (2013). Animal Health Monitoring & Surveillance. 2012 Summary of Equine West Nile Virus Cases in the United States. <http://www.aphis.usda.gov/vs/nahss/equine/wnv/index.htm>

Vázquez S, Guzmán MG, Guillen G, Chinae G, Pérez AB, Pupo M, Rodriguez R, Reyes O, Gaaray HE, Delgado I, Garcia G, Alvarez M (2002). Immune response to synthetic peptides of dengue prM protein. *Vaccine* 20 (13-14): 1823-1830.

Venter M, Human S, Zaayman D, Gerdes GH, Williams J, Steyl J, Leman PA, Paweska JT, Setzkorn H, Rous G, Murray S, Parker R, Donnellan C, Swanepoel R (2009). Lineage 2 West Nile Virus as Cause of Fatal Neurologic Disease in Horses, South Africa. *Emerg Infect Dis* 15 (6): 877-884.

Volz A und Sutter G (2013). Protective efficacy of Modified Vaccinia virus Ankara in preclinical studies. *Vaccine* 31 (39): 4235-4240.

Wang P-G, Kudelko M, Lo J, Siu LYL, Kwok KTH, Sachse M, Nicholls JM, Bruzzone R, Altmeyer RM, Nal B (2009). Efficient Assembly and Secretion of Recombinant Subviral Particles of the Four Dengue Serotypes Using Native prM and E Proteins. *PloS ONE* 4 (12): e8325.

Wang T, Anderson JF, Magnarelli LA, Wong SJ, Koski RA, Fikrig E (2001). Immunization of mice against West Nile virus with recombinant envelope protein. *J Immunol* 167 (9): 5273-5277.

Wang T, Scully E, Yin Z, Kim JH, Wang S, Yan J, Mamula M, Anderson JF, Craft J, Fikrig E (2003). IFN- γ -Producing $\gamma\delta$ T Cells Help Control Murine West Nile Virus Infection. *J Immunol* 171 (5): 2524-2531.

- Ward MP, Scheurmann JA, Highfield LD, Murray KO** (2006). Characteristics of an outbreak of West Nile virus encephalomyelitis in a previously uninfected population of horses. *Veterinary Microbiology* 118 (3-4): 255-259.
- Ward MP, Scheurmann JA** (2008). The relationship between equine and human West Nile Virus disease occurrence. *Veterinary Microbiology* 129 (3-4): 378-383.
- Watson JT, Pertel PE, Jones RC, Siston AM, Paul WS, Austin CC, Gerber SI** (2004). Clinical characteristics and functional outcomes of West Nile Fever. *Ann Intern Med* 141 (5): 360-365.
- Watts DM, Tesh RB, Siirin M, Travassos da Rosa A, Newman PC, Clements DE, Ogata S, Collier B-A, Weeks-Levy C, Lierman MM** (2007). Efficacy and durability of a recombinant subunit West Nile vaccine candidate in protecting hamsters from West Nile encephalitis. *Vaccine* 25 (15): 2913-2918.
- Weaver SC und Barrett AD** (2004). Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat Rev Microbiol* 2 (10): 789-801.
- Weingartl HM, Neufeld JL, Copps J, Marszal P** (2004). Experimental West Nile virus infection in blue jays (*Cyanocitta cristata*) and crows (*Corvus brachyrhynchos*). *Vet Pathol* 41 (4): 362-370.
- Weiss D, Carr D, Kellachan J, Tan C, Phillips M, Bresnitz E, Layton M** (2001). Clinical findings of West Nile virus infection in hospitalized patients, New York and New Jersey, 2000. *Emerg Infect Dis* 7 (4): 654-658.
- Welte T, Lamb J, Anderson JF, Born WK, O'Brien RL, Wang T** (2008). The Role of two distinct $\gamma\delta$ T cell Subsets during West Nile virus Infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 53 (2): 275-283.
- Wengler G und Wengler G** (1981). Terminal sequences of the genome and replicative-from RNA of the flavivirus West Nile virus: absence of poly(A) and possible role in RNA replication. *Virology* 113 (2): 544-555.
- Wengler G und Wengler G** (1989). Cell-associated West Nile flavivirus is covered with E+ pre-M protein heterodimers which are destroyed and recognized by proteolytic cleavage during virus release. *J Virol* 63 (6): 2521-2526.
- Werner GT, Jentsch U, Metzger E, Simon J** (1980). Studies on poxvirus infections in irradiated animals. *Arch Virol* 64 (3): 247-256.
- Westaway EG, Khromykh AA, Kenney MT, Mackenzie JM, Jones MK** (1997a). Proteins C and NS4b of the flavivirus Kunjin translocate independently into the nucleus. *Virology* 234 (1): 31-41.

- Westaway EG, Mackenzie JM, Kenney MT, Jones MK, Khromykh AA** (1997b). Ultra-structure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2b with NS3, in virus-induced membrane structures. *J Virol* 71 (9): 6650-6661.
- Westaway EG, Khromykh AA, Mackenzie JM** (1999). Nascent flavivirus RNA colocalized in situ with double-stranded RNA in stable replication complexes. *Virology* 258 (1): 108-117.
- Whiteman MC, Li L, Wicker JA, Kinney RM, Huang C, Beasley DWC, Chung KM, Diamond MS, Solomon T, Barrett ADT** (2010). Development and characterization of non-glycosylated E and NS1 mutant viruses as a potential candidate vaccine for West Nile virus. *Vaccine* 28 (4): 1075-1083.
- Widman DG, Ishikawa T, Giavedoni LD, Hodara VL, Garza Mde L, Montalbo JA, Travassos da Rosa AP, Tesh RB, Patterson JL, Carrion R Jr, Bourne N, Mason PW** (2010). Evaluation of RepliVAX WN, a single-cycle flavivirus vaccine, in a non-human primate model of West Nile virus infection. *Am J Trop Med Hyg* 82 (6): 1160-1167.
- Widman DG, Ishikawa T, Winkelmann ER, Infante E, Bourne N, Mason PW** (2009). RepliVAX WN, a single-cycle flavivirus vaccine to prevent West Nile disease, elicits durable protective immunity in hamsters. *Vaccine* 27 (41): 5550-5553.
- Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, Louder MK, Filgueira L, Marovich MA, Wong HK, Blauvelt A, Murphy GS, Robb ML, Innes BL, Bix DB, Hayes CG, Schlesinger-Frankel S** (2000). Human skin Langerhans cells are targets of Dengue virus infection. *Nat Med*. 6: 816-820.
- Wyatt LS, Carroll MW, Czerny CP, Merchlinsky M, Sisler JR, Moss B** (1998). Marker rescue of the host range restriction defects of Modified Vaccinia Virus Ankara. *Virology* 251 (2): 334-342.
- Wyatt LS, Shors ST, Murphy BR, Moss B** (1996). Development of a replication-deficient recombinant vaccinia virus vaccine effective against parainfluenza virus 3 infection in an animal model. *Vaccine* 14 (15): 1451-1458.
- Yu IM, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR, Kuhn RJ, Rossmann MG, Chen J** (2008). Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science* 319 (5871): 1834-1837.
- Zhang M, Daniel S, Huang Y, Chancey C, Huang Q, Lei YF, Grinev A, Mostowski H, Rios M, Dayton A** (2010). Anti-West Nile virus activity of in vitro expanded human primary natural killer cells. *BMC Immunol* 11: 3.
- Zhang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, Mukhopadhyay S, Baker TS, Strauss JH, Rossmann MG, Kuhn RJ** (2003). Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Biol* 10 (11): 907-912.

Zhang Y, Corver J, Chipman PR, Zhang W, Pletnev SV. Sedlak D, Baker TS, Strauss JH, Kuhn RJ, Rossmann MG (2003). Structures of immature flavivirus particles. EMBO J 22 (11): 2604-0613.

IX. ANHANG

1. Abkürzungen

APC	Antigen-präsentierende-Zelle
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ALP	Alkalische Phosphatase
BCIP	5-Brom-4-chlor-3'-indoxylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
°C	Grad Celsius
CEF	Chicken embryo fibroblast (primäre Hühnerfibroblasten)
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CPE	Zytopathischer Effekt
Cryo-EM	Cryo-Elektronenmikroskopie
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DC-SIGNR	DC-SIGN-related
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E	Envelope-Protein von WNV
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ELISpot	Enzyme-linked immunosorbent spot assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EqF	Equine Fibroblasten (primäre Pferdefibroblasten)
FCS	Fetal calf serum
h	Stunde (Hour)
HR	Homologe Rekombination
HRP	Horseradish Peroxidase
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M

ITR	Inverted terminal repeats
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KUNV	Kunjin-Virus
LB	Luria-Broth
LTR	Left terminal region
mA	Milliampere
MDA-5	Melanoma-differentiation-associated protein 5
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	Multiplicity of infection
MVA	Modifiziertes Vacciniavirus Ankara
NBT	Nitro-blue tetrazolium
NEAA	Non-essential amino acids
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
ORF	Open reading frame
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain reaction
PFU	Plaque forming units
p.i.	post infection
PMA	Phorbol-12-myristad-13-acetat
POD	Peroxidase
PRR	Pattern recognition receptor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RFP	Red fluorescent protein
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene I
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RTR	Right terminal region
SDS	Sodium (Natrium) dodecyl-sulfate
ssRNA	einzelsträngige Ribonukleinsäure
TAE	Tris-Acetate-EDTA

TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TEN	Tris-EDTA-NaCl
TLR	Toll-like-Rezeptor
TM	Transmembrandomäne
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
UV	Ultraviolett
V	Volt
VACV	Vaccinia Virus
VLP	Virus-like particle
v/v	volume to volume
w/v	weight to volume
WB	Westernblot
WHO	World Health Organization
WNV	West-Nil-Virus
ZNS	Zentralnervensystem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

2. Sequenzen der WNV-Genkonstrukte

2.1 Sequenz von prME₁

	10	20	30	40	50	60	
GTTTAAACAC	CATGGGAGGA	AAGACTGGAA	TCGCCGTAAT	GATTGGACTA	ATCGCGTCTG		60
TTGGAGCCGT	AACACTAAGT	AACTTCCAGG	GAAAAGTAAT	GATGACAGTA	AACGCGACAG		120
ATGTAACCTGA	TGTAATCACA	ATTCCGACAG	CGGCGGGAAA	GAACCTATGT	ATAGTTAGAG		180
CCATGGATGT	TGGTTACATG	TGTGATGATA	CAATCACATA	CGAATGTCCG	GTACTATCTG		240
CGGGAAACGA	TCCGGAAGAT	ATCGATTGTT	GGTGTACAAA	GTCTGCGGTA	TACGTTAGAT		300
ACGGAAGATG	TACAAAGACA	AGACATTCTA	GAAGAAGTAG	AAGATCACTA	ACAGTACAGA		360
CACATGGTGA	AAGTACACTA	GCGAACAAAA	AGGGAGCCTG	GATGGATTCT	ACAAAGGCGA		420
CAAGATACCT	AGTAAAGACA	GAATCTTGGA	TCTTGAGAAA	CCCGGGATAT	GCTCTAGTAG		480
CGGCTGTAAT	TGGATGGATG	CTAGGATCTA	ACACAATGCA	GAGAGTAGTA	TTCGTAGTAC		540
TACTACTATT	GGTAGCGCCA	GCGTACTCTT	TCAACTGTCT	AGGAATGTCT	AACAGAGATT		600
TCCTAGAAGG	TGTTAGTGGT	GCCACATGGG	TAGATTTGGT	ATTGGAAGGT	GATAGTTGTG		660
TAACAATCAT	GTCTAAGGAT	AAGCCGACAA	TCGATGTAAA	GATGATGAAC	ATGGAAGCCG		720
TAAACCTAGC	GGAAGTTAGA	AGTTACTGTT	ACCTAGCGAC	AGTATCTGAT	CTATCTACTA		780
AGGCGGCGTG	TCCGACAATG	GGAGAAGCTC	ATAATGATAA	GAGAGCCGAT	CCGGCGTTTCG		840
TATGTAGACA	AGGTGTAGTA	GATAGAGGAT	GGGGAAACGG	ATGTGGACTA	TTCGGAAAGG		900
GATCTATCGA	TACTTGTGCG	AAGTTCGCGT	GTAGTACTAA	GGCGATCGGA	AGAACAATCC		960
TAAAAGAAAA	CATCAAATAC	GAAGTAGCGA	TCTTCGTACA	TGGACCGACA	ACAGTAGAAT		1020
CTCATGGAAA	CTACTCTACA	CAAGTTGGAG	CGACACAGGC	GGGAAGATTT	TCTATTACAC		1080
CAGCTGCGCC	GTCTTACACA	TTGAAGTTGG	GAGAATACGG	TGAAGTAACA	GTAGATTGTG		1140
AACCGAGAAG	TGGAATCGAT	ACAAACGCGT	ACTACGTAAT	GACAGTAGGA	ACAAAGACAT		1200
TCCTAGTTCA	TAGAGAATGG	TTCATGGATC	TAAACCTACC	GTGGTCTAGT	GCGGGATCTA		1260
CAGTTTGGAG	AAACAGAGAA	ACACTAATGG	AATTCTGAAGA	ACCGCATGCG	ACAAAGCAGT		1320
CTGTAATTGC	GCTAGGATCT	CAAGAAGGTG	CCCTACATCA	AGCTCTAGCT	GGTGCTATCC		1380
CGGTAGAATT	CTCTAGTAAC	ACAGTAAAGC	TAACATCTGG	ACATCTAAAG	TGTAGAGTAA		1440
AGATGGAAAA	GCTACAGCTA	AAGGGAACAA	CATACGGTGT	ATGTTCTAAG	GCGTTCAAGT		1500
TCCTAGGAAC	ACCAGCGGAT	ACAGGACATG	GAACAGTAGT	ACTAGAACTA	CAGTACACTG		1560
GAACAGATGG	ACCGTGTAAG	GTACCGATCT	CTTCTGTAGC	CTCTCTAAAC	GATCTAACAC		1620
CAGTAGGAAG	ATTGGTTACA	GTAAACCCGT	TCGTATCTGT	AGCGACAGCG	AATGCGAAGG		1680
TACTAATCGA	ACTAGAACCG	CCGTTCCGGAG	ATTCTTACAT	CGTAGTAGGA	AGAGGTGAAC		1740
AGCAGATCAA	CCATCATTGG	CATAAGTCTG	GATCTTCTAT	CGGAAAGGCG	TTCACAACAA		1800
CATTGAAGGG	TGCCCCAAGA	CTAGCTGCGT	TGGGAGATAC	AGCGTGGGAT	TTTGATCTG		1860
TAGGTGGTGT	ATTACATCT	GTAGGAAAGG	CGGTACATCA	GGTTTTCGGT	GGTGCCTTCA		1920
GATCACTATT	CGGAGGAATG	TCTTGGATCA	CACAGGGACT	ATTGGGAGCG	CTACTACTAT		1980
GGATGGGAAT	CAACGCGAGA	GATAGAAGTA	TCGCGCTAAC	ATTCTAGCC	GTTGGAGGTG		2040
TACTACTATT	CCTATCTGTA	AATGTACATG	CCTGATGATG	AGCGGCCGC			2089

↑ Not I

2.2 Sequenz von prME₂

<i>Pme I</i>						
↓						
GTTTAAACAC	CATGGGAGGA	AAGACTGGAA	TCGCAGTAAT	GATTGGACTA	ATCGCATCTG	60
TTGGAGCAGT	AACACTAAGT	AACTTCCAGG	GAAAAGTAAT	GATGACAGTA	AACGCAACAG	120
ATGTAACTGA	TGTAATCACA	ATTCCGACAG	CTGCAGGAAA	GAACCTATGT	ATAGTTAGAG	180
CCATGGATGT	TGTTTACATG	TGTGATGATA	CAATCACATA	CGAATGTCCA	GTACTATCTG	240
CTGGAAACGA	TCCTGAAGAT	ATCGATTGTT	GGTGTACAAA	GTCTGCAGTA	TACGTTAGAT	300
ACGGAAGATG	TACAAAGACA	AGACATTCTA	GAAGAAGTAG	AAGATCACTA	ACAGTACAGA	360
CACATGGTGA	AAGTACACTA	GCGAACAAAA	AGGGAGCCTG	GATGGATTCT	ACAAAGGCTA	420
CAAGATACCT	AGTAAAGACA	GAATCTTGGA	TCTTGAGAAA	CCCTGGATAT	GCTCTAGTAG	480
CAGCTGTAAT	TGGATGGATG	CTAGGATCTA	ACACAATGCA	GAGAGTAGTA	TTCGTAGTAC	540
TACTACTATT	GGTAGCACCA	GCGTACTCTT	TCAACTGTCT	AGGAATGTCT	AACAGAGATT	600
TCCTAGAAGG	TGTTAGTGGT	GCCACATGGG	TAGATTTGGT	ATTGGAAGGT	GATAGTTGTG	660
TAACAATCAT	GTCTAAGGAT	AAACCGACAA	TCGATGTAAA	GATGATGAAC	ATGGAAGCAG	720
TAAACCTAGC	TGAAGTTAGA	AGTTACTGTT	ACCTAGCGAC	AGTATCTGAT	CTATCTACTA	780
AGGCAGCGTG	TCCGACAATG	GGAGAAGCTC	ATAATGATAA	GAGAGCAGAT	CCAGCGTTCCG	840
TATGTAGACA	AGGTGTAGTA	GATAGAGGAT	GGGGAAACGG	ATGTGGACTA	TTCGGAAAGG	900
GATCTATCGA	TACTTGTGCG	AAGTTCGCAT	GTAGTACTAA	AGCGATCGGA	AGAACAAATCC	960
TAAAAGAAAA	CATCAAATAC	GAAGTAGCGA	TCTTCGTACA	TGGACCGACA	ACAGTAGAAT	1020
CTCATGGAAA	CTACTCTACA	CAAGTTGGAG	CGACACAGGC	AGGAAGATTT	TCTATTACAC	1080
CAGCTGCTCC	GTCTTACACA	TTGAAGTTGG	GAGAATACGG	TGAAGTAACA	GTAGATTGTG	1140
AACCGAGAAG	TGGAATCGAT	ACAAACGCAT	ACTACGTAAT	GACAGTAGGA	ACAAAGACAT	1200
TCCTAGTTCA	TAGAGAATGG	TTCATGGATC	TAAACCTACC	GTGGTCTAGT	GCAGGATCTA	1260
CAGTTTGGAG	AAACAGAGAA	ACACTAATGG	AATTCGAAGA	ACCTCATGCG	ACAAAGCAGT	1320
CTGTAATTGC	ACTAGGATCT	CAAGAAGGTG	CACTACATCA	AGCTCTAGCT	GGTGCTATCC	1380
CAGTAGAATT	CTCTAGTAAC	ACAGTAAAGC	TAACATCTGG	ACATCTAAAG	TGTAGAGTAA	1440
AGATGGAAAA	GCTACAGCTA	AAGGGAACAA	CATACGGTGT	ATGTTCTAAA	GCGTTCAAGT	1500
TCCTAGGAAC	ACCAGCTGAT	ACAGGACATG	GAACAGTAGT	ACTAGAACTA	CAGTACACTG	1560
GAACAGATGG	ACCGTGTAAA	GTACCGATCT	CTTCTGTAGC	CTCTCTAAAC	GATCTAACAC	1620
CAGTAGGAAG	ATTGGTTACA	GTAAATCCGT	TCGTATCTGT	AGCGACAGCG	AATGCGAAGG	1680
TACTAATCGA	ACTAGAACCA	CCGTTCGGAG	ATTCTTACAT	CGTAGTAGGA	AGAGGTGAAC	1740
AGCAGATCAA	CCATCATTGG	CATAAGTCTG	GATCTTCTAT	CGGAAAGGCA	TTCACAACAA	1800
CATTGAAGGG	TGCTCAAAGA	CTAGCTGCGT	TGGGAGATAC	AGCGTGGGAT	TTTGGATCTG	1860
TAGGTGGTGT	ATTACATCT	GTAGGAAAGG	CTGTACATCA	GGTTTTCCGT	GGTGCCTTCA	1920
GATCACTATT	CGGAGGAATG	TCTTGATCA	CACAGGGACT	ATTGGGAGCA	CTACTACTAT	1980
GGATGGGAAT	CAATGCGAGA	GATAGAAGTA	TCGCACTAAC	ATTCTAGCC	GTTGGAGGTG	2040
TACTACTATT	CCTATCTGTA	AATGTACATG	CCTGATGATG	AGCGGCCGC		2089
↑ <i>Not I</i>						

2.3 Sequenz von E_{sol}

<i>Pme I</i>						
↓						
10	20	30	40	50	60	
GTTTAAACAC	CATGGGAGGA	AAGACTGGAA	TCGCCGTAAT	GATTGGACTA	ATCGCGTCTG	60
TTGGAGCCGT	AACACTAAGT	AACTTCCAGG	GAAAAGTAAT	GATGACAGTA	AACGCGACAG	120
ATGTAACCTGA	TGTAATCACA	ATTCCGACAG	CGGCGGGAAA	GAACCTATGT	ATAGTTAGAG	180
CCATGGATGT	TGGTTACATG	TGTGATGATA	CAATCACATA	CGAATGTCCG	GTACTATCTG	240
CGGGAAACGA	TCCGGAAGAT	ATCGATTGTT	GGTGTACAAA	GTCTGCGGTA	TACGTTAGAT	300
ACGGAAGATG	TACAAAGACA	AGACATTCTA	GAAGAAGTAG	AAGATCACTA	ACAGTACAGA	360
CACATGGTGA	AAGTACACTA	GCGAACAAAA	AGGGAGCCTG	GATGGATTCT	ACAAAGGCCGA	420
CAAGATACCT	AGTAAAGACA	GAATCTTGGA	TCTTGAGAAA	CCCGGGATAT	GCTCTAGTAG	480
CGGCTGTAAT	TGGATGGATG	CTAGGATCTA	ACACAATGCA	GAGAGTAGTA	TTCGTAGTAC	540
TACTACTATT	GGTAGCGCCA	GCGTACTCTT	TCAACTGTCT	AGGAATTGTT	AGTGGTGCCA	600
CATGGGTTAGA	TTTGGTATTG	GAAGGTGATA	GTTGTGTAAC	AATCATGTCT	AAGGATAAGC	660
CGACAATCGA	TGTAAAGATG	ATGAACATGG	AAGCCGTAAA	CCTAGCGGAA	GTTAGAAGTT	720
ACTGTTACCT	AGCGACAGTA	TCTGATCTAT	CTACTAAGGC	GGCGTGTCAT	AAGAGAGCCG	780
ATCCGGCGTT	CGTATGTAGA	CAAGGTGTAG	TAGATAGAGG	ATGGGGAAAC	GGATGTGGAC	840
TATTCGGAAA	GGGATCTATC	GATACTGTG	CGAAGTTCGC	GTGTAGTACT	AAGGCGATCG	900
GAAGAACAAT	CCTAAAAGAA	AACATCAAAT	ACGAAGTAGC	GATCTTCGTA	CATGGACCGA	960
CAACAGTAGA	ATCTCATGGA	AACTACTCTA	CACAAGTTGG	AGCGACACAG	GCGGGAAGAT	1020
TTTCTATTAC	ACCAGCTGCG	CCGTCTTACA	CATTGAAGTT	GGGAGAATAC	GGTGAAGTAA	1080
CAGTAGATTG	TGAACCGAGA	AGTGGAAATCG	ATACAAACGC	GTACTACGTA	ATGACAGTAG	1140
GAACAAAGAC	ATTCTAGTGT	CATAGAGAAT	GGTTCATGGA	TCTAAACCTA	CCGTGGTCTA	1200
GTGCGGGATC	TACAGTTTGG	AGAAACAGAG	AAACACTAAT	GGAATTTCGAA	GAACCGCATG	1260
CGACAAAGCA	GTCTGTAATT	GCGCTAGGAT	CTCAAGAAGG	TGCCCTACAT	CAAGCTCTAG	1320
CTGGTGCTAT	CCCGGTAGAA	TTCTCTAGTA	ACACAGTAAA	GCTAACATCT	GGACATCTAA	1380
AGTGTAGAGT	AAAGATGGAA	AAGCTAGTGT	ATGTTCTAAG	GCGTTCAGT	TCCTAGGAAC	1440
ACCAGCGGAT	ACAGGACATG	GAACAGTAGT	ACTAGAACTA	CAGTACACTG	GAACAGATGG	1500
ACCGTGTAAT	GTACCGATCT	CTTCTGTAGC	CTCTCTAAAC	GATCTAACAC	CAGTAGGAAG	1560
ATTGGTTACA	GTAAACCCGT	TCGTATCTGT	AGCGACAGCG	AATGCGAAGG	TACTAATCGA	1620
ACTAGAACCG	CCGTTCCGAG	ATTCTTACAT	CGTAGTAGGA	AGAGGTGAAC	AGCAGATCAA	1680
CCATCATTGG	CATAAGTCTG	GATCTTCTAT	CAAGGGTGCC	CAAAGACGTG	GGATTTTGGA	1740
TCTGTAGGTG	GTGTATTAC	ATCTGTAGGA	AAGGCGGTAC	ATCAGGTTTT	CGGTGGTGCC	1800
TTCAGATCAC	TATTCGGAGG	AATGTCTTGG	ATCACACAGG	GACTATTGGG	AGCGCTACTA	1860
CTATGGATGG	GAATCAACGC	GAGAGATAGA	AGTATCGCGC	TAACATTCCCT	AGCCGTTGGA	1920
GGTGTAATGC	CTGATGATGA	GCGGCCGC				1948
		↑	<i>Not I</i>			

2.4 Sequenz von E_{TMc}

<i>Pme I</i>						
↓						
10	20	30	40	50	60	
GTTTAAACAC	CATGGGAGGA	AAGACTGGAA	TCGCCGTAAT	GATTGGACTA	ATCGCGTCTG	60
TTGGAGCCGT	AACACTAAGT	AACTTCCAGG	GAAAAGTAAT	GATGACAGTA	AACGCGACAG	120
ATGTAACCTGA	TGTAATCACA	ATTCCGACAG	CGGCGGGAAA	GAACCTATGT	ATAGTTAGAG	180
CCATGGATGT	TGGTTACATG	TGTGATGATA	CAATCACATA	CGAATGTCCG	GTACTATCTG	240
CGGGAAACGA	TCCGGAAGAT	ATCGATTGTT	GGTGTACAAA	GTCTGCGGTA	TACGTTAGAT	300
ACGGAAGATG	TACAAAGACA	AGACATTCTA	GAAGAAGTAG	AAGATCACTA	ACAGTACAGA	360
CACATGGTGA	AAGTACACTA	GCGAACAAAA	AGGGAGCCTG	GATGGATTCT	ACAAAGGCCA	420
CAAGATACCT	AGTAAAGACA	GAATCTTGGA	TCTTGAGAAA	CCCGGGATAT	GCTCTAGTAG	480
CGGCTGTAAT	TGGATGGATG	CTAGGATCTA	ACACAATGCA	GAGAGTAGTA	TTCGTAGTAC	540
TACTACTATT	GGTAGCGCCA	GCGTACTCTT	TCAACTGTCT	AGGAATTGTT	AGTGGTGCCA	600
CATGGGTAGA	TTTGGTATTG	GAAGGTGATA	GTTGTGTAAC	AATCATGTCT	AAGGATAAGC	660
CGACAATCGA	TGTAAAGATG	ATGAACATGG	AAGCCGTAAA	CCTAGCGGAA	GTTAGAAGTT	720
ACTGTTACCT	AGCGACAGTA	TCTGATCTAT	CTACTAAGGC	GGCGTGTCAT	AAGAGAGCCG	780
ATCCGGCGTT	CGTATGTAGA	CAAGGTGTAG	TAGATAGAGG	ATGGGGAAAC	GGATGTGGAC	840
TATTCGGAAA	GGGATCTATC	GATACTTGTG	CGAAGTTCGC	GTGTAGTACT	AAGGCGATCG	900
GAAGAACAAT	CCTAAAAGAA	AACATCAAA	ACGAAGTAGC	GATCTTCGTA	CATGGACCGA	960
CAACAGTAGA	ATCTCATGGA	AACTACTCTA	CACAAGTTGG	AGCGACACAG	GCGGGAAGAT	1020
TTTCTATTAC	ACCAGCTGCG	CCGTCTTACA	CATTGAAGTT	GGGAGAATAC	GGTGAAGTAA	1080
CAGTAGATTG	TGAACCGAGA	AGTGAATCG	ATACAAACGC	GTACTACGTA	ATGACAGTAG	1140
GAACAAAGAC	ATTCCTAGTT	CATAGAGAAT	GGTTCATGGA	TCTAAACCTA	CCGTGGTCTA	1200
GTGCGGGATC	TACAGTTTGG	AGAAACAGAG	AAACACTAAT	GGAATTCGAA	GAACCGCATG	1260
CGACAAAGCA	GTCTGTAATT	GCGCTAGGAT	CTCAAGAAGG	TGCCCTACAT	CAAGCTCTAG	1320
CTGGTGCTAT	CCCGGTAGAA	TTCTCTAGTA	ACACAGTAAA	GCTAACATCT	GGACATCTAA	1380
AGTGTAGAGT	AAAGATGGAA	AAGCTAGTGT	ATGTTCTAAG	GCGTTCAGT	TCCTAGGAAC	1440
ACCAGCGGAT	ACAGGACATG	GAACAGTAGT	ACTAGAACTA	CAGTACACTG	GAACAGATGG	1500
ACCGTGTAAT	GTACCGATCT	CTTCTGTAGC	CTCTCTAAAC	GATCTAACAC	CAGTAGGAAG	1560
ATTGGTTACA	GTAAACCCGT	TCGTATCTGT	AGCGACAGCG	AATGCGAAGG	TACTAATCGA	1620
ACTAGAACCG	CCGTTCCGAG	ATTCTTACAT	CGTAGTAGGA	AGAGGTGAAC	AGCAGATCAA	1680
CCATCATTTG	CATAAGTCTG	GATCTTCTAT	CAAGGGTGCC	CAAAGACGTG	GGATTTTGGG	1740
TCTGTAGGTG	GTGTATTAC	ATCTGTAGGA	AAGGCGGTAC	ATCAGGTTTT	CGGTGGTGCC	1800
TTCAGATCAC	TATTCGGAGG	AATGTCTTGG	ATCACACAGG	GACTATTGGG	AGCGCTACTA	1860
CTATGGATGG	GAATCAACGC	GAGAGATAGA	AGTATCGCGC	TAACATTTCCT	AGCCGTTGGA	1920
GGTGTAATGC	CTGATGATGA	GCGGCCGC				1948
↑ <i>Not I</i>						

2.5 Sequenz von E_{TMV}

<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;"><i>Pme I</i></div> <div style="flex-grow: 1; border-bottom: 1px solid black; position: relative;"> <div style="position: absolute; left: 0; top: -10px; bottom: -10px; width: 10px; background: linear-gradient(to bottom, transparent 49%, black 49%, black 51%, transparent 51%);"></div> <div style="position: absolute; left: 10px; top: -10px; bottom: -10px; width: 10px; background: linear-gradient(to bottom, transparent 49%, black 49%, black 51%, transparent 51%);"></div> <div style="position: absolute; left: 20px; top: -10px; bottom: -10px; width: 10px; background: linear-gradient(to bottom, transparent 49%, black 49%, black 51%, transparent 51%);"></div> <div style="position: absolute; left: 30px; top: -10px; bottom: -10px; width: 10px; background: linear-gradient(to bottom, transparent 49%, black 49%, black 51%, transparent 51%);"></div> <div style="position: absolute; left: 40px; top: -10px; bottom: -10px; width: 10px; background: linear-gradient(to bottom, transparent 49%, black 49%, black 51%, transparent 51%);"></div> <div style="position: absolute; left: 50px; top: -10px; bottom: -10px; width: 10px; background: linear-gradient(to bottom, transparent 49%, black 49%, black 51%, transparent 51%);"></div> </div> </div>					
10	20	30	40	50	
GTTTAAACAC	CATGGTTGGA	TCTAACACAA	TGCAAAGAGT	AGTATTTGTT	50
GTAOACTACTAC	TATTGGTAGC	TCCAGCTTAT	TCTATGGCTT	CTTGGAGTCA	100
TCCACAATTT	GAAAAAATTG	AAGGTTTTAA	TTGTCTAGGA	ATGTCTAATA	150
GAGATTTTCT	AGAAGGTGTT	AGTGGTGCTA	CATGGGTAGA	CTTGGTATTG	200
GAAGGTGATA	GTTGTGTAAC	AATTATGTCT	AAAGATAAGC	CTACAATTGA	250
TGTAAAAATG	ATGAATATGG	AAGCTGTAAA	TCTAGCTGAA	GTTAGAAGTT	300
ACTGTTATCT	AGCTACAGTA	TCTGATCTAT	CTACAAAAGC	TGCTTGTCCA	350
ACAATGGGAG	AAGCTCATAA	TGATAAGAGA	GCTGATCCAG	CTTTTGT TTG	400
TAGACAAGGT	G TAGTAGATA	GAGGATGGGG	AAATGGATGT	GGACTATTTG	450
GAAAAGGATC	TATTGATACT	TGTGCTAAAT	TTGCTTGTAG	TACAAAAGCT	500
ATTGGAAGAA	CAATTCTAAA	AGAAAACATC	AAATATGAAG	TAGCTATCTT	550
TGTTTCATGGA	CCAACAACAG	TAGAATCTCA	TGGAAATTAT	TCTACACAAG	600
TTGGAGCTAC	ACAAGCTGGA	AGATTTTCTA	TTACACCAGC	TGCTCCATCT	650
TATACTTTGA	AATTGGGAGA	ATATGGTGAA	GTAACAGTAG	ATTGTGAACC	700
TAGAAGTGGA	ATTGATACAA	ATGCTTATTA	TGTAATGACA	G TAGGAACAA	750
AAACATTTCT	AGTTCATAGA	GAATGGTTTA	TGGATCTAAA	TCTACCATGG	800
TCTAGTGCTG	GATCTACAGT	TTGGAGAAAT	AGAGAAACAC	TAATGGAATT	850
TGAAGAACCA	CATGCTACAA	AACAATCTGT	AATTGCTCTA	GGATCTCAAG	900
AAGGTGCTCT	ACATCAAGCT	CTAGCTGGTG	CTATTCCAGT	AGAATTTTCT	950
TCTAATACTG	TAAAACTAAC	ATCTGGACAT	TTGAAATGTA	GAGTAAAAAT	1000
GGAAAAACTA	CAATTGAAAG	GTACTACTTA	TGGTGTATGT	TCTAAAGCTT	1050
TTAAGTTTCT	AGGAACACCA	GCTGATACAG	GACATGGAAC	AGTAGTACTA	1100
GAACTACAAT	ACACTGGAAC	AGATGGACCA	TGTAAAGTAC	CAATTTCTTC	1150
TGTAGCTTCT	CTAAATGATC	TAACACCAGT	AGGAAGATTG	GTTACAGTAA	1200
ATCCATTTGT	TTCTGTAGCT	ACTGCTAATG	CTAAAGTACT	AATTGAACTA	1250
GAACCACCAT	TTGGAGATTG	TTATATCGTA	G TAGGAAGAG	GTGAACAACA	1300
AATCAATCAT	CATTGGCATA	AGTCTGGATC	TTCTATTGGA	AAAGCTTTTA	1350
CAACAACATT	GAAAGGTGCT	CAAAGACTAG	CTGCTTTGGG	AGATACAGCT	1400
TGGGATTTTG	GATCTGTAGG	TGGTGT TTTT	ACATCTGTTG	GAAAAGCAGT	1450
ACATCAAGTA	TTTGGTGGTG	CTTTTAGAAT	ATTTGGTATT	ACCGCATTA	1500
TTATATTGTC	GGCCGTGGCA	ATATTCTGTA	TTACATATTA	TATATATTGA	1550
TGATGAGCGG	CCGC				1564

↑ *Not I*

3. Abbildungen

	Seite
Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum von repräsentativen WNV-Stämmen	12
Abbildung 2: Ausbreitung des WNV über die gesamte USA innerhalb weniger Jahre	14
Abbildung 3: Transmissionszyklus des WNV	16
Abbildung 4: WNV-Partikel	17
Abbildung 5: Schematischer Aufbau eines WNV-Virions	18
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Genomaufbaus von WNV	19
Abbildung 7: Replikationszyklus von WNV	20
Abbildung 8: Verlauf einer WNV-Enzephalitis beim Menschen	25
Abbildung 9: Cryo-EM Aufnahmen von Vacciniaviruspartikeln	32
Abbildung 10: Schematische Darstellung des MVA-Genoms	33
Abbildung 11: Schematische Darstellung der homologen Rekombination	51
Abbildung 12: Membrantransfer	56
Abbildung 13: Schematische Darstellung des MVA-Genoms als <i>HindIII</i> -Restriktionskarte und Lage der Deletion III	60
Abbildung 14: Ausgangsvektor pIIIH5RedK1L	61
Abbildung 15: Schematische Darstellungen der geplanten Konstrukte	62
Abbildung 16: Charakterisierung der Vektorplasmide mittels Restriktionsanalyse	63
Abbildung 17: Nachweis der transienten Expression von WNV E-Protein durch Westernblot-Analyse	64
Abbildung 18: Konstruktionsschema der rekombinanten MVA durch homologe Rekombination	64
Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen infizierter CEF-Zellen	65
Abbildung 20: PCR-Analyse viraler DNA einzelner Virusplaques von MVA-WNVprME ₁	66
Abbildung 21: PCR-Analysen sucrosegereinigter Viruspräparationen der finalen rekombinanten MVA	67
Abbildung 22: Amplifikation des C7L-Gens der finalen rekombinanten MVA	68
Abbildung 23: Mehrstufen-Wachstumsanalysen der rekombinanten MVA und MVA-Wildtyp auf fünf verschiedenen Zelllinien	69
Abbildung 24: WNV E-Proteinexpression nach Infektion von CEF-Zellen	71
Abbildung 25: WNV E-Proteinexpression nach Infektion von DF-1-Zellen	72
Abbildung 26: WNV E-Proteinexpression nach Infektion von HaCaT-Zellen	73
Abbildung 27: WNV E-Proteinexpression nach Infektion von HeLa-Zellen	74
Abbildung 28: WNV E-Proteinexpression nach Infektion von Pferdefibroblasten	75

Anhang.....	134
Abbildung 29: Deglykosylierung der rekombinanten E-Proteine	77
Abbildung 30: Konfokalmikroskopische Aufnahme einer mit MVA-WNVprME ₁ infizierten HeLa-Zelle	78
Abbildung 31: Konfokalmikroskopische Aufnahme von MVA-WNVE _{SOL} infizierten HeLa-Zellen	79
Abbildung 32: Konfokalmikroskopische Aufnahmen einer mit MVA-WNVE _{TMC} infizierten HeLa-Zelle	80
Abbildung 33: Konfokalmikroskopische Aufnahmen einer mit MVA-WNVE _{TMV} infizierten HeLa-Zelle	81
Abbildung 34: Detektion WNV-spezifischer Antikörper mittels ELISA	83
Abbildung 35: Darstellung des INF-γ-ELISpots nach Immunisierung mit den rekombinanten MVA	84

4. Tabellen

	Seite
Tabelle 1: Familie Flaviviridae: Genera und Seropgruppen bzw. Virusspezies	9
Tabelle 2: Anzahl der registrierten humanen WNV-Fälle in den USA von 1999 bis 2012	15
Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien sowie deren Bezugsquelle	35
Tabelle 4: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen sowie deren Zusammensetzung	36
Tabelle 5: Liste der verwendeten kommerziell erhältlichen Kits	37
Tabelle 6: Liste der verwendeten Nährmedien, der Zusätze und deren Hersteller	37
Tabelle 7: Liste der verwendeten Zelllinien und deren Kultivierungsmedium	38
Tabelle 8: Liste der verwendeten Plasmide, deren Zusammensetzung und deren Herkunft	39
Tabelle 9: Liste der verwendeten Enzyme sowie deren Bezugsquelle	40
Tabelle 10: Liste der verwendeten Viren und ihrer Charakteristika	40
Tabelle 11: Liste der verwendeten nicht-konjugierten Antikörper	41
Tabelle 12: Liste der verwendeten konjugierten Antikörper	41
Tabelle 13: Liste der verwendeten Primerpaare, deren Sequenz und Verwendungszweck	42
Tabelle 14: Liste der verwendeten Oligopeptide, deren Sequenz und Ursprung	42
Tabelle 15: Liste der verwendeten Mausstämme sowie deren Bezugsquelle	42
Tabelle 16: Liste des verwendeten Verbrauchsmaterials sowie dessen Bezugsquelle	43
Tabelle 17: Liste der verwendeten Software und deren Anbieter	43
Tabelle 18: Liste der verwendeten Geräte und deren Hersteller	43
Tabelle 19: Mischungsverhältnisse der Komponenten zur Herstellung von SDS-PAGE-Gelen	55

X. LEBENSLAUF

XI. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Gerd Sutter für die Möglichkeit diese Arbeit im Insitut durchzuführen, die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes und vor allem sein mir entgegengebrachtes Vertrauen.

Bei Frau Sylvia Jany, Astrid Freudenstein und Bärbel Köttgen bedanke ich mich recht herzlich für die nette Arbeitsatmosphäre im Labor sowie den ein und anderen guten Ratschlag.

Bei Frau Dr. Asisa Volz möchte ich mich für das Handling der Mausexperimente bedanken.

Herrn Andreas Blaschke danke ich für die nette Zusammenarbeit und Hilfe am Konfokalmikroskop.

Meinen Doktorandenkollegen Fei Song, Phil Price, Lino Torres, Marcus Müller, Eva Dittberner und Martina Resch, mit denen ich ein Büro teilen durfte, danke ich ganz herzlich für die anregenden Diskussionen und die sehr nette, freundschaftliche Atmosphäre.

Vielen Dank auch allen anderen Kollegen im Institut für die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft.

Die Studie wurde durch das EU-Forschungsprogramm VECTORIE (Vector-borne risks for Europe, FP7 Projekt-Nr. 261466) finanziert.