

Herstellung und Untersuchung rekombinanter
Modifizierter Vacciniaviren Ankara
zur Expression von Antigenen
des Felinen Panleukopenievirus

von Carina Maria Herzog

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Herstellung und Untersuchung rekombinanter
Modifizierter Vacciniaviren Ankara zur Expression
von Antigenen des Felinen Panleukopenievirus**

von Carina Maria Herzog

aus Spaichingen

München, 2016

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

Lehrstuhl für Virologie

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

Mitbetreuung durch: Dr. Robert Fux

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: 16. Juli 2016

"All our dreams can come true, if we have the courage to pursue them"

Walt Disney

Meinen Eltern,

die mich immer ermutigt haben, meine Träume zu verwirklichen

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG.....	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Karnivore Protoparvoviren	3
1.1.	Herkunft und Evolution.....	3
1.2.	Taxonomie.....	4
1.3.	Genomorganisation und virale Proteine	5
1.4.	Replikation.....	6
1.5.	Morphologie.....	7
1.6.	Hämagglutination (HA).....	9
1.7.	Epidemiologie und Pathogenese	10
1.8.	Klinik, Diagnose, Therapie	10
1.9.	Immunologie, Immunprophylaxe und maternale Antikörperlücke	12
2.	Modifiziertes Vacciniavirus Ankara (MVA) als Vektorvakzine	15
2.1.	Herkunft.....	15
2.2.	Taxonomie und Morphologie.....	15
2.3.	Genom, Replikation und Genexpression.....	16
2.4.	Virulenz und Verwendung als Vektorvakzine	17
2.5.	Immunmodulation	19
2.6.	MVA-Vektorimpfstoffe in der Veterinärmedizin.....	21
3.	Zielsetzung der Arbeit.....	24
III.	MATERIAL UND METHODEN	25
1.	Zelllinien und deren Nährmedien	25
2.	Zellkultur	26
2.1.	Kultivierung und Passagieren permanenter Zellkulturen	26
2.2.	Infektion von Zellen.....	26
3.	Viren	26
4.	Generierung des Vektorplasmids.....	27
4.1.	Amplifikation von Plasmid-DNA	30
4.1.1.	Transformation.....	30
4.1.2.	Kultivierung transformierter Bakterien	31
4.2.	Molekularbiologische Methoden.....	31
4.2.1.	DNA-Präparation	31

4.2.2.	Restriktionsverdau	31
4.2.3.	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	32
4.2.3.1.	Oligonukleotidprimer	33
4.2.4.	Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	34
4.2.5.	Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel	35
4.2.6.	Ligation	35
5.	Generierung rekombinanter Viren	36
5.1.	Transfektion/Infektion.....	37
5.2.	Isolierung rekombinanter Virusklone	38
5.3.	Herstellung eines Virusstocks	38
6.	Titerbestimmung einer MVA-Virus suspension	39
7.	Wachstumsanalysen.....	40
8.	Proteinnachweis	40
8.1.	Immunzytochemie.....	40
9.	Nachweis von Virus-ähnlichen Partikeln (VLP)	41
9.1.	Elektronenmikroskopie.....	41
10.	Hämagglutination.....	42
IV.	ERGEBNISSE.....	43
1.	Generierung rekombinanter MVA zur Expression der FPV-Strukturproteine VP1 und VP2.....	43
1.1.	Konstruktion der Vektorplasmide	44
1.2.	Charakterisierung der Plasmide	47
1.3.	Generierung und klonale Isolierung rekombinanter MVA-Viren.....	48
2.	Charakterisierung der rekombinanten MVA-Viren	50
2.1.	Nachweis der genetischen Stabilität	50
2.2.	Wachstumsanalyse.....	53
3.	Analyse der Expression rekombinanter Proteine.....	55
3.1.	Immunzytochemie.....	55
4.	Bildung Virus-ähnlicher Partikel (VLP)	58
5.	Hämagglutination (HA).....	61

V.	DISKUSSION	62
1.	Generierung und klonale Isolierung rekombinanter MVA-Viren zur Präsentation von FPV-Antigenen	62
2.	Charakterisierung der rekombinanten MVA-Konstrukte	65
3.	VLP-Formation, Hämagglutination und Beurteilung des Potentials als Vektorvakzine.....	68
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	73
VII.	SUMMARY	75
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	77
IX.	ANHANG	97
1.	Chemikalien und Nährmedien.....	97
2.	Puffer und Lösungen	98
3.	Antikörper und Konjugate	99
4.	Enzyme	99
5.	Geräte und Materialien	100
6.	Bakterien	100
7.	Sequenzen	101
8.	Abbildungsverzeichnis	104
9.	Tabellenverzeichnis	105
X.	DANKSAGUNG	106

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AS	Aminosäure
BBS	<i>borate buffered saline</i> (boratgepufferte Salzlösung)
bRSV	Bovines Respiratorisches Synzytialvirus
°C	Grad Celsius
CEF	<i>Chicken Embryo Fibroblasts</i> (Primäre Hühnerembryofibroblasten)
CPE	<i>cytopathic effect</i> (Zytopathischer Effekt)
CPV	Canines Parvovirus-2 und Subtypen
CRFK	<i>Crandell Rees Feline Kidney</i> (Feline Nierenzellen)
CVA	Chorioallantois Vacciniavirus Ankara
DF1	Hühnerembryofibroblastenzelllinie
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dsDNA	<i>double-stranded DNA</i> (Doppelstrang-DNA)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FPV	Felines Panleukopenievirus
FR	<i>Flank_III-1 bzw. Flank_I8R repeat</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GOI	<i>gene of interest</i> (Zielgensequenz)
h	<i>hours</i> (Stunden)
HA	Hämagglutination
HaCaT	Humane Keratinozyten
HAH	Hämagglutinationshemmungstest
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
IF	Immunfluoreszenz
IFAT	Indirekter Immunfluoreszenz-Antikörper-Test
IFN	Interferon

(k)bp	(Kilo)Basenpaare
KID50	Kulturinfektiöse Dosis 50
MAK	maternale Antikörper
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MERS-CoV	<i>Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus</i>
min	Minuten
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MVA	Modifiziertes Vacciniavirus Ankara
MVA-F/-H	MVA-Fusion/-Hämagglutinin
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEB	New England Biolabs GmbH
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
pfu	<i>plaque forming units</i> (Plaques bildenden Einheiten)
p.i.	<i>post infectionem</i>
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden
SNT	Serumneutralisationstest
ssDNA	<i>single-stranded DNA</i> (Einzelstrang-DNA)
Th1	T-Helfer-Zellen Typ 1
TNF	Tumornekrosefaktor
VAD	<i>virus adjusting diluent</i>
VLP	<i>virus-like particle(s)</i> (Virus-ähnliche(r) Partikel)
VP1/VP2	Strukturproteine des FPV

I. EINLEITUNG

Die Feline Panleukopenie, umgangssprachlich auch als Katzenseuche bezeichnet, gehört wohl zu den bedeutsamsten Erkrankungen der Katzen. Kennzeichnend für diese zyklische Infektionskrankheit sind die namensgebende Lymphopenie und Neutropenie, sowie schwere gastrointestinale Störungen, welche sich durch hochgradige Diarrhoe und Vomitus äußern.

In vielen Fällen endet das Krankheitsgeschehen tödlich. Obwohl der Erreger, das Feline Panleukopenievirus (FPV), ein Vertreter aus der Familie der *Parvoviridae*, bereits seit Anfang des 20. Jahrhunderts bekannt ist und die Immunprophylaxe durch Impfung mit attenuierten Lebendviren gängige Praxis ist, kommt es regelmäßig zu Ausbrüchen mit hohen Verlusten.

Ursächlich dafür sind zum einen die hohe Kontagiosität des FPV, die hohe Ausscheidungsrate infizierter Tiere sowie die hohe Tenazität der Parvoviren, die in der Umwelt monatelang infektiös bleiben können, wodurch indirekte Übertragungswege eine wichtige Rolle spielen. Zum anderen zeigen die angewandten Impfungen mit modifizierten Lebendvakzinen in der Praxis regelmäßig nicht den gewünschten Erfolg einer andauernden und belastbaren Immunität. Bei der Vakzinierung der besonders anfälligen Jungtiere ist zu beobachten, dass maternale Antikörper, die vor allem mit dem Kolostrum von der Kätzin auf die Welpen übertragen werden, das Impfvirus neutralisieren, bevor eine aktive Immunisierung induziert wurde. Daher besitzt tatsächlich ein gewisser Anteil regulär geimpfter Tiere keine belastbare FPV-spezifische Immunität. Aus diesem Grund rät das Paul-Ehrlich-Institut zur serologischen Antikörperbestimmung aller Katzen, um eine erfolgreiche Impfung zu garantieren. Diese Untersuchungen sind für den Katzenbesitzer aufwendig und kostspielig und werden in der Praxis kaum durchgeführt.

Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit ein Vakzinekandidat entwickelt werden, der eine sichere Immunisierung zu jedem Zeitpunkt des Lebens ermöglicht, insbesondere unter dem Einfluss vorhandener maternaler Antikörper. Als Basis für diese FPV-Vektorvakzine diene das Modifizierte Vacciniavirus Ankara (MVA). Dieses attenuierte Pockenvirus, das bereits mehrfach erfolgreich als rekombinanter Vektorimpfstoff verwendet wurde, vereint viele wichtige Eigenschaften für diesen Zweck. MVA ist in der Lage mehrere Fremdgene gleichzeitig stabil in seine DNA einzubauen und hohe Mengen an Fremdprotein zu exprimieren. Außerdem zeichnet es sich durch ein hervorragendes Sicherheitsprofil aus, da es sich in den meisten Säugetierzellen nicht

mehr replizieren kann, somit keinerlei Gefahr für den Impfling darstellt und unter Bedingungen der Biologischen Schutzstufe 1 behandelt werden kann. Auch die immunmodulierende Wirkung des MVA nimmt eine besondere Stellung ein, da ihm im Vergleich zu anderen Pockenviren viele Immunevasionsfaktoren fehlen und somit eine stärkere Immunantwort induziert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere rekombinante MVA, die die Strukturproteine VP1 bzw. VP2 des FPV exprimieren, hergestellt und im Hinblick auf deren Verwendung als Vakzineandidaten charakterisiert.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Karnivore Protoparvoviren

1.1. Herkunft und Evolution

Lebensbedrohliche Durchfallerkrankungen bei Katzen sind schon seit Anfang des letzten Jahrhunderts bekannt und beschrieben. Die ersten dokumentierten Untersuchungen zur Übertragung vermutlich viral bedingter, oftmals tödlich endender Durchfallerkrankungen bei Katzen führten Verge und Cristoforoni 1928 durch (Verge & Cristoforoni, 1928).

Ihre Ergebnisse nahmen Hindle und Finlay 1932 zum Anlass, weitere Infektionsversuche an Katzen durchzuführen (Hindle & Findlay, 1932). Dabei kamen sie zu dem Schluss, dass es sich bei dem Erreger um ein Virus handeln müsse. Doch gingen sie damals davon aus, dass sie es mit einem feline Staupevirus („*feline distemper*“) zu tun hätten. Mit diesem Begriff wird die Erkrankung im englischen Sprachgebrauch bis heute noch bezeichnet.

Die erste erfolgreiche Isolation und Anzucht des Felinen Parvovirus in der Zellkultur gelang Johnson im Jahre 1964 (Johnson, 1964). Er verwendete auch als erstes den bis heute im Deutschen gebräuchlichen Namen „Felines Panleukopenievirus“ (FPV).

Kurze Zeit später wurden 1967 erstmals Parvovirus-ähnliche Erreger bei Militärhunden nachgewiesen. Dabei handelte es sich um das *Minute Virus of Canines* (MVC), damals auch als Canines Parvovirus-1 (CPV-1) bezeichnet, das auch im Kot von gesunden Hunden häufig nachzuweisen ist (Binn et al., 1970).

1977 wurde bei Hundewelpen mit nicht-hämorrhagischem Durchfall ein weiteres Parvovirus entdeckt (Eugster & Nairn, 1977). 1978 trat dieses pandemisch in den USA (Appel et al., 1979), Australien (Kelly, 1978), Kanada (Thomson & Gagnon, 1978) und schließlich auch in Europa auf (Burtonboy et al., 1979; Tratschin et al., 1982).

Dabei handelte es sich um das Canine Parvovirus-2 (CPV-2). Das CPV-2 ist dem FPV sehr ähnlich: über 98% der Genomsequenz der beiden Viren sind identisch (Parrish, 1994). Mutationen an drei Aminosäuren (AS 93, 103, 323) des Virusproteins 2 (VP2) erlaubten es diesem neu aufgetretenen Parvovirus canine Wirtszellen zu infizieren (Chang et al., 1992). Viele Jahre lang vermutete man, dass das CPV-2

direkt aus dem FPV entstanden ist (Parrish, 1990; Shackelton et al., 2005). Neue phylogenetische Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass es ein gemeinsames Ursprungsvirus geben könnte, aus dem sich FPV und CPV parallel entwickelten (Allison et al., 2013). Allison et al. konnten zeigen, dass durch Passagierung von CPV auf Nerzzellen FPV-spezifische Mutationen entstehen (Allison et al., 2014). Solche intermediären Viren wurden auch schon in Rotfüchsen entdeckt (Truyen et al., 1998). Somit könnten Füchse oder andere Wildkarnivoren ein Bindeglied zwischen den Wirten Hund und Katze darstellen.

1980 trat eine Variante des CPV-2, das CVP-2a, auf (Parrish et al., 1985) und 1984 wurde das CPV-2b entdeckt. Die beiden Subtypen weisen Mutationen an wenigen Aminosäuren des Kapsidproteins VP2 auf (Parrish et al., 1991). Im Gegensatz zu ihrem Vorgänger CPV-2 sind die neuen Varianten in der Lage, auch Katzen effektiv zu infizieren. Durch diesen bedeutenden Vorteil setzten sich CPV-2a und -2b weltweit durch und verdrängten das ursprüngliche CPV-2 (Truyen et al., 1996).

2002 wurde ein dritter Subtyp entdeckt: das CPV-2c (Ikeda Y. et al., 2002; Martella et al., 2004), welcher sich in nur einer Aminosäure (AS 426) des VP2 von CVP-2b unterscheidet, aber auch bei adulten, regelmäßig geimpften Hunden schwere Erkrankungsverläufe hervorrufen kann (Decaro et al., 2008; Decaro et al., 2009). Als Überbegriff für das CPV-2 und alle seine Subtypen wird hier die Abkürzung CPV für Canines Parvovirus verwendet.

Allison et al. demonstrierten die ausgeprägte Anpassungsfähigkeit von FPV und CPV an verschiedene Wirtssysteme. Sie konnten zeigen, dass in karnivoren Parvoviren sogar durch *in vitro*-Passage in verschiedenen Zelllinien Mutationen in der Aminosäuresequenz der Kapsidproteine hervorgerufen werden, wodurch Replikationsvorteile gegenüber dem Ursprungsvirus entstehen (Allison et al., 2014). Vor allem die AS 300 unterliegt einer großen Varianz und scheint einen Einfluss auf die Bindungskapazität am Transferrinrezeptor und somit auf die Wirtsspezifität zu haben (Allison et al., 2016).

1.2. Taxonomie

Zur Familie der Parvoviridae gehören zwei große Unterfamilien: die Densovirinae, deren Vertretern Arthropoden als Wirte dienen, und die Parvovirinae. Zu den Parvovirinae zählt das Genus Dependoparvoviren, deren Replikation von einer Koinfektion mit Adenoviren abhängig ist, sowie weitere sieben Genera, deren Vertreter sich autonom replizieren. Das Genus Protoparvovirus umfasst momentan

vier Spezies sowie viele noch nicht klassifizierte Virusisolate. Die Spezies *Carnivore Protoparvovirus 1* beinhaltet sowohl das Feline Panleukopenie Virus als auch das Canine Parvovirus. Andere Parvoviren dieser Art sind das Nerz-Enteritis-Virus („*Mink Enteritis Virus*“) und das Parvovirus der Waschbären („*Raccoon Parvovirus*“) und Polarfüchse („*Blue Fox Parvovirus*“).

1.3. Genomorganisation und virale Proteine

Das Genom des CPV bzw. FPV umfasst ca. 5000 Nukleotide und besteht aus einzelsträngiger linearer DNA (ssDNA) mit negativer Polarität (McMaster et al., 1981; Cotmore & Tattersall, 1987).

Das Karnivore Protoparvovirus 1 besitzt drei Strukturproteine (VP1, VP2 und VP3) und zwei Nicht-Strukturproteine (NS1 und NS2). Die Proteine werden von zwei offenen Leserahmen (*Open Reading Frames*, ORF) codiert, wobei der ORF am 3' Ende (bezogen auf den (-)-ssDNA-Strang) für die Nichtstrukturproteine (unter Kontrolle des Promotors P4) und der ORF am 5' Ende für die Kapsidproteine (unter Kontrolle des Promotors P38) codiert (Reed et al., 1988). Die mRNAs für die Strukturproteine VP1 und VP2 werden vom selben ORF transkribiert. Durch „alternatives Spleißen“ der prä-mRNA wird eine 429 bp Sequenz am 3' Ende deletiert, so dass das translatierte VP2 143 Aminosäuren kleiner ist als das VP1. Der beim VP2 fehlende N-terminale Proteinanteil besitzt beim VP1 eine Phospholipase A2-Aktivität, die für die Infektion und den Eintritt in die Zelle wichtig ist (Zádori et al., 2001; Vihinen-Ranta et al., 2002). Der C-terminale Teil des VP1 und das VP2 sind identisch (Jongeneel et al., 1986).

VP1 und VP2 besitzen eine Kernstruktur, bei der acht antiparallele β -Faltblatt-Stränge fassförmig durch Schlaufen miteinander verbunden sind. Diese so genannten „Loops“ stellen den Großteil der Oberflächenstruktur des Kapsids dar. Hier finden sich auch wichtige Epitope (Tsao et al., 1991).

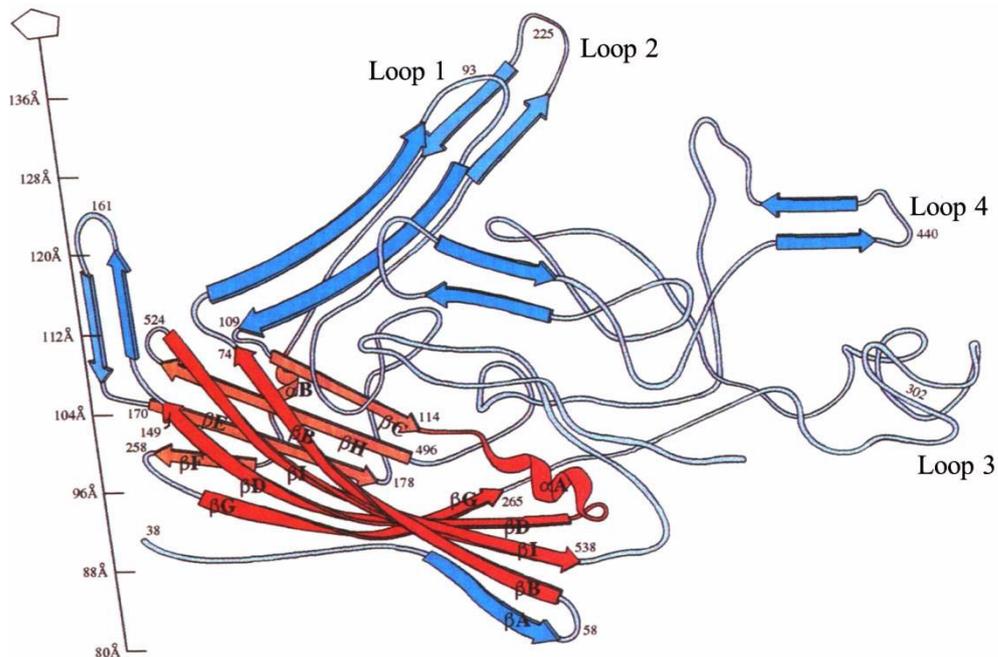


Abbildung 1: Schematische Zeichnung der VP2-Polypeptid Topologie. In Rot sind die acht anti-parallelen β -Stränge dargestellt. Diese sind durch vier Loops miteinander verbunden, welche wichtige Epitope des FPV bzw. CPV-Kapsids bilden. Mit Genehmigung aus Tsao et al., 1991

Das VP3 entsteht durch Abspaltung von 15-20 Aminosäuren am N-terminalen Ende des VP2 und ist nur in DNA-haltigen Kapsiden zu finden (Weichert et al., 1998).

Auch die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2 entstehen durch alternatives Spleißen eines ORFs (3' Ende). Als essentielles Nichtstrukturprotein der Protoparvoviren erfüllt das NS1 wichtige Funktionen (Rhode, 1989). Zum einen konnte im CPV nachgewiesen werden, dass es für Zytotoxizität verantwortlich ist, indem es eine Caspase-3-abhängige Apoptose der Wirtszellen hervorruft (Saxena et al., 2013). Außerdem spielt es eine essentielle Rolle bei der DNA-Replikation, worauf im Abschnitt 1.4 näher eingegangen wird. Die Funktion des NS2 ist bei karnivoren Parvoviren noch nicht ausreichend geklärt. Laut Parrish et al. ist das NS2 für den Zusammenbau des Viruskapsids (Assembly) und den Transport zum Nukleus verantwortlich. Ob es eine Rolle in der Replikation spielt, ist umstritten (Parrish, 2010).

1.4. Replikation

Nach Infektion der Wirtszelle entlässt ein Protoparvovirus seine Einzelstrang-DNA im Nukleus. Die virale Replikation ist abhängig von den Zellfunktionen, die in der S-Phase bzw. der frühen G2-Phase des Zellzyklus stattfinden. Daraus ergibt sich die Abhängigkeit der Virusreplikation von mitotisch aktiven Geweben bzw. Zellen. Da das

Virus keine eigene Polymerase besitzt, benötigen Parvoviren die zelluläre DNA-Polymerase, um den viralen DNA-Einzelstrang (ssDNA) zu einer Doppelstrang-DNA (dsDNA) aufzufüllen. Der Mechanismus der Replikation basiert auf dem „*rolling-hairpin*“-Prinzip. Dabei bildet sich am 3'-Ende sowie am 5'-Ende durch repetitive komplementäre Sequenzen („*inverted terminal repeats*“) eine Haarnadelstruktur, die der zellulären DNA-Polymerase als Ansatzstelle dient (Cotmore & Tattersall, 1995). Die entstandene dsDNA dient als Matrize für die Transkription der viralen mRNA der Nichtstrukturproteingene, der die Translation von NS1 bzw. NS2 folgt. Das so entstandene NS1 fungiert als Transaktivator, so dass über den viralen Promotor P38 die Transkription der Strukturproteingene aktiviert wird (Rhode, 1985; Hanson & Rhode, 1991; Nüesch et al., 1992; Storgaard et al., 1993; Krady & Ward, 1995). Außerdem besitzt das NS1 eine sogenannte Nickasefunktion, die ihm ermöglicht an einer spezifischen Sequenz am rechten Genomende („*Origin of Replication Right*“, OriR) und einer am linken Genomende (OriL) einen Einzelstrangbruch hervorzurufen (Cotmore & Tattersall, 1994; Cotmore et al., 1995; Nüesch et al., 1995; Baldauf et al., 1997; Christensen et al., 2001). Damit kann das gesamte Genom zu einem Doppelstrang-Dimer-Molekül aufgefüllt werden. Um nun einzelne ssDNA-Moleküle negativer und positiver Polarität zu synthetisieren, agiert das NS1 als Helikase und entwindet die Einzelstränge der dsDNA, um der DNA-Polymerase eine Ansatzstelle zu präsentieren (Christensen et al., 1995). Die so entstandenen ssDNA-Stränge mit positiver Polarität können als Matrize für die weitere Replikation verwendet werden, während die Negativstränge in ein Kapsid verpackt und aus der Wirtszelle freigesetzt werden (Cotmore & Tattersall, 1995). Auch bei der Einschleusung der DNA in vorgeformte Kapside wird eine Beteiligung des NS1 diskutiert (Cotmore & Tattersall, 1995).

1.5. Morphologie

Das unbehüllte Karnivore Protoparvovirus 1 gehört mit einem Durchmesser von 20-25 nm zu den kleinsten bekannten Viren (Truyen, 2015). Das ikosaedrische Kapsid wurde mittels Röntgenstrukturanalyse genauer untersucht (Tsao et al., 1991). Es besteht aus 60 Kapsomeren, wobei es sich zu ca. 90 % um VP2 und zu ca. 10 % um VP1 handelt. Wie jedes Ikosaeder hat das Kapsid drei Symmetrieachsen: die 2x, 3x und 5x-Achse. Die 5x-Achse wird von einer zylindrischen Struktur begleitet, die an der Oberfläche von einer zirkulären Vertiefung, dem sogenannten „Canyon“, umgeben ist. In der 2x-Achse ist eine Eindellung zu finden („*Dimple*“) und die 3x-Achse weist eine

Erhebung mit mehreren Schlaufen („*Loops*“) auf, die auch als „*Threefold-Spike*“ bezeichnet wird. Sie ist wichtig als Bindungsstelle für neutralisierende Antikörper (Strasheim et al., 1994; Nelson et al., 2007) und für die Wirtsspezifität (Parrish, 1991; Chang et al., 1992).

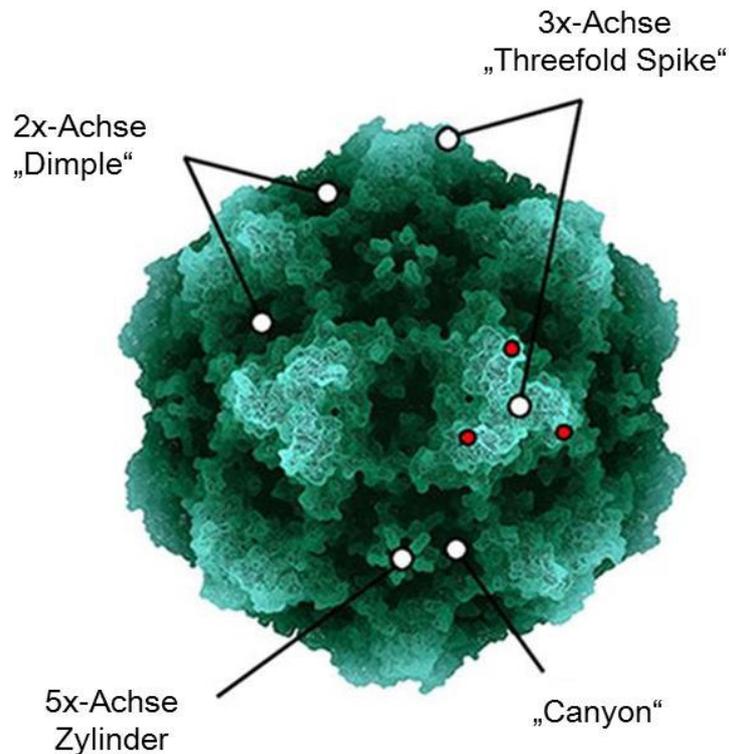


Abbildung 2: Oberfläche des CPV-Kapsids, dargestellt mittels Röntgenkristallographie. In der 5x-Achse verläuft eine zylindrische Struktur, die vom sogenannten „*Canyon*“ umgeben wird. Die 2x-Achse bildet eine Vertiefung („*Dimple*“). Die „*Threefold Spikes*“ der 3x-Achse, verbunden durch einen Grat („*Shoulder*“) stellen die antigenen Oberflächenstrukturen des Virus dar. Modifiziert nach Allison et al. 2016, mit Genehmigung.

Im Transmissionselektronenmikroskop lässt sich das Kapsid der Parvoviren ebenfalls gut erkennen. Hier fällt auf, dass bei der Negativ-Kontrastierung einige Kapside durchlässig für die verwendeten Kontrastmittel (=Schwermetallsalze) sind und andere nicht. Dies zeigt den Unterschied zwischen vollständigen (hellen) und unvollständigen (dunklen) Kapsiden (Burtonboy et al., 1979; Paradiso et al., 1982).

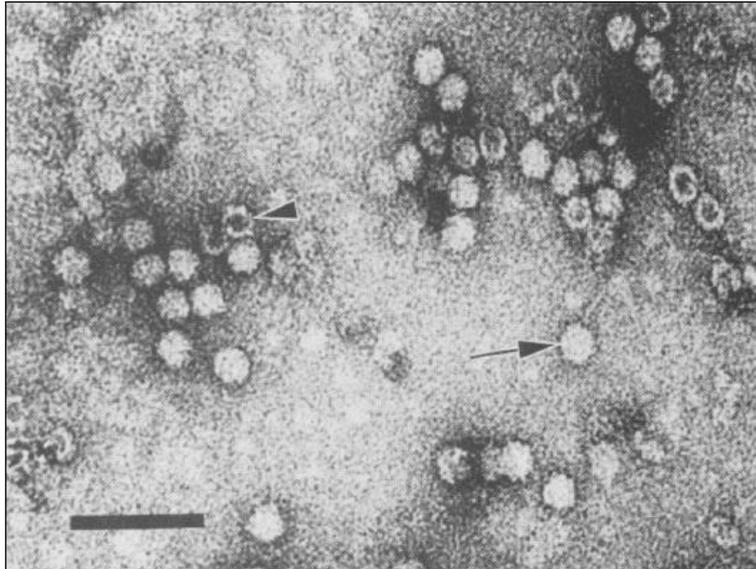


Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme von CPV-Virionen. Negativkontrastierung mit Uranylacetat. Der Pfeil zeigt auf ein (für das Kontrastmittel) undurchlässiges Kapsid, während die Pfeilspitze auf ein durchlässiges Kapsid deutet. Der eingezeichnete Maßstabsbalken entspricht 100 nm. Mit Genehmigung aus Paradiso et al., 1982

1.6. Hämagglutination (HA)

Wie viele andere Parvoviren ist auch das Feline Parvovirus in der Lage Erythrozyten bestimmter Spezies zu hämagglutinieren. Hierzu zählen v.a. Erythrozyten von Schweinen, Rhesusaffen und grünen Meerkatzen; in geringerem Umfang auch die von Hunden, Spitzmäusen, Pferden, Katzen und Goldhamstern (Senda et al., 1988). Im Gegensatz zum CPV, welches Erythrozyten in einem pH-Bereich zwischen 5,8 und 7,4 agglutiniert, ist die Hämagglutination des FPV stark pH-abhängig (pH 6,4-6,8) (Carmichael et al., 1980; Parrish et al., 1988). Dieser Unterschied beruht lediglich auf zwei Aminosäuren: AS 323 und 375 des VP2 (Chang et al., 1992). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Mutation der AS 377 im VP2 des CPV eine Hämagglutination vollständig verhindert. Die Hämagglutination des CPV scheint keinen Einfluss auf die Infektiosität des Virus zu haben, da auch eine nicht-hämagglutinierende Mutante (AS 377 Arg→Lys) in der Zellkultur gleiche Phänotypen wie das nicht-mutierte CPV ausbildete. Alle drei Aminosäuren befinden sich im „Dimple“ der 2x-Achse (Barbis et al., 1992). Neben der pH-Abhängigkeit gibt es auch deutliche Unterschiede in der Temperaturabhängigkeit der Hämagglutination zwischen FPV und CPV. FPV hämagglutiniert deutlich besser bei 4 °C, während neuere Varianten des CPV eher temperaturunabhängig sind und bei 37 °C ähnlich hohe HA-Titer wie bei 4 °C erzielen. Interessanterweise sind die ersten CPV-Isolate

deutlich temperaturabhängiger als die neueren (Senda et al., 1988). Als Bindungsstelle an den Erythrozyten werden N-Acetylneuraminsäure-Reste vermutet, die mit den Aminosäuren im „Dimple“ interagieren (Barbis et al., 1992).

1.7. Epidemiologie und Pathogenese

Parvoviren sind bekannt für ihre hohe Tenazität. Ihre Infektiosität bleibt in der Umwelt über 5-12 Monate erhalten, weswegen indirekte Infektionen eine wichtige Rolle für die Epidemiologie des Virus spielen (Gordon & Angrick, 1986). Dies bedeutet, dass ein Wirtstier auch durch kontaminierte Kleidung, Schuhsohlen oder Einstreu infiziert werden kann. Außerdem sind die Viruspartikel sehr hitze- und kältetolerant (Kilham & Margolis, 1966; Gordon & Angrick, 1986). Durch hohe Exkretionsraten (bis zu 10^9 KID₅₀ pro Gramm Kot) (Truyen, 2015) und starke Toleranz gegenüber Desinfektionsmitteln kann, gerade in Einrichtungen, in denen viele Tiere gemeinsam gehalten werden, eine hoher Infektionsdruck erreicht werden (Studdert & Peterson, 1973). Hinzu kommt eine starke Kontagiosität, da bereits 10^3 KID₅₀ für eine Infektion ausreichen können. Theoretisch genügt somit die Virusmenge in einem Gramm Kot eines stark virusausscheidenden Tieres, um eine Million weitere Hunde oder Katzen zu infizieren (Truyen, 2015).

Die Infektion erfolgt fäkal-oral und breitet sich über die Schleimhäute zuerst in das lymphatische Gewebe des Nasen-Rachen-Raums aus. In der dann folgenden virämischen Phase infiziert das Virus die Zellen der Manifestationsorgane, die alle eine gesteigerte mitotische Aktivität aufweisen (Csiza et al., 1971; Cotmore & Tattersall, 1987). Dazu bindet es an den Transferrinrezeptor Typ 1 (Parker et al., 2001; Hueffer et al., 2003) und wird durch Clathrin-vermittelte Endozytose aufgenommen (Parker & Parrish, 2000). Da der Transferrinrezeptor besonders auf metabolisch aktiven Zellen exprimiert wird, zeichnen sich die Zielzellen neben der hohen mitotischen auch durch eine gesteigerte metabolische Aktivität aus.

Primäre Zielzellen sind daher Enterozyten und myeloide Zellen. Auch fetales Gewebe, Myokardzellen bei Welpen und lymphatisches Gewebe werden bevorzugt infiziert (Robinson et al., 1980; Meunier et al., 1985; Decaro et al., 2007).

1.8. Klinik, Diagnose, Therapie

Infektionen mit dem FPV bzw. CPV können, von einer subklinischen Erkrankung bis hin zum perakuten Todesfall, sehr unterschiedlich verlaufen. Wenn das Tier eine

Infektion überlebt, wird der Erreger in der Regel vollständig eliminiert und eine langanhaltende Immunität gegen das Pathogen aufgebaut. Virale Dauerausscheider sind nicht bekannt, gewöhnlich endet die Virusausscheidung nach einigen Tagen oder Wochen (Truyen, 2015).

Erwachsene Katzen leiden durch die lytische Infektion des Knochenmarks am häufigsten an einer Panleukopenie, die auf einer virusbedingten absoluten Lymphopenie und Neutropenie beruht (Larsen et al., 1976). Sie geht oft mit wässriger bis hämorrhagischer Diarrhoe, Vomitus, Apathie, Anorexie, Fieber und Dehydratation einher (Addie et al., 1996).

Da das FPV in der Lage ist, die Plazentaschranke zu überwinden, können Infektionen in der frühen Trächtigkeit zu Abort, Resorption und Mumienbildung der infizierten Feten führen, während eine spätere Infektion das neuronale Gewebe der Katzenwelpen schädigen und somit zerebelläre Hypoplasie und postnatale Ataxie zur Folge haben kann (Kilham & Margolis, 1966; Csiza et al., 1971). Diese Katzenwelpen fallen durch Bewegungs- und Koordinationsstörungen und ein breites, steifes, tapsiges Gangbild auf.

Hunde zeigen prinzipiell ähnliche Symptome wie adulte Katzen, doch steht bei ihnen meist eine Enteritis mit starker hämorrhagischer Diarrhoe im Vordergrund. Durch die damit verbundene Zerstörung des Darmepithels und den folgenden Zusammenbruch der Blut-Darm-Schranke können bakterielle Erreger oder Toxine in den Blutkreislauf eindringen und eine Septikämie verursachen. Zusätzlich führt der enorme Flüssigkeitsverlust nicht selten zu einem Schockgeschehen.

Bei Welpen ohne maternale Immunität, die in den ersten acht Lebenswochen infiziert werden, kann eine Myokarditis entstehen (Lenghaus & Studdert, 1984), die heutzutage jedoch aufgrund von Impfung des Muttertiers und dem Transfer maternalen Antikörper kaum noch auftritt.

Diagnostisch ist nur der direkte Erregernachweis sinnvoll, da aufgrund der standardisierten Impfung und des ubiquitären Vorkommens des Erregers der Großteil der Tiere seropositiv ist. In den meisten Fällen sind Kotproben als Untersuchungsmaterial bestens geeignet, während bei Katzen, die symptomatisch lediglich eine Panleukopenie zeigen, auch der Virusnachweis im Vollblut nötig sein kann.

Als diagnostische Möglichkeiten stehen, neben diversen auf Immunchromatographie basierenden Schnelltests, die Virusisolierung, Elektronenmikroskopie, Antigen-ELISA, Hämagglutination und der Nukleinsäurenachweis mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Verfügung. Dabei stellt die real-time PCR die Methode mit der höchsten

Spezifität und Sensitivität dar (Schunck et al., 1995; Decaro et al., 2005a; Desario et al., 2005). In der Pathohistologie stellt sich eine typische Degeneration der Lieberkühnschen Krypten mit intranukleären Einschlusskörperchen in den Enterozyten dar. Eine immunhistochemische, virusspezifische Färbung kann zur Befundabsicherung durchgeführt werden.

Zum Antikörpernachweis (z.B. zur Feststellung des Impftiters oder des maternalen Antikörperspiegels) können der Hämagglutinationshemmungstest (HAH), Serumneutralisationstest (SNT), ELISA oder der Indirekte Immunfluoreszenz-Antikörper-Test (IFAT) durchgeführt werden.

Die Therapie einer Parvovirus-Erkrankung spielt in der Praxis eine wichtige Rolle, da die Letalität der Erkrankung bei unbehandelten Tieren mit 50-80% sehr hoch eingeschätzt wird. Mit intensiver Behandlung kann man diese auf 20% senken (Truyen, 2015). Eine Parvovirose wird vor allem symptomatisch mit Flüssigkeitstherapie und Elektrolytausgleich therapiert. Bei hämorrhagischer Enteritis ist ein Antibiotikum angezeigt, da Darmbakterien eine Septikämie auslösen können (Truyen et al., 2009). Antiviral können ω -Interferon (Mochizuki et al., 1994; Minagawa et al., 1999; Martin et al., 2002; De Mari et al., 2003) und eine passive Immunisierung (Meunier et al., 1985; Macintire et al., 1999) durch Immunsereen angewendet werden. Diese zeigen jedoch nur im frühen Stadium der Erkrankung, bevor alle Manifestationsorgane betroffen sind, Wirkung.

1.9. Immunologie, Immunprophylaxe und maternale Antikörperlücke

Eine protektive Immunität gegen eine Infektion mit FPV bzw. CPV basiert zum großen Teil auf der Bildung von neutralisierenden Antikörpern, die bereits fünf Tage nach der Infektion nachweisbar sind (Pollock, 1982). Dazu ist anzumerken, dass nur wenige Daten zur zellulären Immunität gegen karnivore Parvoviren vorliegen (Rimmelzwaan et al., 1990). Tiere, die einmal eine Infektion überstanden haben, genießen wahrscheinlich lebenslangen Schutz vor einer Reinfektion.

Die antigene Struktur des karnivoren Parvoviruskapsids wurde mittels monoklonaler Antikörper und derer Bindungsstellen analysiert. Es konnte festgestellt werden, dass die Antigenepitope fast 70 Prozent der Kapsidoberfläche umfassen (Hafenstein et al., 2009). Es gibt zwei spezifische Regionen, die den Großteil der antigenetischen Variation des Kapsids bestimmen. Eines befindet sich auf der Spitze des „*Threefold Spikes*“ und eines direkt daneben, auf der sogenannten „*Shoulder*“ (Strassheim et al.,

1994) (siehe Abbildung 2).

Alle in Deutschland erhältlichen Vakzinen gegen FPV und CPV basieren im Allgemeinen auf avirulenten, aber zur Replikation fähigen Virusstämmen (attenuierte Lebendimpfstoffe), deren Wirksamkeit sich gegenüber den Totvakzinen durchgesetzt hat (Digangi et al., 2012; Jakel et al., 2012; Truyen & Parrish, 2013). Die Katzenimpfstoffe enthalten FPV und die Hundevakzinen meist das vermutlich ausgestorbene CPV-2. Es gibt nur wenige in Deutschland zugelassene Hundepfimpfstoffe, die die neuen Varianten CPV-2a/b beinhalten, zum aktuellen Zeitpunkt besitzt keiner die Komponente CPV-2c. In verschiedenen Studien konnte festgestellt werden, dass zwischen den drei neuen Subtypen und dem Ursprungsvirus CPV-2 eine gewisse Kreuzneutralisation besteht (Pratelli et al., 2001; Truyen, 2006; Glover et al., 2012). Jedoch waren deutliche Unterschiede im neutralisierenden Antikörpertiter zwischen heterologem und homologem Virus erkennbar (Pratelli et al., 2001; Truyen, 2006). Grundsätzlich gehören FPV und CPV laut der „World Small Animal Veterinary Association“ (WSAVA) und der „Ständigen Impfkommission Veterinär“ (StIKo Vet) zu den sogenannten Core-Vakzinen und somit sollte jeder Hund und jede Katze gegen Parvovirose geimpft werden (Ständige Impfkommission Vet, 2009; Day et al., 2010).

Durch das Problem der maternalen Antikörperlücke ergibt sich die Situation, dass viele Tiere trotz durchgeführter Vakzinierung mit herkömmlichen Impfstoffen keinen ausreichenden Impfschutz aufbauen können. Seropositive Muttertiere übertragen mit dem Kolostrum neutralisierende FPV/CPV-Antikörper auf ihre Welpen, wodurch diese in den ersten Lebenswochen vor einer Infektion geschützt sind (Scott et al., 1970; Chappuis, 1998). Direkt nach der Geburt beträgt der Serumantikörpergehalt im Welpen etwa 1% des Titers der Mutter. Bereits nach 24 h Kolostrumfütterung steigt der Anteil auf 72% (Scott et al., 1970). Die kolostralen FPV-Antikörper schützen allerdings nicht nur vor einer Feldvirusinfektion, sondern inhibieren ebenso attenuierte Lebendimpfstoffe. Die maternalen Antikörper (MAK) werden bei Hund und Katze mit einer geschätzten Halbwertszeit von ca. 9 Tagen abgebaut (Scott et al., 1970; Jakel et al., 2012), so dass die Welpen individuell unterschiedlich nach mehreren Wochen wieder empfänglich für die Virusinfektion werden. Serumantikörpertiter > 1:80 (HAH) wirken in den meisten Fällen protektiv gegen Feldvirusinfektionen (Decaro et al., 2005b). Allerdings können niedrigere Titer bis zu 1:10 (HAH) immer noch störend auf die aktive Immunisierung wirken (Scott et al., 1970; Pollock & Carmichael, 1982; Chappuis, 1998; Jakel et al., 2012). Diese Zeitspanne in der die passive Immunität nicht mehr vor der Infektion schützt, aber immer noch eine aktive Immunisierung durch Impfung verhindert wird, wird als „maternale Antikörperlücke“ oder

„immunologische Lücke“ bezeichnet. Verschiedene Faktoren spielen bei der Länge und dem Zeitpunkt dieser kritischen Phase eine Rolle. Der Antikörpertiter der Mutter und die Menge des aufgenommenen Kolostrums sind dabei besonders hervorzuheben (Greene & Addie, 2006). Jakel et al. konnten zeigen, dass MAK bei entsprechend hohem Titer in der Mutter auch deutlich über die 16. Woche hinaus noch im Katzenwelpen vorhanden sind und so eine Impfung beeinträchtigen können. Sie fanden heraus, dass nach zwei Impfungen im Alter von 8 und 12 Wochen nur 45% der getesteten Tiere Impftiter (definiert als mindestens vierfacher Titeranstieg) aufwiesen. Auch nach einer dritten Impfung in der 16. Woche blieben noch 36,7% ungeschützt. Selbst in der 20. Woche konnten noch bei einzelnen Welpen MAK nachgewiesen werden (Jakel et al., 2012). Auch andere Autoren machten die Beobachtung, dass nach zweimaliger Impfung nach 12-15 Wochen bei einem gewissen Anteil an Katzen keine Serokonversion erfolgte (Dawson et al., 2001; Poulet, 2007; Digangi et al., 2012). Aus diesem Grund wurden die Richtlinien für die Impfung von Katzenwelpen dahingehend geändert, dass nun eine Erstimpfung im Alter von 6 bzw. 8 Wochen empfohlen wird, die alle 3-4 Wochen bis zur 16.-20. Lebenswoche aufgefrischt werden soll (Ständige Impfkommission Vet, 2009; Scherk et al., 2013). Für Hunde gilt dasselbe Prinzip, hier soll die erste Impfung mit 8 Wochen stattfinden und dann alle 3-4 Wochen bis zur 16. Lebenswoche wiederholt werden (Ständige Impfkommission Vet, 2009; Day et al., 2010). Somit soll verhindert werden, dass das Tier zweimal eine aufgrund MAK nicht wirksame Impfung erhält und dann bis zur nächsten Impfung, ein Jahr später, schutzlos einer Infektion ausgeliefert ist. Jedoch bedeuten diese Impfschemata Stress für Besitzer und Tier und eine große finanzielle Belastung. Alternativen wie regelmäßige Serumkontrollen, um den richtigen Impfzeitpunkt zu bestimmen, bringen finanziell ebenfalls keine Vorteile, da die Antikörpertests zeit- und materialaufwendig sind und nur in Speziallabors durchgeführt werden können.

2. Modifiziertes Vacciniavirus Ankara (MVA) als Vektorvakzine

2.1. Herkunft

Fast zwei Jahrhunderte lang wurde das Vacciniavirus als Vakzine gegen die gefürchteten Menschenpocken (*small pox*) eingesetzt, welche von Variolaviren hervorgerufen wurden. Da die Impfung mit Vacciniaviren teilweise starke Nebenwirkungen und eine relativ hohe Komplikationsrate aufwies (Lane & Millar, 1969; Lane et al., 1969), wurde an der Tiermedizinischen Fakultät der LMU und der Bayerischen Impfanstalt in München in den 1960er Jahren das Modifizierte Vaccinia Virus Ankara (MVA) entwickelt. MVA geht auf den Dermovaccinia-Stamm Ankara (CVA) zurück, welcher durch mehr als 500 kontinuierliche Passagen in Hühnerembryofibroblasten (CEF) attenuiert wurde (Mayr & Munz, 1964; Mayr et al., 1975). Mit dem MVA stand nun ein Pockenimpfstoff zur Verfügung, der praktisch avirulent war und selbst bei immunsupprimierten Tieren keine Pathogenität zeigte. Bei etwa 120 000 Personen wurde MVA daher komplikationslos zur Erstimpfung gegen Pocken eingesetzt (Stickl et al., 1974; Mayr et al., 1978; Stittelaar et al., 2001). Durch ein flächendeckendes Eradikationsprogramm wurden die Menschenpocken, nach einem letzten Fall 1977, im Jahre 1980 von der WHO für ausgerottet erklärt (Fenner et al., 1988).

Zeitgleich entstand die Idee, Vacciniaviren anderweitig zu nutzen. Durch die Möglichkeit große Mengen an heterologer DNA in das Pockengenom einzufügen (Smith et al., 1983) und die bereits etablierte Nutzung als Impfstoff, eignen sich Vacciniaviren gut als rekombinante Expressionsvektoren (siehe 2.4) (Mackett et al., 1982; Panicali & Paoletti, 1982; Panicali et al., 1983; Mackett et al., 1984). Da jedoch vor allem bei immunsupprimierten Personen Komplikationen bei der Verwendung rekombinanter Vacciniaimpfstoffe auftreten könnten (Lane & Millar, 1969; Redfield et al., 1987), etablierten Sutter und Moss MVA als rekombinanten Vektorimpfstoff mit verbesserter Sicherheit (Sutter & Moss, 1992).

2.2. Taxonomie und Morphologie

Die Familie der Poxviridae teilt sich in zwei Unterfamilien: die Entomopoxvirinae (Insektenpockenviren) und die Chordopoxvirinae (Wirbeltierpockenviren). Zu letzteren zählt unter anderem die Gattung Orthopoxvirus, der die Variola-, Kuhpocken-, Ektromelie- und auch Vacciniaviren angehören. MVA gehört zu den Vacciniaviren, die nach Exposition im Wirt eine Kreuzimmunität mit allen anderen Orthopoxviren

hervorrufen (Mayr et al., 1975).

Das Virion der Pockenviren ist mit 200x300 nm eines der größten unter allen bekannten Viren und auch im Lichtmikroskop erkennbar. Es stellt sich quaderförmig dar und besitzt eine doppelte Lipoproteinmembran. Diese umgibt einen bikonkaven Viruskern („Core“), welcher den s-förmig gefalteten DNA-Doppelstrang und virale Enzyme enthält. Zwischen Membran und Kern sind zwei Lateralkörper eingelagert.

2.3. Genom, Replikation und Genexpression

Vacciniaviren haben, wie alle Pockenviren, ein lineares doppelsträngiges DNA-Genom mit einer Größe von 140 bis 300 kb (Kilobasenpaare). MVA besitzt mit ca. 178 kb im Vergleich zum Ursprungsvirus CVA (ca. 204,5 kb) ein deutlich kürzeres Genom, was zum größten Teil (ca. 24,5 kb von 26,5 kb) auf sechs Deletionen (Del I - Del VI) zurückzuführen ist, die sich in der rechten und linken terminalen Region befinden (siehe III. Abbildung 5) (Meisinger-Henschel et al., 2007). Die restlichen Nukleotid-Deletionen (2 kb) sind gleichmäßig im Genom verteilt. Somit verlor das CVA durch die kontinuierliche Passage in Hühnerembryofibroblasten ca. 13 % seines Genoms. Die Deletion III, bei der 3547 bp (ORF A51R bis A55R) verloren gingen, befindet sich im terminalen Genombereich in der rechten Genomhälfte (Meyer et al., 1991; Meisinger-Henschel et al., 2007). Mit den ORFs der Deletion III ging auch der späte Anteil des Promoters, der die Transkription des Hämagglutinin-Gens aktiviert, verloren. Aus diesem Grund ist das MVA im Gegensatz zum CVA nicht in der Lage Erythrozyten zu agglutinieren, obwohl in seinem Genom der ORF des Hämagglutinin-Gens vollständig intakt ist (Antoine et al., 1996).

Neben der Deletion III können auch andere natürliche Deletionsstellen und Genomabschnitte zwischen zwei offenen Leserahmen im MVA-Genom verwendet werden, um heterologe DNA-Sequenzen einzubauen, ohne die Genfunktionen des MVA selbst zu beeinträchtigen. Durch die vielen unterschiedlichen Deletions- und Insertionsstellen besteht zudem die Möglichkeit, mehrere Fremdgene gleichzeitig in das MVA-Genom einzubauen (Kremer et al., 2012).

Der Replikationszyklus der Pockenviren findet im Gegensatz zu anderen DNA-Viren ausschließlich im Zytoplasma der Wirtszelle statt (Dales, 1963; Minnigan & Moyer, 1985). Um das zu gewährleisten, bringt das Pockenvirus eine eigene Ausstattung an Enzymen mit, welche für die frühe Genexpression notwendig sind (z.B. eine DNA-

abhängige RNA-Polymerase). Die frühe Genexpression findet direkt nach Eintritt des Viruskerns in die Zelle statt (Kates & McAuslan, 1967). Dabei werden sowohl DNA-Polymerase, intermediäre Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren und Immunabwehrmoleküle gebildet (zur Übersicht siehe (Broyles, 2003)). Dem folgt die Freisetzung der DNA aus dem Viruskern, das sogenannte „Uncoating“ (Joklik, 1964). Die darauf folgende DNA-Replikation findet in den sogenannten „Virusfabriken“ im Zytoplasma statt (Cairns, 1960; Dales, 1963; Katsafanas & Moss, 2007). Sie beginnt eine halbe bis eineinhalb Stunden nach der Infektion, erreicht ihren Höhepunkt nach zwei bis zweieinhalb Stunden und nach viereinhalb Stunden wurden bereits über 90% der DNA repliziert (Joklik & Becker, 1964). Parallel dazu findet die intermediäre Genexpression statt, deren Translationsprodukte für die darauf folgende späte Genexpression benötigt werden (Baldick et al., 1992). Schließlich werden DNA und späte virale Proteine in sogenannten unreifen Virionen („*immature virions*“) verpackt. Diese werden nach der Reifung (als „*mature virions*“) mit einer Doppellipidmembran umhüllt und aus der Zelle ausgeschleust (zur Übersicht siehe (Moss, 2013)).

2.4. Virulenz und Verwendung als Vektorvakzine

Es gibt verschiedene Möglichkeiten in einem Organismus Immunität gegen ein bestimmtes Antigen zu induzieren. Altbekannte Möglichkeiten sind die Verwendung von modifizierten Lebendvakzinen (MLV, *modified live vaccines*) und nicht vermehrungsfähigen (Tot-)Vakzinen. Moderne Alternativen stellen heutzutage andere Varianten von Impfstoffen wie DNA-Vakzinen oder rekombinante Vektorimpfstoffe dar. Bei letzterem handelt es sich um ein infektiöses Virus in dessen Erbgut bestimmte Fremdgene (z.B. die eines anderen Virus) eingebaut wurden. Nach Infektion mit dem Vektorvirus entstehen durch Expression dieser fremden Gensequenzen Virusproteine, die eine Immunantwort im Wirt hervorrufen. Somit hat der Wirtsorganismus die Möglichkeit, Schutz gegen das Virus aufzubauen, dessen Gene in den Vektorimpfstoff eingebaut wurden, ohne in direkten Kontakt mit dem Erreger zu treten. Aus diesem Grund kann keine Impfkrankheit entstehen, da keine vermehrungsfähigen Partikel des Virus, gegen den die Impfung gerichtet ist, appliziert werden (Brun et al., 2008).

Das Vacciniavirus besitzt viele Eigenschaften, die für dessen Verwendung als Vektorimpfstoff von Vorteil sind. Durch den rein zytoplasmatischen Replikationszyklus bringt das Vacciniavirus seine eigene Ausstattung an Enzymen und

Transkriptionsfaktoren mit und ist unabhängig von den zelleigenen Vorgängen im Nukleus (Moss, 1991). Weiterhin besitzt es spezifische Promotorsequenzen, die die virale Genexpression regulieren und welche somit auch als Werkzeug bei der Herstellung rekombinanter Impfvektoren dienen können. Den Promotoren lassen sich verschiedene Eigenschaften zuordnen. So gibt es synthetische bzw. natürliche und starke bzw. schwache Promotoren. In Bezug auf die Genexpressionsphase in denen sie aktiv sind, gibt es eine Einteilung in frühe, intermediäre, bzw. späte Promotoren (Davison & Moss, 1989b, 1989a). Meist werden sogenannte früh-späte Promotoren verwendet, deren Translationsprodukte während des gesamten Lebenszyklus des Virus gebildet werden.

Eine weitere Eigenschaft, die den einfachen Einbau von Fremd-DNA in das Genom des Vacciniavirus ermöglicht, ist die natürlich auftretende homologe DNA-Rekombination während der Replikation des Pockenvirus (Fenner & Comben, 1958). Panicali et al. fanden heraus, dass ein Fremdgen, das von zwei kontinuierlichen Vaccinia-DNA-Sequenzen flankiert wird, mittels einer Transfektion in Vacciniavirus-infizierte Zellen verbracht werden kann. Durch Rekombination zwischen den flankierenden Sequenzen und den dazu homologen Sequenzen in der sich replizierenden Virus-DNA kann die Fremd-DNA stabil in das Vaccinia-Genom integriert werden (Panicali et al., 1983). Das Vacciniavirus besitzt eine hohe Aufnahmekapazität für fremde Gensequenzen. Mindestens 25 000 bp Fremd-DNA können in das Vacciniavirus-Genom eingebaut werden, ohne die Stabilität, Infektiosität oder Replikationsfähigkeit des Virus zu beeinflussen (Smith & Moss, 1983).

Zur zweiten Generation der Vacciniavirus-Vektorimpfstoffe zählt das MVA. Durch die Vermehrungspassagen in CEF-Zellen und dem daraus resultierenden Verlust von 13% des Genmaterials (26,5 kb) büßte MVA auch einen großen Teil seiner Virulenzfaktoren und „*host-range*“-Gene ein, welche für das Wirtsspektrum verantwortlich sind. Mayr et al. bemerkten bereits nach der 371. Passage eine reduzierte Virulenz auf verschiedenen Zellkulturen, im Hühnerembryo und auch in verschiedenen Tiermodellen (Mayr & Munz, 1964). Das heutige MVA ist im Gegensatz zum ursprünglichen CVA nicht mehr in der Lage, sich in den meisten Säugetierzellen komplett zu replizieren. Dennoch kann es beliebige Wirtszellen infizieren und sowohl virale als auch rekombinante Gene aller drei Genexpressionsphasen (früh, intermediär und spät) exprimieren. In einem Großteil der Säugetierzellen inklusive aller humanen Zelllinien bricht der virale Replikationszyklus nach der Bildung unreifer Virionen („*immature virions*“) in der

Wirtszelle ab (Sutter & Moss, 1992).

Zelllinien werden daher in Bezug auf die Replikationsfähigkeit von MVA in drei verschiedene Gruppen eingeteilt: permissive Zellen, in denen sich MVA vermehren kann; semi-permissive, die eine Vermehrung nur zu einem gewissen Grad zulassen und nicht-permissive Zellen, in denen zwar eine Infektion und die Bildung unreifer Virionen, aber keine vollständige Replikation stattfindet (Meyer et al., 1991; Carroll & Moss, 1997).

Es gibt nur sehr wenige permissive Zellen für MVA. Dazu zählen die primären CEF-Zellen und als einzige Säugetierzelllinie BHK-21 (Hamsternierenzellen) (Carroll & Moss, 1997; Drexler et al., 1998). Als kontinuierliche Hühnerembryofibroblasten-Zelllinie konnten auch DF1-Zellen bei der Herstellung von MVA-basierten Vakzinen überzeugen (Garber et al., 2009). Zu den semi-permissiven Zellen gehören einige, einander sehr ähnliche, Nieren-Zelllinien der grünen Meerkatze (u.a. Vero, MA104 BS-C-1 und CV-1) (Meyer et al., 1991; Carroll & Moss, 1997; Okeke et al., 2006). Die meisten anderen Säugetierzellen, darunter auch humane Zelllinien wie HeLa und HaCaT, sind nicht-permissiv für MVA (Carroll & Moss, 1997).

Durch die stark reduzierte Replikationsfähigkeit in humanen Zellkulturen wurde MVA vom Robert Koch-Institut in die Risikogruppe 1 eingestuft (Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung des rekombinanten Vacciniavirus MVA, 2002).

Nicht nur aufgrund seiner geringen Virulenz und hohen Sicherheit eignet sich MVA im Vergleich zu anderen Vacciniaviren noch besser als Expressionsvektor. Hebben et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass die gebildete Proteinmenge in ihrem Versuch im MVA-Vektorsystem ca. viermal größer war als bei vergleichbaren Vacciniavirus-Expressionssystemen (Hebben et al., 2007). Außerdem zeigt MVA einige Besonderheiten in Bezug auf die Aktivierung des Immunsystems.

2.5. Immunmodulation

Um die gute Immunogenität von MVA, trotz der fehlenden Replikation in den meisten Säugetierzellen, zu erklären, muss zuerst ein Blick auf das immunmodulierende Verhalten anderer Orthopoxviren geworfen werden. Gut ein Drittel der viralen Proteine der Orthopoxviren sind nur für die Interaktion mit dem Immunsystem des Wirtes verantwortlich und werden nicht zur *in vitro*-Replikation des Virus benötigt (Smith, 1993). Zu ihnen gehören die Immunevasionsproteine, deren Aufgabe darin besteht, bestimmte Immunreaktionen des Wirtes zu reduzieren und damit die Vermehrung und Virulenz des Virus zu steigern. Beispielsweise gibt es Proteine, die die Apoptose der

Wirtszelle verzögern oder Steroide produzieren, welche immunsuppressiv wirken. Weiterhin sind manche Pockenviren in der Lage, lösliche Rezeptoren für bestimmte Zytokine wie den Tumornekrosefaktor (TNF) (Hu et al., 1994; Smith et al., 1996), Interleukine (Alcami & Smith, 1992; Spriggs et al., 1992), Interferone (IFN) (Alcami & Smith, 1995; Colamonici et al., 1995; Mossman et al., 1995; Symons et al., 1995) und Chemokine (Graham et al., 1997; Smith et al., 1997a; Alcamí et al., 1998) herzustellen. Diese Rezeptoren binden die genannten pro-inflammatorischen Substanzen und vermindern somit die Immunantwort (zur Übersicht siehe (Smith et al., 1997b)).

Eine ausgeprägte Immunantwort ist jedoch für die Wirksamkeit eines Impfstoffes unerlässlich. MVA hebt sich von anderen Orthopoxviren durch das Fehlen vieler viraler Immunevasionsfaktoren ab. Dem liegt die Deaktivierung bzw. Fragmentierung einiger Gensequenzen zugrunde, eine Folge der Attenuierung durch kontinuierliches Passagieren in CEF-Zellen (Antoine et al., 1998).

Eine Infektion bzw. Immunisierung mit MVA hat Einfluss auf den Ablauf der angeborenen Immunantwort. Es konnte gezeigt werden, dass MVA als einziges der getesteten Vacciniaviren in der Lage ist, die Bildung signifikanter Mengen an Interferon Typ I zu induzieren (Büttner et al., 1995; Blanchard et al., 1998; Waibler et al., 2007). Blanchard et al. beschrieben erstmals, dass MVA keine löslichen Rezeptoren für IFN- γ , IFN- α/β , TNF oder Chemokine bildet, welche eine Immunantwort schwächen könnten. Es ist lediglich in der Lage einen löslichen Interleukin-1 β -Rezeptor zu exprimieren (Blanchard et al., 1998).

Auch die Produktion pro-inflammatorischer Chemokine spielt eine wichtige Rolle bei der Induktion von antiviraler Immunität. Lehmann et al. konnten zeigen, dass eine Infektion mit MVA (im Gegensatz zu anderen Vacciniaviren) die Expression löslicher chemotaktischer Faktoren wie CCL2, CCL3, CCL4 und CXCL10 induziert, welche eine Einwanderung von Leukozyten in das infizierte Gewebe stimulieren (Lehmann et al., 2009). Weiterhin ist MVA auch in der Lage das Komplementsystem zu aktivieren, was ebenfalls die Migration von Leukozyten zur Folge hat (Price et al., 2015).

Auch die adaptive Immunantwort wird durch eine Infektion bzw. Impfung mit MVA stimuliert. Neben der Antigen-spezifischen Antikörperbildung (Hirsch et al., 1996; Wyatt et al., 1996; Kreijtz et al., 2007), spielt die Induktion einer CD4⁺- und CD8⁺-T-Zell-Antwort eine wichtige Rolle (Sutter et al., 1994; Drexler et al., 2003; Volz et al., 2014).

Tatsächlich ist die Induktion der Immunantwort durch MVA so stark, dass es auch als reines Adjuvans mit anderen Impfstoffen verwendet werden kann, ohne selbst als Vektor für bestimmte Antigene zu dienen (Mayr et al., 1985; Nörder et al., 2010).

2.6. MVA-Vektorimpfstoffe in der Veterinärmedizin

Mehrere rekombinante MVA-Impfstoffe zeigten in der Humanmedizin bereits vielversprechende Ergebnisse in vorklinischen Studien und befinden sich nun in der klinischen Prüfung. Dabei handelt es sich um Impfstoffe gegen wichtige humanpathogene Erkrankungen wie Malaria, HIV/AIDS, Influenza, Hepatitis B und C und Tuberkulose (zur Übersicht siehe (Gilbert, 2013; Gómez et al., 2013)).

In der Tiermedizin ist die Entwicklung MVA-basierter Vektorvakzinen noch nicht ganz so weit fortgeschritten, bietet aber großes Potential und viele verschiedene Anwendungsmöglichkeiten.

Ein Beispiel hierfür ist die Entwicklung einer MVA-Vektorvakzine gegen das *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus* (MERS-CoV). Dabei handelt es sich um einen Erreger, der 2012 erstmals bei einem Mann saudi-arabischer Herkunft nachgewiesen wurde, welcher an einer schweren Lungenentzündung schließlich verstarb (Zaki et al., 2012). Inzwischen wurde festgestellt, dass Dromedare als Reservoir für das MERS-CoV dieses auch auf Menschen übertragen können (Müller et al., 2015; Reusken et al., 2015). Ursprünglich stammt die Erkrankung, die schwere grippeähnliche Symptome bis zur Lungenentzündung, aber auch neurologische Symptome, Durchfall und Nierenversagen hervorrufen kann, aus dem Mittleren Osten, wurde aber auch nach Südkorea exportiert (Assiri et al., 2013; Cowling et al., 2015; Zumla et al., 2015). Um einer globalen Ausbreitung des MERS-CoV vorzubeugen, wurde ein MVA-basierter Impfstoff entwickelt, der das *Spike*-Protein des Virus exprimiert. Dieser konnte im Mausmodell hohe Titer neutralisierender Antikörper induzieren und vor einer Belastungsinfektion mit MERS-CoV schützen (Song et al., 2013; Volz et al., 2015). Vor Kurzem wurde der Impfstoff an Dromedaren getestet, bei denen die Virusausscheidung durch die Impfung deutlich gesenkt werden konnte, wodurch das Risiko einer Ansteckung des Menschen verringert werden könnte (Haagmans et al., 2016).

Auch gegen andere zoonotische Erreger wurden bereits MVA-basierte Vakzinen entwickelt.

Nam et al. konstruierten einen MVA-Vektorimpfstoff, der zwei Hüllproteine des Japanischen Enzephalitis Virus exprimiert (Nam et al., 1999). Sie konnten zeigen, dass damit sowohl in Mäusen als auch in Schweinen die Bildung Antigen-spezifischer neutralisierender Antikörper induziert werden kann (Nam et al., 2002).

Im Nutztierbereich gibt es noch weitere vielversprechende rekombinante MVA-Vakzinen. Zum Beispiel wurden die Gene der Glykoproteine F und G des bovinen respiratorischen Synzytialvirus (bRSV) in den Vektor eingebaut. Nach Impfung

seronegativer Kälber entwickelten diese bRSV-spezifische IgG und eine CD8⁺ T-Zell-Antwort. Durch die Impfung traten nach einer Infektion mit bovinem respiratorischen Synzytialvirus schwächere bRSV-spezifische Symptome auf als bei den nicht-geimpften Tieren der Kontrollgruppe (Antonis et al., 2007).

Eine weitere MVA-Vektorvakzine beinhaltet ebenfalls Gene eines Paramyxovirus der Wiederkäuer. Hierbei wurden das Fusionsprotein (F) und Hämagglutinin (H) des „Virus der Pest der kleinen Wiederkäuer“ (PPRV) vom MVA-Vektorvirus exprimiert. Sowohl MVA-F als auch MVA-H waren in der Lage, Ziegen vor der Infektion mit PPRV vollkommen zu schützen, sodass trotz einer Inokulation von tausendfacher letaler Dosis 50 keine Symptome der „Pest der kleinen Wiederkäuer“ auftraten (Chandran et al., 2010).

In Hühnern konnte eine solide Schutzwirkung gegen das hochpathogene aviäre Influenzavirus H5N1 erzielt werden, indem die Tiere mit einem MVA-Vektor-Impfstoff immunisiert wurden, welcher das Hämagglutinin-Gen H5 des Influenzavirus exprimiert (Veits et al., 2008).

Die Immunogenität und Sicherheit eines rekombinanten MVA-Vektors konnte auch im Pferd nachgewiesen werden. Hierfür wurden die Gensequenzen des Hämagglutinins bzw. Nukleoproteins eines equinen Influenzavirus in die Deletion III des MVA eingebaut. Auch hier konnten virus-spezifische IgA, IgG₁ und IgG₂ Serumantikörpertiter gemessen werden und in einem Provokationsversuch der Schutz von geimpften Pferden vor dem Influenzavirus bestätigt werden (Breathnach et al., 2004; Breathnach et al., 2006).

Ein weiterer auf MVA basierender Pferdeimpfstoff schützt immunisierte Pferde vor der afrikanischen Pferdepest. In das MVA-Genom wurde die Sequenz des Strukturproteins VP2 des „*African Horse Sickness Virus*“ eingesetzt. Nach erfolgreichen Vorversuchen im Mausmodell konnte auch bei der Belastungsinfektion von Pferden eine sehr gute Schutzfunktion des Impfvirus nachgewiesen werden (Chiam et al., 2009; Castillo-Olivares et al., 2011; Alberca et al., 2014).

Auf dem Gebiet der Kleintiermedizin wurden erst wenige rekombinante MVA-Vektorimpfstoffe konstruiert. Einer davon präsentiert die Antigene TRYP bzw. LACK der Protozoe *Leishmania*, die bei Hunden v.a. in der Mittelmeerregion schwere Erkrankungen hervorruft. Erste Impfstudien bewiesen die Sicherheit und Immunogenität des Vektors, die vor allem auf Aktivierung der T-Zell-Antwort vom Typ Th1 beruht (Ramos et al., 2008; Carson et al., 2009).

Ein weiterer auf MVA basierender Vektorimpfstoff exprimiert ein Tollwutvirusglykoprotein und ist in der Lage eine spezifische humorale Immunantwort in der Maus auszulösen. Bei Impfung von bereits mit anderen Tollwutvakzinen

vorgeimpften Hunden und Waschbären konnte gezeigt werden, dass die rekombinanten MVA-Impfstoffe eine deutliche „*Booster*“-Wirkung aufwiesen, d.h. sie erhöhten den Tollwut-spezifischen Antikörperspiegel bis um das Hundertfache. Weyer et al. folgerten, dass der sehr hohe Sicherheitsstandard und der ausgeprägte „*Booster*“-Effekt, welche durch rekombinante MVA-Vektoren gewährleistet werden, gerade bei der Impfung solcher Jungtiere von Vorteil sein könnten, die aufgrund eines maternalen Antikörperspiegels nicht auf die herkömmlichen Lebend- bzw. Totvakzinen reagieren (Weyer et al., 2007).

3. Zielsetzung der Arbeit

Da gerade bei Katzenwelpen eine Impfung gegen FPV mit den routinemäßig eingesetzten Lebendvakzinen aufgrund der maternalen Antikörperlücke oftmals nicht den gewünschten Effekt einer belastbaren Immunität erzielt, besteht ein Bedarf an neuen Vakzinen gegen FPV, die auch im Jungtier sicher zur Protektion gegen die Feline Panleukopenie führen.

In dieser Arbeit werden vier rekombinante MVA generiert, um die Strukturproteine VP1 bzw. VP2 des FPV zu exprimieren. Nach der Konstruktion geeigneter Vektorplasmide sollen die Fremdgene VP1 bzw. VP2 mit ausgewählten Promotoren über homologe Rekombination in einer Transfektion in das MVA-Virus inseriert werden. Nach klonaler Selektion der rekombinanten Viren und Amplifikation können weitere Untersuchungen vorgenommen werden. Es soll, neben dem Nachweis der Expression der Proteine VP1 und VP2, festgestellt werden, ob sich das Wachstumsverhalten der rekombinanten MVA durch die Insertion der Fremdgene im Vergleich zum Ursprungsvirus verändert. Weiterhin soll die Bildung Virus-ähnlicher Partikel sowie die Eigenschaft der Hämagglutination untersucht werden. Neben der potentiellen Verwendung als Vektorvakzinekandidaten, können die verschiedenen Konstrukte auch der Erforschung von Funktion und Eigenschaften der einzelnen Strukturproteine im Felinen Panleukopenievirus dienen.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Zelllinien und deren Nährmedien

Bezeichnung	Herkunft	Nährmedium
DF-1	Hühnerembryofibroblasten	DMEM 5% FKS Kulturmedium 2% FKS Infektionsmedium 1% NEA (nicht-essentielle AS) 1% Penicillin/Streptomycin
CEF	Primäre Hühnerembryofibroblasten	MEM 10% FKS Kulturmedium 2% FKS Infektionsmedium 1% NEA 1% Penicillin/Streptomycin
CRFK	Feline Nierenzellen	MEM+ Hanks 1:1 5% FKS Kulturmedium 2% FKS Infektionsmedium 1% NEA 1% Penicillin/Streptomycin
HaCaT	Humane Keratinozyten	DMEM 7% FKS Kulturmedium 2% FKS Infektionsmedium 1% NEA 1% Penicillin/Streptomycin
Vero	Nierenzellen der Grünen Meerkatze	MEM 5% FKS Kulturmedium 2% FKS Infektionsmedium 1% NEA 1% Penicillin/Streptomycin

Tabelle 1: Übersicht aller in dieser Arbeit verwendeten Zellen und Zelllinien mit deren Medien

2. Zellkultur

2.1. Kultivierung und Passagieren permanenter Zellkulturen

Das Zellkulturmedium wurde abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich; 5 ml für 175 cm² Zellkulturflasche bzw. 2,5 ml für 75 cm² Zellkulturflasche; Inkubation bei 37 °C) abgelöst. Die anschließend resuspendierten Zellen wurden im Verhältnis 1:5 bis 1:10 neu ausgelegt.

2.2. Infektion von Zellen

Die Zellen wurden mit Kulturmedium (10 % FKS) in das jeweilige Zellkultursystem eingesät, sodass nach 24 h ein 90-100 % konfluenter Monolayer vorlag.

Zur Infektion wurde MVA-infiziertes Zellkulturmaterial verwendet, welches zunächst einen dreifachen Gefrier-Auftau-Zyklus durchlief, um alle Zellen aufzubrechen und das Virus freizusetzen. Nach einer Ultraschallbehandlung (= Sonifikation) mit einem Sonoplus-Gerät (Bandelin electronic) (3 x 60 sec, maximale Leistung, im Eiswasserbad) wurde die Virus-Zellkultur-Suspension in Infektionsmedium (2 % FKS) auf die gewünschte MOI (*multiplicity of infection*) verdünnt. Um die Wahrscheinlichkeit der Adhäsion von Viren an die Zellen zu erhöhen, wurde das Virus vorerst in möglichst geringem Volumen an Infektionsmedium gelöst und damit das Medium der zu infizierenden Zellen ersetzt. Nach Inkubation (30-60 min bei 37 °C) wurde dem Zellkultursystem entsprechend das restliche Volumen an Medium hinzugefügt. Die infizierten Zellen wurden 2-3 Tage bei 37 °C inkubiert, bis eine Veränderung der Zellmorphologie (Zytopathischer Effekt (CPE) bzw. Plaques) sichtbar war. Anschließend wurden sie bei -20 °C eingefroren.

3. Viren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier rekombinante MVA erstellt: MVA_PmH5_VP1, MVA_PmH5_VP2, MVA_P7.5late_VP1 und MVA_P7.5late_VP1_PmH5_VP2 (kurz: MVA_VP1_VP2). Die Konstrukte unterscheiden sich im Genlokus, in den das Fremdgen („*Gene of Interest*“, GOI) eingebaut wurde, sowie im Promotor, der die Transkription des GOI steuert und im Fremdprotein, das von infizierten Zellen

synthetisiert werden soll. Bei den Proteinen VP1 und VP2 handelt es sich um Strukturproteine des FPV.

Virus	Eigenschaften	Herkunft
MVA_F6	Nicht-rekombinantes Wildtyp-MVA	Prof. Dr. Sutter
MVA_mCherry	mCherry unter Kontrolle des PmH5 Promotors in der Insertionsstelle I8R-G1L	Prof. Dr. Sutter
MVA_GFP	GFP unter Kontrolle des P11 Promotors in der Deletion III	Prof. Dr. Sutter
MVA_PmH5_VP1	VP1 unter Kontrolle des PmH5 Promotors in der Deletion III	Diese Arbeit
MVA_PmH5_VP2	VP2 unter Kontrolle des PmH5 Promotors in der Deletion III	Diese Arbeit
MVA_P7.5late_VP1	VP1 unter Kontrolle des P7.5late Promotors in der Insertionsstelle I8R-G1L	Diese Arbeit
MVA_P7.5late_VP1 _{mod_} PmH5_VP2 kurz: MVA_VP1_VP2	VP1 unter Kontrolle des P7.5late Promotors in der Insertionsstelle I8R-G1L und VP2 unter Kontrolle des PmH5 Promotors in der Deletion III	Diese Arbeit

Tabelle 2: Übersicht aller in dieser Arbeit verwendeten Viren

4. Generierung des Vektorplasmids

Um ein rekombinantes MVA-Virus zu erstellen, benötigt man ein Vektorplasmid. Dieses Plasmid beinhaltet das Gen, welches in das Genom des MVA-Virus integriert werden soll, das GOI. Die beiden GOI in dieser Arbeit sind das VP1- und das VP2-Gen, welches eine verkürzte Version des VP1 darstellt (siehe II.1.3).

Die Sequenz für das VP1-Gen stammt von einem Parvovirus-Feldisolat (FPV_ML2012), welches im Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen angezüchtet

wurde. Durch die Sequenzierung des VP1-Gens wurde bestätigt, dass es sich um ein FPV handelt. Die Länge der VP1- bzw. VP2-Sequenz des ML2012 beträgt 2181 bzw. 1752 bp. In der folgenden Abbildung wurde die VP2-Sequenz des Stammes FPV_ML2012 mit anderen bekannten FPV- und CPV- VP2-Sequenzen aus der NCBI GenBank® verglichen.

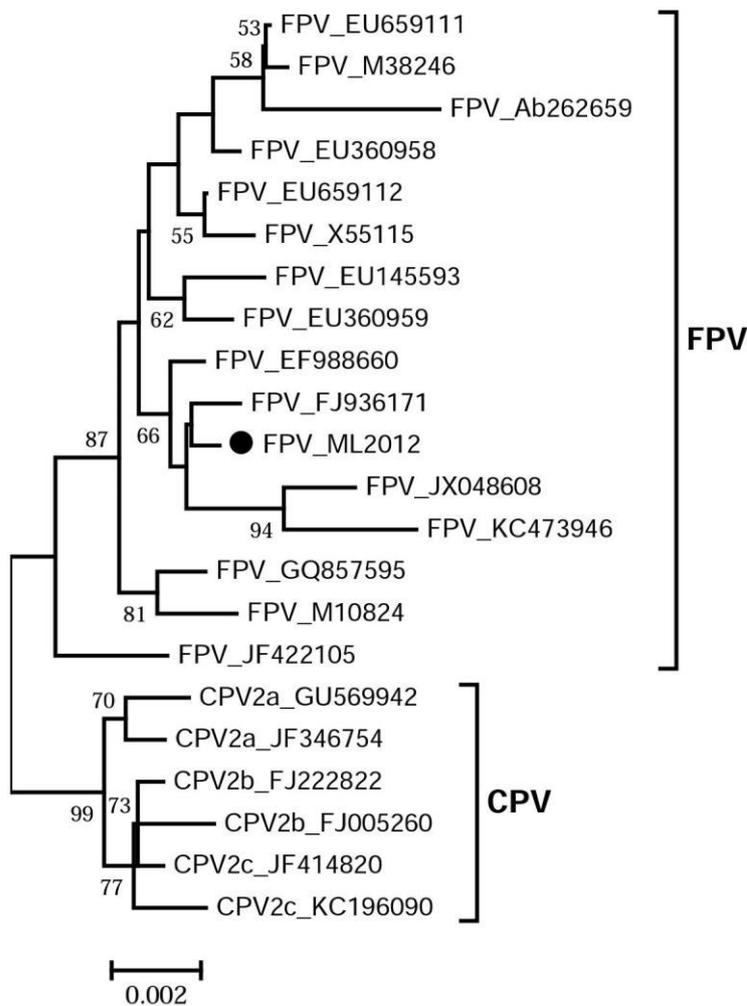


Abbildung 4: Phylogenetische Verwandtschaft des FPV_ML2012 zu anderen bekannten FPV und CPV-Stämmen anhand von Analogien in der Nukleotidsequenz des VP2-Kapsidproteingens. Der Maßstab beschreibt den Quotienten aus Nukleotidsubstitutionen und Länge der gesamten Sequenz.

Die durch Sequenzierung des FPV_ML2012 ermittelte VP1-Sequenz wurde durch stille Mutation (Änderung einzelner Nukleotide ohne Auswirkung auf die Aminosäuresequenz) so verändert, dass die virale Transkription und die Replikation der viralen DNA möglichst störungsfrei ablaufen können. So wurden das Stopp-Signal der frühen MVA-RNA-Polymerase (TTTTTNT) (Earl et al., 1990) und *G/C-Runs* (mehrere Cytosin- bzw. Guanin-Basen nacheinander, die bei der DNA-Synthese zur

Leserasterverschiebung („*frameshift*“) im MVA-Genom führen können) modifiziert (Wyatt et al., 2009). Zusätzlich wurde dem VP1-Gen eine *KpnI*-Restriktionsschnittstelle, die Sequenz des P7.5late Promoters und, dem folgend, eine *BamHI*-Restriktionsschnittstelle vorgeschaltet. Zwischen *BamHI* und dem Startcodon ATG der VP1-Sequenz wurden die Nukleotide ACC eingefügt, um die optimale Translation in eukaryotischen Zellen zu gewährleisten (Kozak, 1981). Am Ende der VP1-Sequenz wurden zwei weitere Restriktionsstellen (*NotI* und *Sall*) angehängt (siehe Sequenz im Anhang). Die VP1-Insertionssequenz wurde synthetisiert (Genewiz, Sigma-Aldrich) und inseriert in das Plasmid pUC-57-Plasmid bezogen.

In Hinblick auf die Generierung des Doppelkonstruktes MVA_VP1_VP2 wurde ein zweites Plasmid, pUC-57-VP1_{mod}, synthetisiert. Da die Sequenz des VP2 vollständig in der Sequenz des VP1 enthalten ist (siehe II. 1.3), könnte es bei einem Doppelkonstrukt zu unerwünschten homologen Rekombinationen kommen, welche eventuell die Genexpression beider Proteine beeinflusst. Aus diesem Grund wurde die Insertionssequenz erneut modifiziert (VP1_{mod}). Die Nukleotidabfolge wurde ab dem Startcodon der VP2-Sequenz so verändert, dass an jedem Codon mindestens eine Base ausgetauscht, doch die Aminosäuresequenz beibehalten wurde. Die vor- und nachgeschalteten Restriktionsstellen, Promotorsequenz und die ACC-Region blieben unverändert (siehe Sequenz im Anhang).

Die Plasmide pUC-57-VP1 und pUC-57-VP1_{mod} sowie alle anderen Plasmide wurden vor deren Verwendung amplifiziert (siehe 4.1). Nach Aufreinigung der DNA aus der Bakterienbouillon (siehe 4.2.1) wurde diese mittels Restriktionsendonukleasen geschnitten, um die zu inserierende Sequenz vom restlichen Plasmid zu trennen (siehe 4.2.2). Das VP2-Gen wurde mittels PCR aus dem pUC-57-VP1 generiert (siehe 4.2.3) und ebenfalls mit Endonukleasen verdaut. Das Vektorplasmid wurde mit den gleichen Restriktionsendonukleasen wie das GOI behandelt. Nach Auftrennung im Agarosegel (siehe 4.2.4), Ausschneiden und Aufreinigung der DNA (siehe 4.2.5) des GOI sowie des Vektorplasmids konnte das GOI mittels einer Ligation (siehe 4.2.6) in das Plasmid eingebracht (kloniert) werden. Das Vektorplasmid enthielt vor und nach dem GOI jeweils eine MVA-spezifische „*Flanking-Region*“, die den Einbau an die vorgesehene Insertionsstelle im MVA-Genom determiniert. Weiterhin war ein Markergen vorhanden, das für ein fluoreszierendes Protein (mCherry (rot) bzw. „grün fluoreszierendes Protein“ GFP) kodiert, um die rekombinanten MVA-Klone von den nicht-rekombinanten zu unterscheiden. Um nach der Selektion die Eliminierung des Markergens zu gewährleisten, wurde zwischen dem GOI und dem Markergen eine kurze repetitive Sequenz der „*Flanking-Region*“ eingefügt (*Flank_III-1* bzw. *Flank_I8R repeat*, FR).

Plasmid	Eigenschaften	Herkunft
pUC-57-VP1	Synthetisiertes Plasmid mit dem Insert VP1	Genewiz, Sigma-Aldrich
pUC-57-VP1 _{mod}	Synthetisiertes Plasmid mit dem Insert VP1 _{mod}	Genewiz, Sigma-Aldrich
pIIIPmH5Red	mCherry als Marker, inseriert GOI in der MVA-Deletion III	Prof. Dr. Sutter
pLW-73	GFP als Marker, inseriert GOI zwischen den MVA-Genen I8R und G1L	Prof. Dr. Sutter
pIIIPmH5Red-VP1	pIIIPmH5Red mit VP1 als GOI	Diese Arbeit
pIIIPmH5Red-VP2	pIIIPmH5Red mit VP2 als GOI	Diese Arbeit
pLW-73-VP1	pLW-73 mit VP1 als GOI	Diese Arbeit
pLW-73-VP1 _{mod}	pLW-73 mit VP1 _{mod} als GOI	Diese Arbeit

Tabelle 3: Übersicht aller in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

4.1. Amplifikation von Plasmid-DNA

4.1.1. Transformation

Um ein Plasmid zu amplifizieren, wurde dieses in kompetente Bakterienzellen (NEB 5-alpha Competent E.Coli (High Efficiency)) transferiert. Nach dem Auftauen (10 min auf Eis) wurden zu den E.Coli-Bakterien 10 ng Plasmid bzw. 10 µl des Ligationsansatzes gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Darauf folgte ein Hitzeschock im 42 °C warmen Wasserbad für 30 sec. Nach 5 min Abkühlen auf Eis wurden 950 µl raumwarmes SOC Medium (NEB) hinzugegeben. Die Vorkultivierung erfolgte für 60 min bei 37 °C, anschließend wurden 100 µl der Bakterienlösung auf einem Ampicillin-haltigen LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.1.2. Kultivierung transformierter Bakterien

LB-Medium wurde mit 100 µg/ml Ampicillin (Sigma-Aldrich) versetzt und jeweils 5 ml des Gemisches in fünf Reaktionsgläser verbracht. Es wurden fünf Kolonien der beimpften Agarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und damit das Medium in den Reaktionsgläsern angeimpft. Die Amplifikation der Bakterien erfolgte unter leichtem Schütteln über Nacht bei 37 °C.

4.2. Molekularbiologische Methoden

4.2.1. DNA-Präparation

Für die Extraktion von Plasmid-DNA aus einer bakteriellen Flüssigkultur wurde das kommerzielle Kit „PureYield Plasmid Miniprep System“ (Promega) nach Herstellervorgaben verwendet. Zum Aufreinigen viraler DNA aus einer MVA- oder Parvovirus suspension fand das „QIAamp DNA Mini Kit (250)“ (Quiagen) Verwendung.

4.2.2. Restriktionsverdau

Alle Endonukleasen (High Fidelity (HF™)), die verwendet wurden, stammen von New England Biolabs und sind im Anhang aufgelistet. Der CutSmart Buffer® (NEB) war mit allen verwendeten Restriktionsenzymen kompatibel. Um ein Plasmid zu kontrollieren wurden 200-300 ng Plasmid-DNA in einem 20 µl Ansatz mindestens 2 h bei 37 °C mit mindestens einer Endonuklease inkubiert.

DNA	200-300 ng
10x CutSmart Buffer®	2 µl
Endonuklease 1	0,25 µl
Endonuklease 2	0,25 µl
Nuklease-freies H ₂ O	ad 20 µl

Tabelle 4: Protokoll Restriktionsverdau mit zwei Endonukleasen.

Sollte das geschnittene Plasmid bzw. Insert in einer Ligation verwendet werden, wurde ein Gesamtvolumen von 50 µl gewählt und 2 µg DNA eingesetzt.

4.2.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)

In dieser Arbeit wurde die PCR einerseits dazu verwendet Plasmide und rekombinante MVA-Viren auf Vorhandensein bzw. korrekte Insertion des GOI zu kontrollieren. Zum anderen wurde die VP2-Sequenz mit Hilfe entsprechender Oligonukleotidprimer (siehe IV. 1.1) und pUC57-VP1 als Targetsequenz amplifiziert.

Das verwendete Gesamtvolumen eines PCR-Ansatzes betrug 25 μ l und setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

Nuklease-freies Wasser (NEB)	16,25 μ l
10 mM dNTPs (NEB)	0,5 μ l
10 μ M Forward Primer	1,25 μ l
10 μ M Reverse Primer	1,25 μ l
Q5® Reaction Buffer (NEB)	5 μ l
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)	0,25 μ l
Template-DNA	0,5 μ l

Tabelle 5: Protokoll PCR

Grundlegend wurde folgendes Temperaturprofil verwendet:

	Initiale Denaturierung	98 °C	5 min
30 Zyklen	Denaturierung	98 °C	30 sec
	Annealing	x °C	30 sec
	Elongation	72 °C	y min
	Finale Elongation	72 °C	5 min
	Aufbewahrung	8 °C	∞

Die Annealing Temperatur (x) wurde an die jeweiligen Oligonukleotidsequenzen angepasst. Bei der Dauer der Elongation (y) muss Rücksicht auf die Länge des zu erwartenden Produkts genommen werden. Es wurde mit einer Elongationszeit von 1 min pro 1000 bp gerechnet.

4.2.3.1. Oligonukleotidprimer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Verwendung	Länge des Produkts	T _m °C
FPV_VP2_for	AGC TAG GAT CCA CCA TGA GTG ATG GAG CAG TTC AAC	Amplifikation von VP2 aus dem synthetisierten pUC-57-VP1	1766 bp	79,1
FPV_VP2_rev	TAG CTG CGG CCG CCT ACT AAT AT			68,2
FPV_VP2_ Decaro_for	AAA CAG GAA TTA ACT ATA CTA ATA TAT TTA	Nachweis des VP2 Gens im Plasmid bzw. rekombinanten MVA	93 bp	54,2
FPV_VP2_ Decaro_rev	AAA TTT GAC CAT TTG GAT AAA CT			59,2
FPV_VP1_for	GCC AGG ATA GGA CTT GTG CC	Nachweis des VP1 Gens im Plasmid bzw. rekombinanten MVA	213 bp	65,8
FPV_VP1_rev	CCT CCC CAA TCT TTA GCG TCC			67,7
FPV_VP1 _{mod} _for	CAC AGA GTG AGG GTG CAA CA	Nachweis des VP1 _{mod} Gens im Plasmid bzw. rekombinanten MVA	591 bp	65,2
FPV_VP1 _{mod} _rev	TCT GGC ATA CGA AAG GAG CG			67,4
I8R-G1L_for	ATT CTC GCT GAG GAG TGG G	Darstellung der Insertionsstelle I8R-G1L und etwaiger Inserts bzw. Kontrolle des Plasmids pLW-73	Je nach Insert	64,4
I8R-G1L_rev	GTC GTG TCT ACA AAA GGA G			54,6
Del I_for	CTT TCG CAG CAT AAG TAG TAT GTC	Reinheits- und Identitätskontrolle des rekombinanten	291 bp	60,7
Del I_rev	CAT TAC CGC TTC ATT			59,5

	CTT ATA TTC	MVA		
Del II_for	GGG TAA AAT TGT AGC ATC ATA TAC C	Reinheits- und Identitätskontrolle des rekombi- nanten MVA	354 bp	60,3
Del II_rev	AAA GCT TTC TCT CTA GCA AAG ATG			61,0
Del III_for	GAT GAG TGT AGA TGC TGT TAT TTT G	Darstellung der Deletion III bzw. Kontrolle des Plasmids pIII PmH5Red	Je nach Insert	60,5
Del III_rev	GCA GCT AAA AGA ATA ATG GAA TTG			61,6
Del IV_for	AGA TAG TGG AAG ATA CAA CTG TTA CG	Reinheits- und Identitätskontrolle des rekombi- nanten MVA	502 bp	60,4
Del IV_rev	TCT CTA TCG GTG AGA TAC AAA TAC C			61,1
Del V_for	CGT GTA TAA CAT CTT TGA TAG AAT CAG	Reinheits- und Identitätskontrolle des rekombi- nanten MVA	603 bp	60,7
Del V_rev	AAC ATA GCG GTG TAC TAA TTG ATT T			60,6
Del VI_for	CTA CAG GTT CTG GTT CTT TAT CCT	Reinheits- und Identitätskontrolle des rekombi- nanten MVA	702 bp	60,5
Del VI_rev	CAC GGT CAA TTA ACT ATA GCT CTG			60,6

Tabelle 6: Übersicht aller in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotidprimer. Es wird die Schmelztemperatur T_m nach Herstellerangaben angegeben.

4.2.4. Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

PCR-Produkte oder verdaute Plasmide können mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, detektiert und interpretiert werden. Kontrollgele hatten eine Agarosekonzentration von 1 % und präparative Gele (um DNA auszuschneiden und für eine Ligation aufzureinigen) eine Konzentration von 0,8 %.

Die Agarose wurde in der gewünschten Konzentration in TAE-Puffer gelöst, mit 2,5 µl/100 ml Gel Red™ (Biotium) versetzt und nach Erstarren beladen. Den Proben

wurde Ladepuffer (Gel Loading Dye, Purple (6x), NEB) im Verhältnis 1:6 hinzugefügt. Zum Größenvergleich wurden 3 µl Marker (Quick-Load® 2-Log DNA Ladder, NEB) verwendet. Nach der elektropherographischen Auftrennung konnten die DNA-Banden unter dem ChemiDoc MP System (BioRad) durch UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert werden.

4.2.5. Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

Die DNA-Banden wurden unter schwachem UV-Licht (Biostep® Transilluminator UST-30M-8R) visualisiert und mit einem Skalpell exakt ausgeschnitten. Die gewonnene Probe wurde eingewogen und die DNA mit dem „Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System“ (Promega) nach Herstellervorgaben extrahiert.

4.2.6. Ligation

Der Ligationsansatz wurde so gewählt, dass sich ein Verhältnis zwischen Vektor und Insert von 1:5 ergab. Dabei wird die Masse (ng) in Relation zu der Anzahl der Basenpaare im DNA-Fragment berechnet. Daraus ergibt sich folgende Formel:

$$\text{ng Insert} = \frac{\text{ng Vektor} \times \text{bp Insert}}{\text{bp Vektor}} \times 5$$

Vektor	50 ng
Insert	x ng
10x T4 DNA Ligase Reaction Buffer (NEB)	1 µl
T4 DNA Ligase (NEB)	1 µl
H2O	ad 10 µl

Tabelle 7: Protokoll Ligation

Die Bestandteile wurden in einem Eppendorf Reaktionsgefäß gemischt und bei 16 °C über Nacht inkubiert. Darauf folgte die Transformation in kompetente Bakterien (siehe 4.1.1).

5. Generierung rekombinanter Viren

Bei der Transfektion/Infektion (siehe 5.1) wird das GOI zusammen mit dem Markergen aus dem Vektorplasmid in die gewünschte Insertionsstelle des Vektorvirus integriert. Um die bei Pockenviren natürlich auftretende homologe Rekombination zu nutzen, wurden im Plasmid spezielle „*Flanking-Regionen*“ generiert, deren Sequenz auch im MVA-Genom an der Insertionsstelle vorkommt. Diese Regionen flankieren das GOI im Plasmid und sorgen so bei einer Rekombination für die gezielte Insertion des GOI im MVA-Genom. Als Vektorviren dienten MVA_mCherry, MVA_GFP bzw. MVA_PmH5_VP2. Die Auswahl des Vektorvirus hing von der angestrebten Insertionsstelle und dem gewählten Vektorplasmid ab. War z.B. ein rotes Markergen (mCherry) im Vektorplasmid vorhanden, wurde ein GFP-exprimierendes MVA (grün) als Ausgangsvirus gewählt. So konnten rekombinante Viren im Fluoreszenzmikroskop vom Ausgangsvirus unterschieden und gezielt selektiert werden. Über mehrere Passagen auf DF1-Zellen wurde die klonale Selektion der rekombinanten Viren durchgeführt (siehe 5.2), um genetisch identische, rekombinante Virusklone zu erhalten und das Ausgangsvirus zu eliminieren. Nach erfolgreicher Selektion wurden die Markergene aus dem rekombinanten Virus-Genom entfernt, indem eine weitere Selektion der nicht-fluoreszierenden Klone erfolgte.

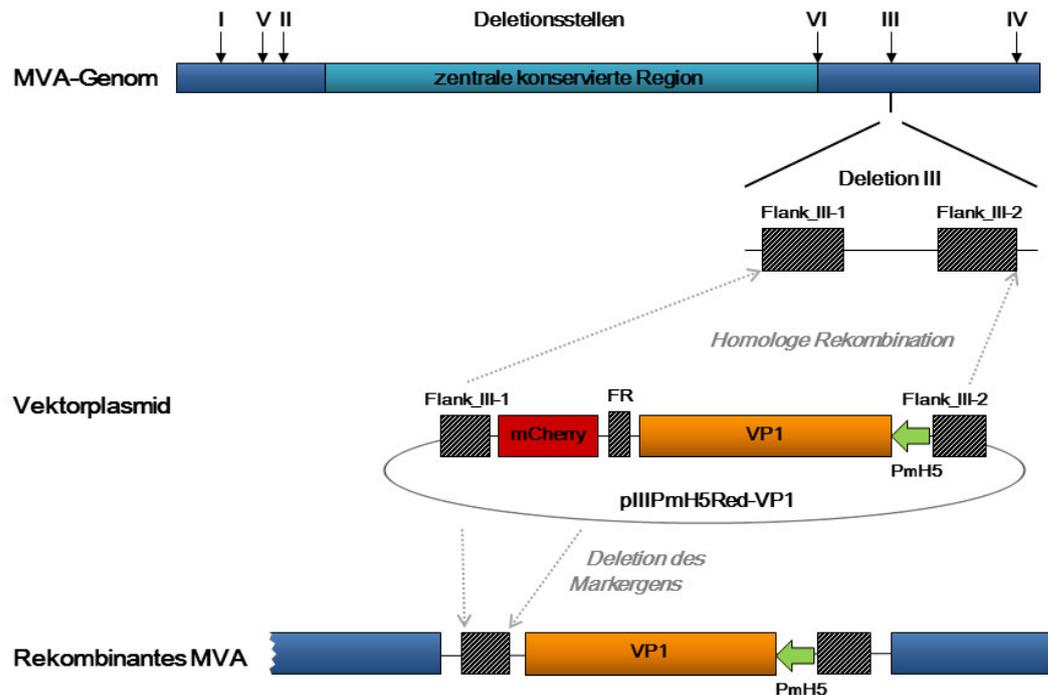


Abbildung 5: Konstruktion des rekombinanten MVA-Vektorvirus. Darstellung des MVA-Genoms mit seinen sechs Deletionsstellen in der terminalen Region und des Vektorplasmides am Beispiel des PIII PmH5 Red-VP1. Mit Hilfe der homologen Rekombination an den *Flanking-Regionen* *Flank_III-1* und *Flank_III-2* wird das VP1 unter der Kontrolle des Promoters PmH5 mit dem Markergen mCherry in die Deletion III inseriert. Durch erneute homologe Rekombination zwischen *Flank_III-1* und *Flank_III-1 repeat* (FR) wird das Markergen deletiert und eine Selektion der farblosen Klone kann durchgeführt werden.

5.1. Transfektion/Infektion

Das Medium einer 6-Loch-Zellkulturplatte mit einem 80-90 %-konfluenten CEF-Zellrasen wurde nach einmaligem Waschen mit PBS durch 1 ml serumfreies Medium pro Kavität ersetzt. Die Zellen wurden mit dem nicht-rekombinanten Vektorvirus (MOI 0,1) 1 h bei 37 °C inkubiert. Aus 1 µg Vektorplasmid, 5 µl Transfektionsreagenz (X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent, Roche) und 100 µl serumfreiem Medium wurde das Transfektionsgemisch hergestellt und bei Raumtemperatur (RT) 20 min inkubiert. Das Infektionsmedium wurde von den Zellen entfernt und durch 1 ml frisches, serumfreies Medium ersetzt. Anschließend wurde das Transfektionsgemisch tropfenweise hinzugegeben. Die Zellen wurden 24 h bei 37 °C bebrütet, dann abgeschabt und bei -20 °C eingefroren.

5.2. Isolierung rekombinanter Virusklone

Ein DF1-Zell-Monolayer in einer 24-Loch-Zellkulturplatte wurde mit dem Zellkulturmaterial, das bei der Transfektion gewonnen wurde, infiziert (0,5 µl pro Kavität). Nach 24 bis 48 h (je nach Größe der Plaques) bei 37 °C wurden die gewünschten grün bzw. rot leuchtenden Plaques unter dem Fluoreszenzmikroskop (CKX41, Olympus) an der Plattenunterseite markiert. Unter einem Lichtmikroskop wurden die markierten Klone mit einer 10 µl-Pipette gepickt und in 100 µl Infektionsmedium gegeben. Diese Proben durchliefen einen dreifachen Gefrier-Auftau-Zyklus, wurden sonifiziert und in einer seriellen Verdünnung (log 5-Stufen) auf eine 24-Loch-Platte mit DF1-Zellen ausgebracht. Nach 24 bis 48 h wurden erneut Plaques gepickt. Dieses Verfahren wurde so oft wiederholt bis kein nicht-rekombinantes Ausgangsvirus mehr im Fluoreszenzmikroskop erkennbar war. Zur Kontrolle der gepickten rekombinanten Virusklone erfolgte schließlich eine Analyse der Virus-DNA mittels PCR.

5.3. Herstellung eines Virusstocks

Mit dem finalen rekombinanten Virusklon wurden in einer 6-Loch-Zellkulturplatte ausgelegte DF1-Zellen infiziert (je 10 µl Virussuspension). Nach 48 h wurden die Zellen aller sechs Kavitäten abgeschabt und mit 100 µl der daraus gewonnenen Suspension wurde eine 75 cm² Zellkulturflasche mit DF1-Monolayer infiziert. Die Zellkulturflasche wurde so lange bei 37 °C bebrütet, bis ein deutlicher CPE erkennbar war und schließlich bei -20 °C eingefroren. Nach dreifachem Gefrier-Auftau-Zyklus und Sonifikation wurde eine 175 cm² Zellkulturflasche DF1-Zellen mit 250 µl Virussuspension aus der 75 cm² Flasche infiziert. Es wurde ebenfalls so lange bei 37 °C bebrütet bis ein CPE auftrat. Nach dreifachem Gefrier-Auftau-Zyklus erhielt man den sogenannten „*crude stock*“.

Nach Titration des „*crude stocks*“ wurden 40 175 cm² Zellkulturflaschen DF1-Zellen mit 2×10^7 pfu pro Flasche infiziert. Die Zellkulturflaschen wurden inkubiert bis sich der Zellrasen abgelöst hatte (2-3 Tage). Dann wurden sie bei -20 °C eingefroren.

Nach dem Auftauen wurden die Zellen gut resuspendiert. Um Zellen, Zelltrümmer und Viruspartikel vom Überstand zu befreien, folgte eine Zentrifugation in der Avanti® J-26XP (Beckman Coulter) bei 36057 x g und 4 °C für 3 h. Die Pellets wurden in 10 mM Tris pH 9,0 abgelöst und mit dem Vortex-Schüttler homogenisiert. Um die Virionen aus den Zellen freizusetzen, wurde die Suspension dreimal 15 sec sonifiziert und im Anschluss 5 min bei 276 x g mit der Sigma 3-16 (Sigma Centrifuges)

zentrifugiert. Diese beiden Schritte wurden drei- bis viermal wiederholt, um sicherzustellen, dass möglichst viele Virionen im Überstand gelöst sind.

In vier Zentrifugenröhrchen wurden 15 ml Sucrose-Lösung vorgelegt (10 mM Tris pH 9,0 mit 36 % Sucrose). Darauf wurden jeweils 20 ml des virushaltigen Überstands geschichtet. Bei einer Zentrifugation (Optima™ LE-80K Ultracentrifuge, Beckman) mit 40000 x g für 1,5 h bei 4 °C wurden die Virionen durch die Sucrose aufgereinigt und von Zelltrümmern befreit.

Die dabei entstandenen Pellets wurden in insgesamt 2-3 ml 10 mM Tris pH 9,0 gelöst und der somit hergestellte „sucrose stock“ konnte aliquotiert, titriert und bei -80 °C gelagert werden.

6. Titerbestimmung einer MVA-Virussuspension

Um die Infektiosität einer MVA-Virussuspension zu bestimmen, wurden CEF-Zellen mit verschiedenen Virusverdünnungsstufen infiziert und die Plaque-bildenden Einheiten („*plaque forming units*“; pfu) mittels indirekter Immunfärbung ausgezählt.

Die Virussuspension wurde nach dreimaligem Gefrier-Auftau-Zyklus und Sonifikation in 10 log-Stufen in Infektionsmedium (2 % FKS) verdünnt (10^{-1} bis 10^{-9}).

Das Medium eines CEF-Zellrasens in einer 6-Loch-Zellkulturplatte wurde im Doppelansatz durch 1 ml der Virussuspension ersetzt. Es folgte eine Inkubationszeit von 2 h bei 37 °C.

Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen mit virusfreiem Infektionsmedium bedeckt und 48 h bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurde das Infektionsmedium abgenommen und die Zellen mit eiskaltem Aceton-Methanol-Gemisch (1:1) fixiert. Nach 5 min wurden die Zellen luftgetrocknet und mit 3%igem PBS (PBS + 3 % FKS) 1 h bei Raumtemperatur (RT) (bzw. bis zu 5 Tage bei 4 °C) geblockt.

Als primärer Antikörper wurde ein polyklonales anti-Vaccinia Kaninchenserum (Acris Antibodies) in der Konzentration 1:2000 verwendet (verdünnt in 3%igem PBS). Die Zellen wurden mit 1 ml Antikörperverdünnung pro Kavität 1 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 3%igem PBS wurde 1 ml des Konjugats (Peroxidase-gekoppeltes, polyklonales Ziegenserum (anti-rabbit IgG, Dianova)) in der Konzentration 1:5000 hinzugegeben und 1 h inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 3%igem PBS wurden die Zellen mit 0,5 ml True Blue Peroxidase Substrat (KPL) pro Kavität angefärbt. Schließlich konnten die Plaque-bildenden Einheiten nach 5-10 min ausgezählt werden.

7. Wachstumsanalysen

Die Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der rekombinanten MVA dient sowohl der Überprüfung der Replikationsdefizienz in nicht-permissiven Säugertierzellen, als auch der Sicherstellung, dass die Insertion die Replikation in permissiven Zellen nicht beeinträchtigt.

Für die Generierung einer Wachstumsanalyse wurden in 6-Loch-Zellkulturplatten DF1, HaCaT, Vero und CRFK Zellen ausgelegt und im Doppelansatz infiziert (MOI 0,01). Nach jeweils 0, 4, 12, 24, 48 und 72 Stunden wurden Proben bei -20 °C eingefroren.

Nach dem Abschaben von der Platte durchliefen die Proben dreimal einen Gefrier-Auftau-Zyklus und wurden dann auf CEF-Zellen rücktitriert (siehe 6).

8. Proteinnachweis

8.1. Immunzytochemie

Um die Expression der Parvovirus-Proteine VP1 und VP2 durch die rekombinanten MVA-Viren nachzuweisen, wurden diese mittels Immunfluoreszenz- und Immunperoxidasefärbung dargestellt.

Dazu wurden Vero-Zellen in 24-Loch-Zellkulturplatten ausgelegt und mit den unterschiedlichen rekombinanten MVA bzw. dem Wildtypvirus MVA_F6 als Kontrolle infiziert (jeweils MOI 2). Nach 48 h wurden die Zellen mit einem Aceton/Methanol Gemisch (1:1) fixiert und 15 min bei RT inkubiert. Nach einmaligem Spülen mit PBS folgte die Inkubation mit 250 µl Blocking-Puffer pro Kavität für 30 min bei 37 °C.

Es wurden zwei verschiedene Primärantikörper angewendet: zum einen ein kommerzieller monoklonaler Parvovirus-Antikörper „Mouse Anti Canine/Feline Parvovirus“ (BioRad), zum anderen das polyklonale Probandenserum eines Tigers, welcher an Panleukopenie (FPV_ML2012) erkrankt war. Da es sich um eine indirekte Immunfärbung handelt, wurde der monoklonale Parvovirus-Antikörper mit „Alexa Fluor® 488“ (Thermo Fisher Scientific) bzw. HRP-Protein A (Invitrogen Life Technologies/Thermo Fisher Scientific) detektiert. Alexa ist ein Fluoreszenzgekoppelter Ziege-Anti-Maus-Antikörper. Protein A bindet die schwere Kette von Säugetier-IgGs und ist somit zum Nachweis jeglicher Säugetier-Antikörper geeignet. Durch eine Koppelung an die Meerrettichperoxidase (HRP) können die Proteine

sichtbar gemacht werden. Ebenso erhältlich ist Protein A gekoppelt an das fluoreszierende Fluoresceinisothiocyanat (FITC). Dieses kam bei der Detektion des polyklonalen Tigserums zum Einsatz.

Zusätzlich zur Anti-Parvo-Färbung wurden als Kontrolle Anti-MVA-Färbungen nach demselben Prinzip wie bei der Titerbestimmung (siehe 6) angefertigt.

Der folgenden Abbildung können Konzentrationen, Inkubationszeiten und -temperaturen der einzelnen Antikörper entnommen werden.

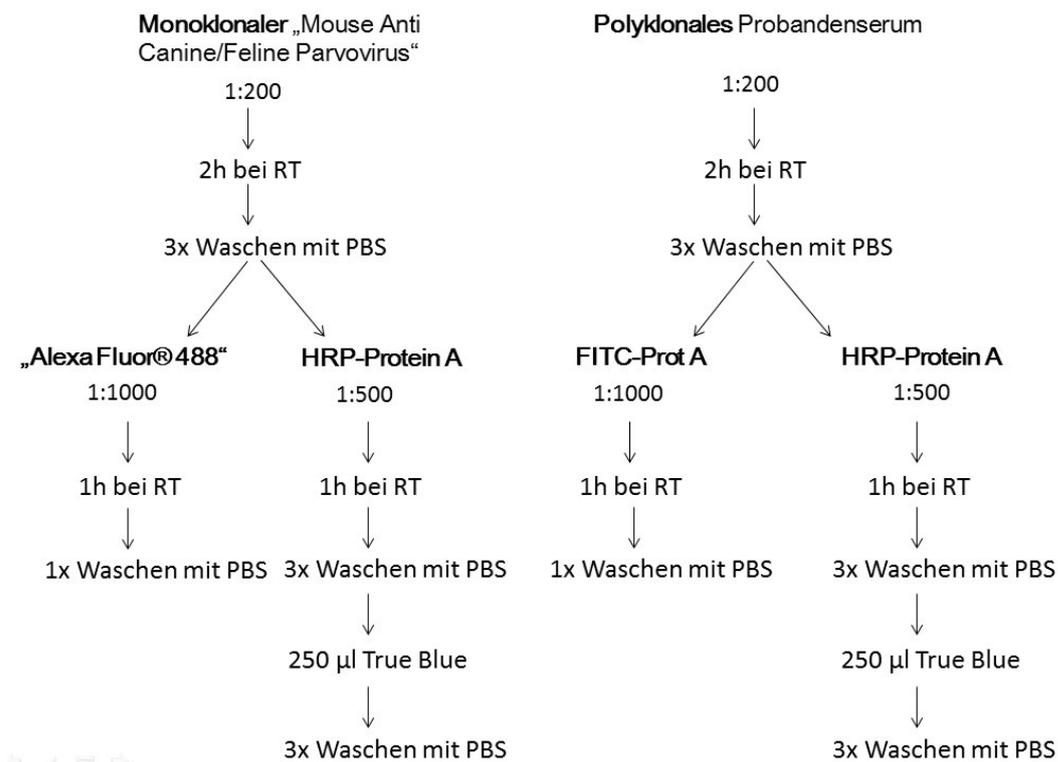


Abbildung 6: Protokoll Immunzytochemie

Schließlich wurden Bilder mit dem Fluoreszenzmikroskop BZ-X710 (Kyocera) angefertigt.

9. Nachweis von Virus-ähnlichen Partikeln (VLP)

9.1. Elektronenmikroskopie

Zur Probengewinnung wurden DF1-Zellen mit den rekombinanten MVA-Viren und MVA_F6 infiziert (MOI 5-10) und nach 24 h geerntet. 10 µl jeder Probe wurden auf ein Kupfer-Grid gegeben. Nach 10 min wurde die Restflüssigkeit mit einem Filterpapier

abgesaugt und eine 2%ige Phosphor-Wolframlösung zur Kontrastierung aufgetragen. Nach 5 min wurde die Schwermetallsalzlösung erneut mit einem Filterpapier aufgesogen und die Probe bei 10.000 bis 60.000-facher Vergrößerung betrachtet (Zeiss Elektronenmikroskop IM10).

10. Hämagglutination

24 h nach der Aussaat wurden DF1- und CRFK-Zellen mit den vier rekombinanten MVA sowie dem Wildtyp-Virus MVA_F6 infiziert (MOI 5). Nach dem Abkratzen der Zellen 24 h *post infectionem* (p.i.) durchliefen diese einen Gefrier-Auftau-Zyklus und wurden dann als Suspension zur Bestimmung des HA-Titers verwendet. Zusätzlich wurden diese Proben rücktitriert, um sicherzustellen, dass in allen Ansätzen die gleiche Menge MVA eingesetzt wurde.

Bei den beiden verwendeten Puffern handelt es sich um boratgepufferte Salzlösung (BBS) und *virus adjusting diluent* (VAD) nach (Clarke & Casals, 1958) und (Senda et al., 1986).

Schweinevollblut in 3,8%igem Na-Citrat wurde zentrifugiert (376 x g, 15 min) und die Erythrozyten dreimal mit Alsever's Solution (Sigma Aldrich) gewaschen. Nach 5-7 Tagen Lagerung bei 4 °C wurden die Erythrozyten mit VAD gewaschen und eine 0,5%ige Erythrozytenlösung in VAD erstellt.

In einer Mikrotiterplatte mit konischem Boden wurden 25 µl BBS vorgelegt und mit jeweils 25 µl Viruszellsuspension eine Log 2-Verdünnungsreihe angelegt. 25 µl DF1- bzw. CRFK-Zellsuspension wurden in die Zellkontrolle gegeben, in die Erythrozytenkontrolle lediglich BBS. Nach einer weiteren Zugabe von 25 µl BBS wurden in jede Kavität 50 µl 0,5%ige Erythrozytenlösung gegeben und 3 h bei 4 °C inkubiert.

Als HA-positiv wurden die Kavitäten gewertet, in denen die Erythrozyten vollständig agglutiniert vorlagen, sodass eine Gitterstruktur aus quervernetzten Erythrozyten den gesamten Querschnitt der Kavität ausfüllte. Die Kavitäten in denen die Erythrozyten nicht agglutiniert wurden, zeigten einen roten Punkt in der Mitte, da sich die Erythrozyten absenkten und am Boden der konischen Kavität sammelten (somit HA-negativ). Der HA-Titer wird als reziproker Wert der höchsten Virusverdünnung angegeben, der eine komplette HA zeigt.

IV. ERGEBNISSE

1. Generierung rekombinanter MVA zur Expression der FPV-Strukturproteine VP1 und VP2

Es wurden vier rekombinante MVA-Viren konstruiert, die die Proteine VP1 und VP2 in Kombination mit zwei verschiedenen Promotoren exprimieren. Als Insertionsstellen wurden die Del III und die Zwischengensequenz I8R-G1L gewählt. Die Konstrukte MVA_PmH5_VP1 und MVA_PmH5_VP2 tragen die Sequenz der Strukturproteine VP1 bzw. VP2 in der Del III. Die Transkription dieser Gene steht unter der Kontrolle des früh-späten Promoters PmH5, der zu den starken synthetischen Promotoren zählt. In die Insertionsstelle I8R-G1L des Konstruktes MVA_P7.5late_VP1 wurde das GOI VP1 inseriert; dieses wird unter dem synthetischen und nur moderat starken Promoter P7.5late abgelesen. Das Doppelkonstrukt MVA_VP1_VP2 exprimiert das Protein VP2 unter dem PmH5 und das Protein VP1 unter dem schwächeren P7.5late. Das VP1 wurde zwischen den für MVA essentiellen Genen I8R und G1L inseriert. Als Insertionsstelle für das VP2 wurde die Del III gewählt.

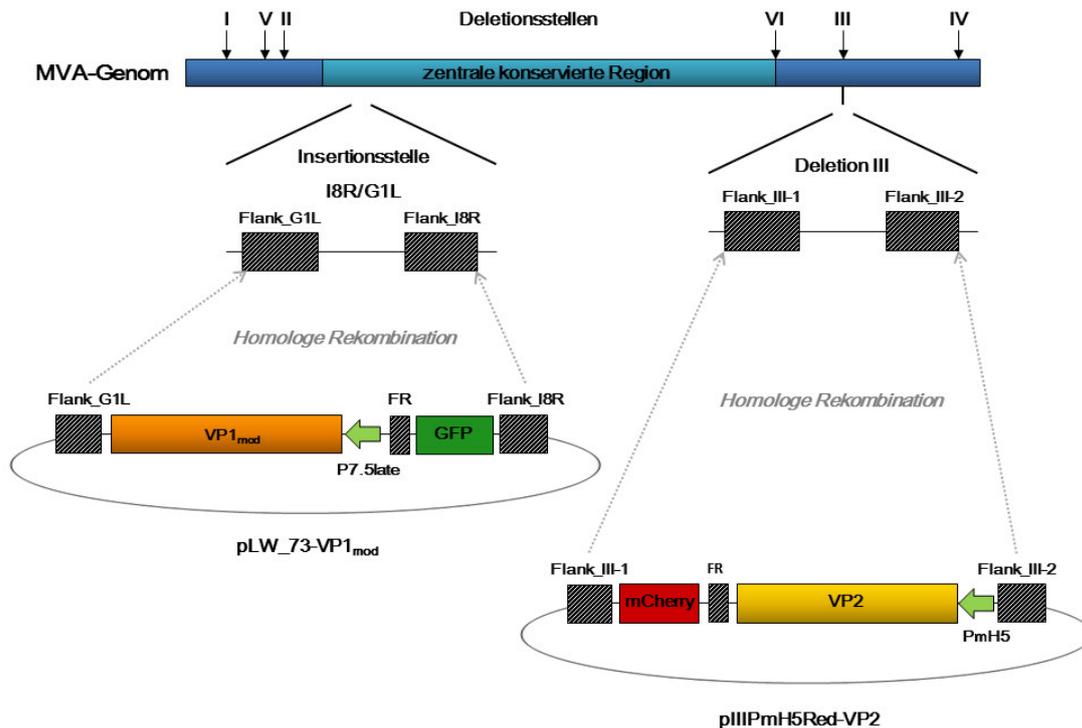


Abbildung 7: Konstruktion des rekombinanten MVA_VP1_VP2. Mit dem Plasmid pIII PmH5Red-VP2 wurde durch homologe Rekombination die Sequenz VP2 gemeinsam mit dem Promoter PmH5 und dem Markergen mCherry zwischen *Flank_III-1* und *Flank_III-2* der Del III inseriert. Die Sequenz des VP1_{mod} mit dem P7.5late und GFP wurde mit Hilfe des Plasmides pLW-73-VP1_{mod} in das rekombinante MVA_PmH5_VP2 zwischen den beiden essentiellen MVA-Genen I8R und G1L positioniert.

1.1. Konstruktion der Vektorplasmide

Die verwendete VP1-Sequenz stammt aus dem Feldisolat FPV_ML2012. Die zweite Zielsequenz, VP1_{mod}, codiert für die gleiche Aminosäuresequenz wie VP1, besitzt aber eine modifizierte Nukleotidabfolge, um homologe Rekombination innerhalb des Doppelkonstruktes MVA_VP1_VP2 zu verhindern. Beide Zielsequenzen wurden mittels der Software SeqBuilder (DNASTAR Inc.) geplant und modifiziert. Nach der Synthese der Plasmide pUC-57-VP1 und pUC-57-VP1_{mod} wurden diese durch Restriktionsanalyse kontrolliert. Die Restriktionsendonukleasen *KpnI* und *Sall* schneiden am Anfang und am Ende des synthetisierten VP1- bzw. VP1_{mod}-Gens. Alle Restriktionsfragmente zeigten die erwarteten Größen (Abbildung 8).

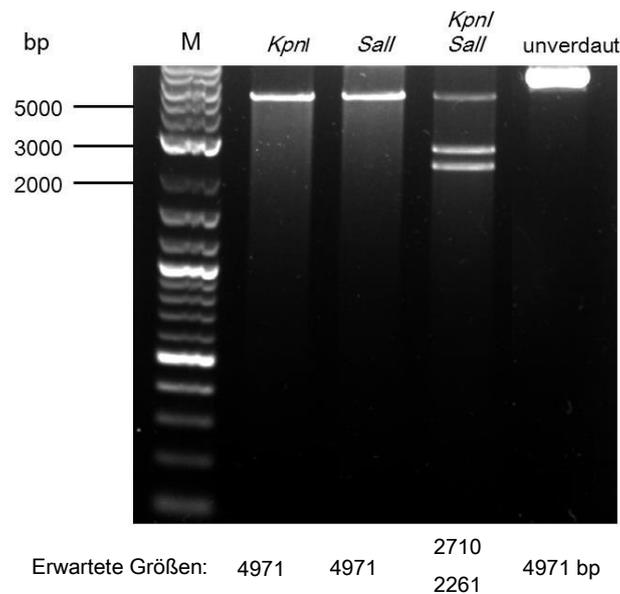


Abbildung 8: Restriktionsanalyse des Plasmids pUC-57-VP1. M=Marker: Quick-Load® 2-Log DNA Ladder. Das pUC-57-VP1 wurde mit den Restriktionsendonukleasen *KpnI* und *Sall* im Einzelverdau linearisiert. Im Doppelverdau mit beiden Restriktionsenzymen konnte die VP1-Sequenz (2261 bp) vom restlichen Vektorplasmid (2710 bp) getrennt dargestellt und auf passende Länge überprüft werden. Zur Visualisierung der einzelnen DNA-Fragmente wurde 1%iges Agarosegel verwendet.

Als Ausgangvektor für die homologe Rekombination wurden zwei Plasmide verwendet. Das pIII_{PmH5}Red enthält die MVA-Gensequenzen, die zur Insertion des GOI in die Del III benötigt werden (*Flank_III-1*, *Flank_III-1 repeat* (FR) und *Flank_III-2*) sowie das Gen für den Fluoreszenzmarker mCherry mit dem vorgeschalteten Promoter P11. Der Promoter PmH5 ist ebenfalls bereits im Plasmid enthalten; er befindet sich direkt vor der *Multiple Cloning Site* (MCS) in die das GOI kloniert wird.

Im pLW-73 sind die *MVA-Flanking-Sequenzen* vorhanden, die eine Insertion zwischen den Genen I8R und G1L ermöglichen, sowie die Sequenz des Selektionsmarkers GFP, ebenfalls unter der Kontrolle des Promoters P11.

Die VP1- und die VP1_{mod}-Sequenz wurden mittels Restriktionsverdau aus den Plasmiden pUC-57-VP1 und pUC-57-VP1_{mod} herausgeschnitten. Das VP1-Gen wurde sowohl in den Vektor pIII_{PmH5}Red als auch in das pLW-73-Plasmid kloniert. Die Restriktionsenzyme wurden so gewählt, dass im fertigen Vektorplasmid dem GOI der passende Promoter vorgeschaltet war. Da das pLW-73 keinen eigenen Promoter vor der MCS besitzt, wurde die vollständige synthetisierte VP1-Zielsequenz (inkl. Promoter P7.5late) mit Hilfe der Restriktionsenzyme *KpnI* und *Sall* in das Plasmid kloniert. Für die Klonierung des VP1 in das pIII_{PmH5}Red wurden die Restriktionsenzyme *BamHI* und *NotI* verwendet, die das VP1-Gen ohne den Promoter

P7.5late ausschneiden (siehe Sequenz im Anhang). Die Zielsequenz VP1_{mod} wurde ebenfalls zusammen mit dem Promoter P7.5late in das Plasmid pLW-73 kloniert.

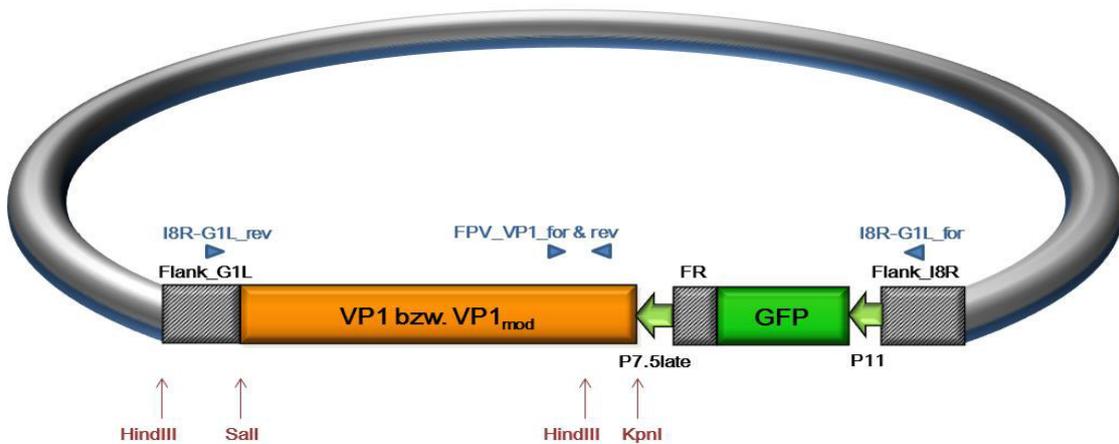


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Vektorplasmide pLW-73-VP1 bzw. pLW-73-VP1_{mod}. Die beiden Plasmide unterscheiden sich lediglich im eingebauten GOI. In Blau sind die Bindungsstellen der Oligonukleotidprimer, die zur PCR-Analyse der Plasmide und der rekombinanten MVA-Konstrukte verwendet wurden, eingezeichnet. Verwendete Restriktionsschnittstellen sind in Rot dargestellt.

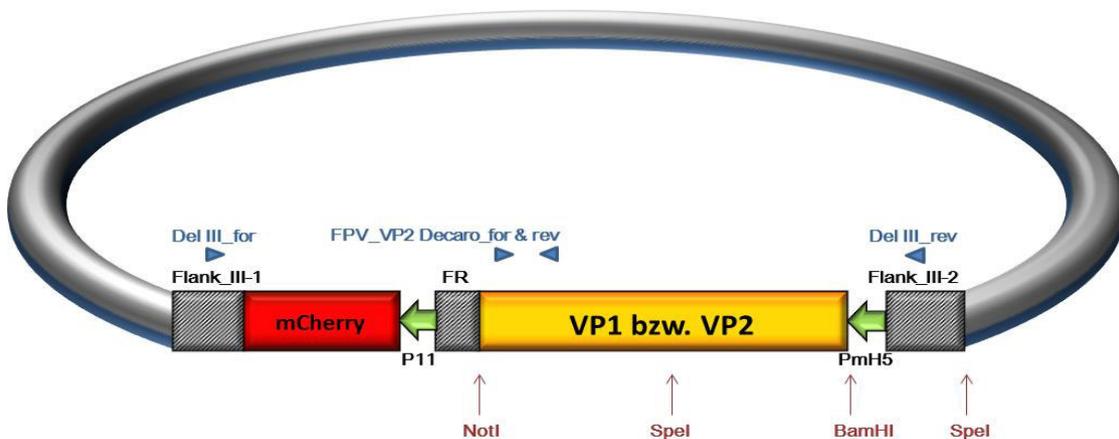


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Vektorplasmide pIIIpMh5Red-VP1 bzw. pIIIpMh5Red-VP2. Die beiden Plasmide unterscheiden sich lediglich im eingebauten GOI. In Blau sind die Bindungsstellen der Oligonukleotidprimer, die zur PCR-Analyse der Plasmide und der rekombinanten MVA-Konstrukte verwendet wurden, eingezeichnet. Verwendete Restriktionsschnittstellen sind in Rot dargestellt.

Die Sequenz des VP2 wurde mittels PCR aus dem pUC-57-VP1 generiert (Abbildung 11). Hierfür wurden spezielle Oligonukleotidprimer konstruiert (FPV_VP2_for und

FPV_VP2_rev, siehe 4.2.3.1). FPV_VP2_for ist zusammengesetzt aus einer kurzen Überhang-Sequenz (AGCTA), einer Restriktionsschnittstelle für *Bam*HI (GGATCC), der Sequenz ACC (Kozak, 1981) und schließlich der Startregion des VP2-Gens. FPV_VP2_rev bildet den Komplementärstrang zum Ende der synthetisierten VP1-Sequenz inkl. der Restriktionsschnittstelle *Not*I (GCGGCCGC) (siehe Sequenz unter 4.2.3.1.).

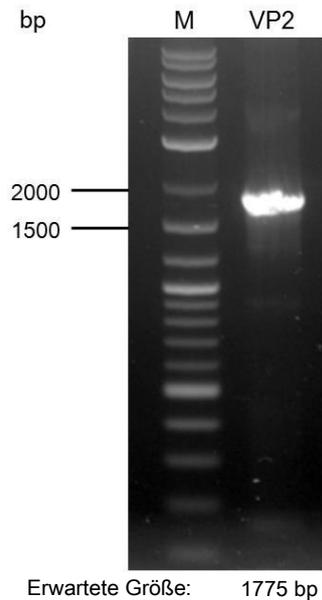


Abbildung 11: PCR-Amplifikation des VP2-Gens aus dem pUC-57-VP1. M=Marker: Quick-Load® 2-Log DNA Ladder. Es wurden die Primer FPV_VP2_for und FPV_VP2_rev verwendet, die vor und nach der VP2-Sequenz Restriktionsschnittstellen für *Bam*HI bzw. *Not*I generieren. Gelelektrophoretische Auftrennung im 0,8%igem Agarosegel zur Isolierung und Aufreinigung der DNA-Bande.

Die VP2-spezifische DNA wurde aus dem präparativen Gel gewonnen und mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Not*I in das Vektorplasmid pIIIpMh5Red kloniert.

1.2. Charakterisierung der Plasmide

Bei allen rekombinanten Vektorplasmiden wurde mit Hilfe einer PCR und einer Restriktionsanalyse mit verschiedenen Endonukleasen die korrekte Insertion des GOI bestätigt. Bei der PCR wurden die Oligonukleotidprimer der vorgesehenen Insertionsstelle (I8R-G1L_for/rev bzw. Del III_for/rev) und die Insertprimer (FPV_VP2 Decaro_for/rev), welche einen kurzen Abschnitt im VP2-Gen (respektive auch im VP1) amplifizieren, verwendet. Beim Restriktionsverdau wurde das GOI mit den beiden Enzymen, die auch bei der Klonierung zum Einsatz gekommen waren (*Bam*HI/*Not*I bzw. *Kpn*I/*Sal*I), aus dem Plasmid geschnitten und mittels Agarosegel dargestellt. Außerdem wurde ein Restriktionsenzym verwendet, das einmal im GOI und einmal im restlichen Plasmid schneidet. Beim pIIIpMh5Red-VP1 bzw. -VP2 handelte es sich um *Spe*I, bei den rekombinanten pLW-73-Plasmiden um *Hind*III (siehe Abbildungen 9 und 10). Durch deren Verwendung im Kontrollverdau kann sichergestellt werden, dass das GOI in korrekter Ableserichtung inseriert worden ist. Bei allen Konstrukten konnten die

erwarteten Fragmentgrößen und somit auch die korrekte Insertion des GOI dargestellt werden.

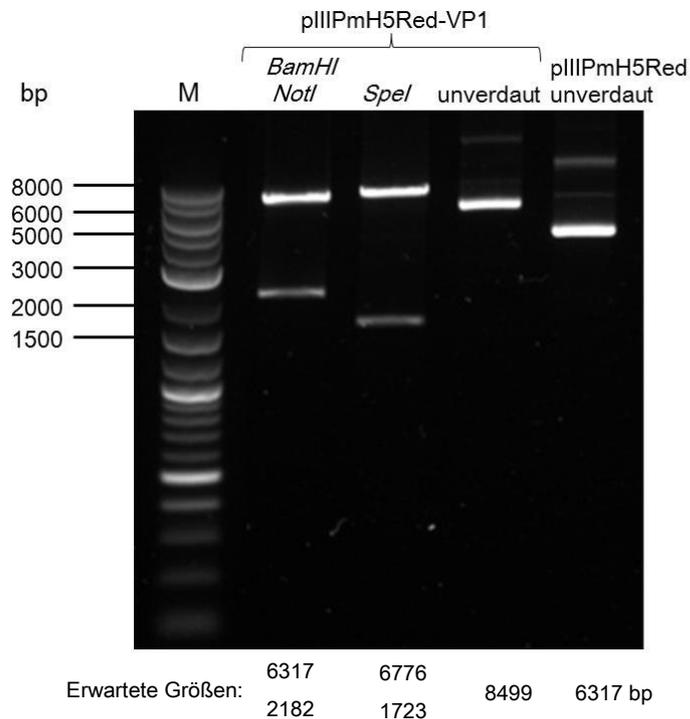


Abbildung 12: Restriktionsanalyse des Vektorplasmids pIIIpMh5Red-VP1. M=Marker: Quick-Load® 2-Log DNA Ladder. *Bam*HI und *Not*I trennen die VP1-Sequenz (2182 bp) von dem Vektor pIIIpMh5Red (6317 bp). *Spe*I schneidet jeweils einmal im GOI und im Plasmid, dabei entstehen 6776 bp bzw. 1723 bp große Fragmente. Zur Kontrolle dient das unbehandelte Plasmid pIIIpMh5Red mit oder ohne GOI. Zur Darstellung wurde 1%iges Agarosegel verwendet.

1.3. Generierung und klonale Isolierung rekombinanter MVA-Viren

Die vier auf die korrekte Integration des GOI überprüften Vektorplasmide wurden zur Generierung der rekombinanten MVA-Konstrukte mittels Transfektion/Infektion verwendet. MVA_PmH5_VP1 und MVA_PmH5_VP2 basieren auf den Plasmiden pIIIpMh5Red-VP1 und pIIIpMh5Red-VP2. Als Ausgangsvirus wurde in der Transfektion/Infektion das MVA_GFP verwendet, dessen Del III eine GFP-Sequenz enthält. Bei der homologen Rekombination wird das VP1 bzw. VP2-Gen zusammen mit dem Markergen mCherry in die Del III des MVA-Genoms eingebaut, während das GFP deletiert wird. Somit konnte beim Ausgangsvirus MVA_GFP eine grüne Fluoreszenz der infizierten Zellen festgestellt werden, während das Konstrukt nach erfolgreicher Rekombination mCherry exprimierte. Diese roten Plaques wurden klonal selektiert. Analog dazu wurde für die Generierung des MVA_P7.5late_VP1

MVA_mCherry (mCherry zwischen I8R und G1L) als Ausgangsvirus und das pLW-73-VP1 (inkl. GFP-Gen) als Vektorplasmid gewählt. Das Doppelkonstrukt basiert auf einer Infektion mit dem fertigen rekombinanten MVA-Konstrukt MVA_PmH5_VP2, in dessen Insertionsstelle I8R-G1L bei der Transfektion das VP1_{mod}-Gen mit Hilfe des Vektorplasmids pLW-73-VP1_{mod} inseriert wurde. Die Isolierung der rekombinanten Virusklone erfolgte über Farbselektion und anschließendem Plaque-Picking (siehe Abbildung 13).

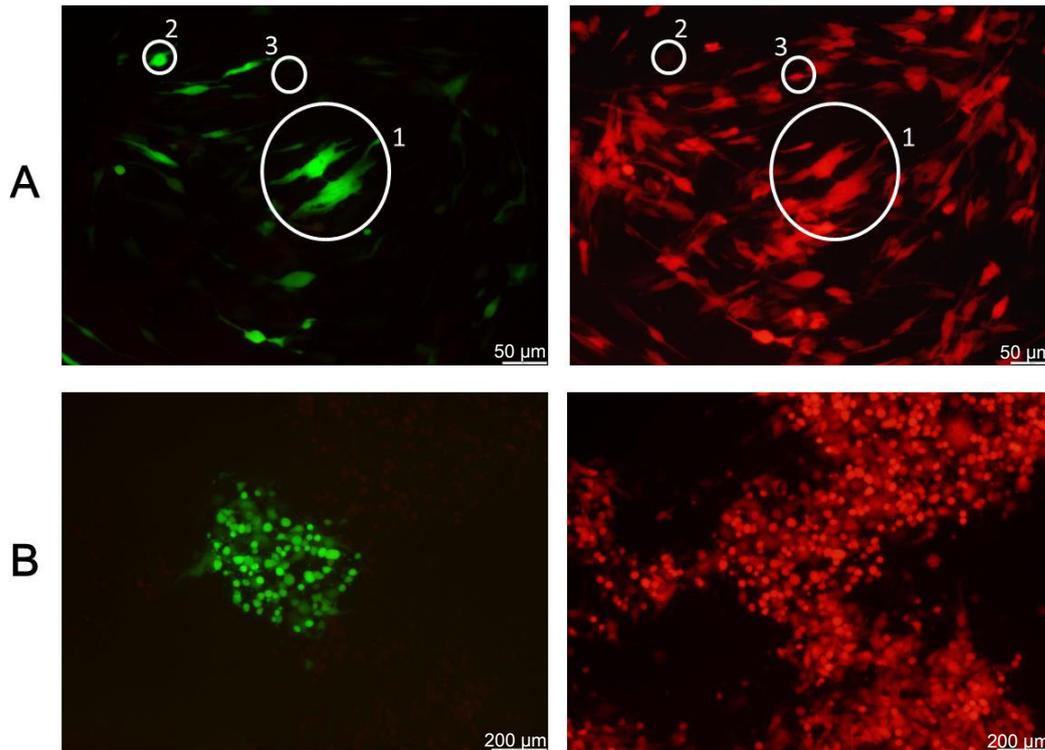


Abbildung 13: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen transfizierter DF1-Zellen mit selektiven Farbfiltern. Zur Generierung des Doppelkonstruktes MVA_VP1_VP2 wurden Zellen mit MVA_PmH5_VP2 (rot) infiziert (MOI 0,1) und mit dem Vektorplasmid pLW-73-VP1_{mod} (grün) transfiziert.

A: Transfektion/Infektion 24 h p.i. 1) Infizierte Zellen, in denen sowohl mCherry (rot) als auch GFP (grün) exprimiert wird. Mit MVA_PmH5_VP2 infizierte (mCherry-Expression) und pLW-73-VP1_{mod} transfizierte Zellen (GFP-Expression) sind die Voraussetzung für die homologe Rekombination. 2) Infizierte Zelle, die nur GFP exprimiert. Durch homologe Rekombination von *Flank*- und *Flank repeat*-Sequenzen kann das mCherry-Gen des MVA_PmH5_VP2 deletiert werden. Bei erfolgreicher Rekombination eines MVA_PmH5_VP2 ohne Markergen mit dem pLW-73-VP1_{mod} wird nur GFP exprimiert. 3) Rot fluoreszierende Zelle, die mit MVA_PmH5_VP2 infiziert ist, in der keine Rekombination stattgefunden hat.

B: MVA_VP1_VP2-infizierte Zellen in der ersten Plaquepassage (96 h p.i.). Es wird eine ausgeprägte Plaquebildung mit CPE deutlich. Für gewöhnlich wurden die Plaques bereits nach 24-48 h p.i. gepickt.

Zur Kontrolle der gepickten Virusklone wurden PCR-Analysen der Insertionsstellen und der Inserts durchgeführt, um die korrekte Insertion des GOI und die erfolgreiche Elimination des Ausgangsvirus zu bestätigen. Im Anschluss konnte mit einer gezielten Vermehrung der nicht-fluoreszierenden Klone begonnen werden, welche durch homologe Rekombination zwischen *Flank_III-1* und FR ihr Fluoreszenz-Gen eliminiert hatten. War in der Viruspräparation keine Fluoreszenz mehr erkennbar, wurde die genetische Integrität nochmals mittels PCR bestätigt und durch Amplifikation und Sucrose-Aufreinigung Virusstocks hergestellt.

2. Charakterisierung der rekombinanten MVA-Viren

2.1. Nachweis der genetischen Stabilität

Mit den aufgereinigten Virusstocks wurde zur finalen Feststellung der genetischen Reinheit und Stabilität eine PCR-Analyse durchgeführt, bei der mit Hilfe der Oligonukleotidprimer Del I-VI_for und _rev (siehe 4.2.3.1.) alle sechs Deletionsstellen des rekombinanten MVA dargestellt werden. Bei den Konstrukten, die das GOI in der I8R-G1L tragen, wurde diese Insertionsstelle ebenfalls mit der PCR (Oligonukleotidprimer: I8R-G1L_for und rev) charakterisiert. Als Vergleich wurde das Wildtyp-MVA_F6 herangezogen (siehe Abbildung 14). Alle vier rekombinanten Konstrukte zeigten in der PCR-Analyse der sechs Deletionsstellen und der Insertionsstelle I8R-G1L die erwarteten Fragmentgrößen (siehe Abbildungen 15-18).

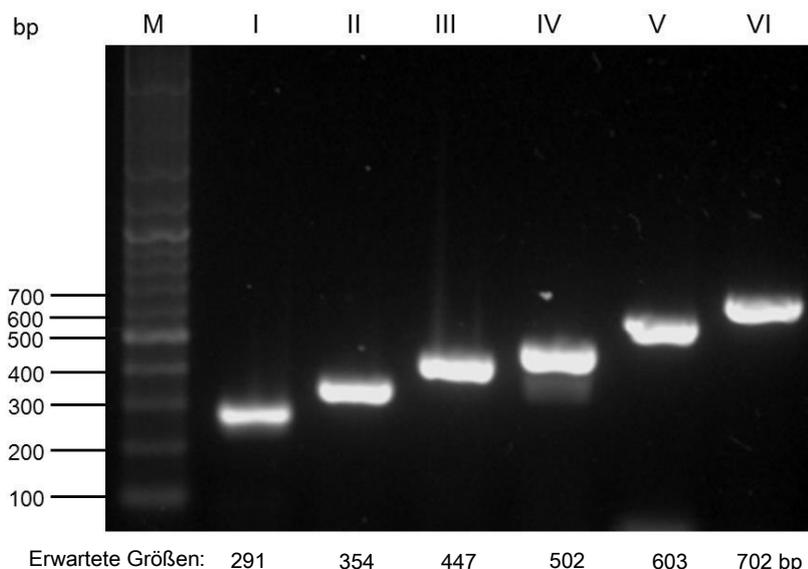


Abbildung 14: PCR-Analyse der sechs Deletionsstellen des MVA_F6. M=Marker: Quick-Load® 2-Log DNA Ladder. I-VI: Del I-Del VI

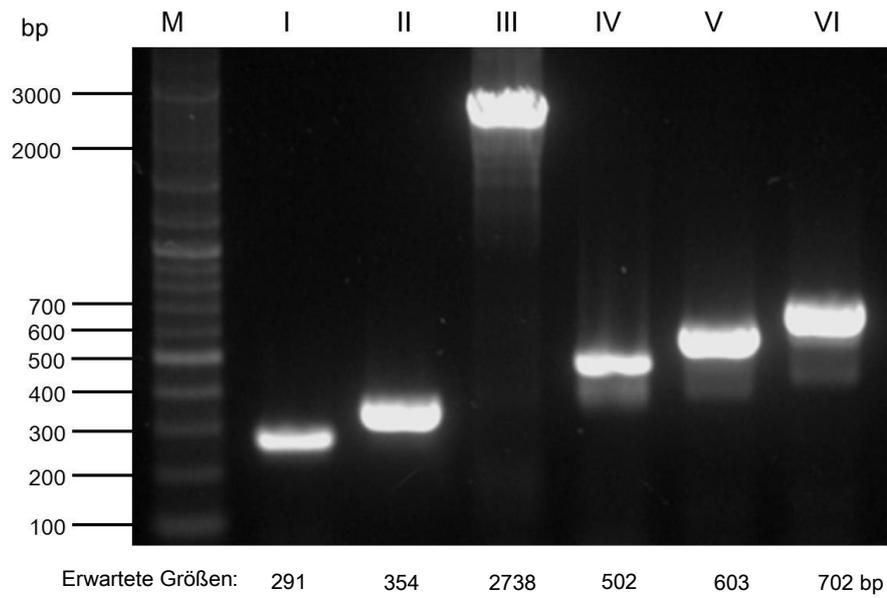


Abbildung 15: PCR-Analyse der sechs Deletionsstellen des MVA_PmH5_VP1. M=Marker: Quick-Load® 2-Log DNA Ladder. I-VI: Del I-Del VI

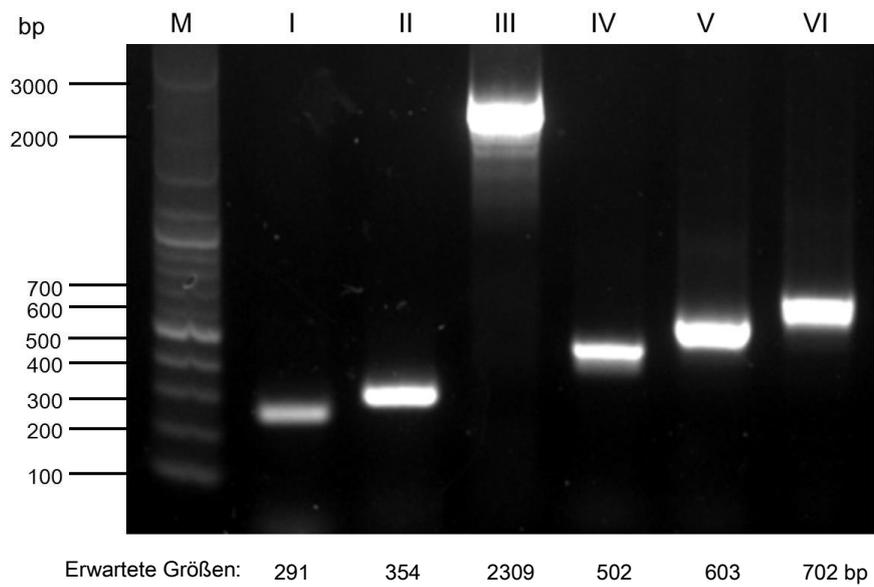


Abbildung 16: PCR-Analyse der sechs Deletionsstellen des MVA_PmH5_VP2. M=Marker: Quick-Load® 2-Log DNA Ladder. I-VI: Del I-Del VI

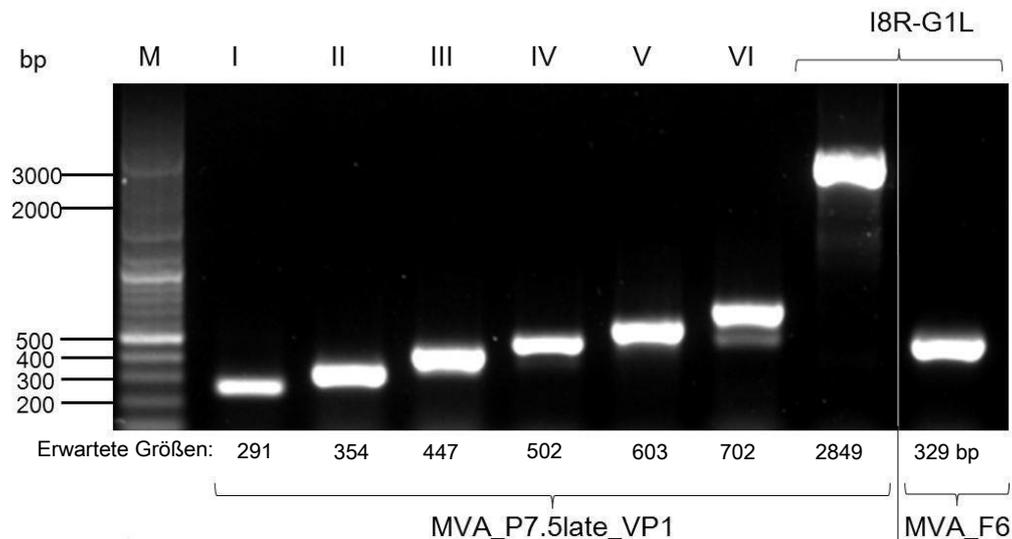


Abbildung 17: PCR-Analyse der sechs Deletionsstellen und der Insertionsstelle I8R-G1L des MVA_P7.5late_VP1. M=Marker: Quick-Load® 2-Log DNA Ladder. I-VI: Del I-Del VI. Zum Vergleich wurde auch das I8R-G1L-Amplifikationsprodukt des MVA_F6 dargestellt.

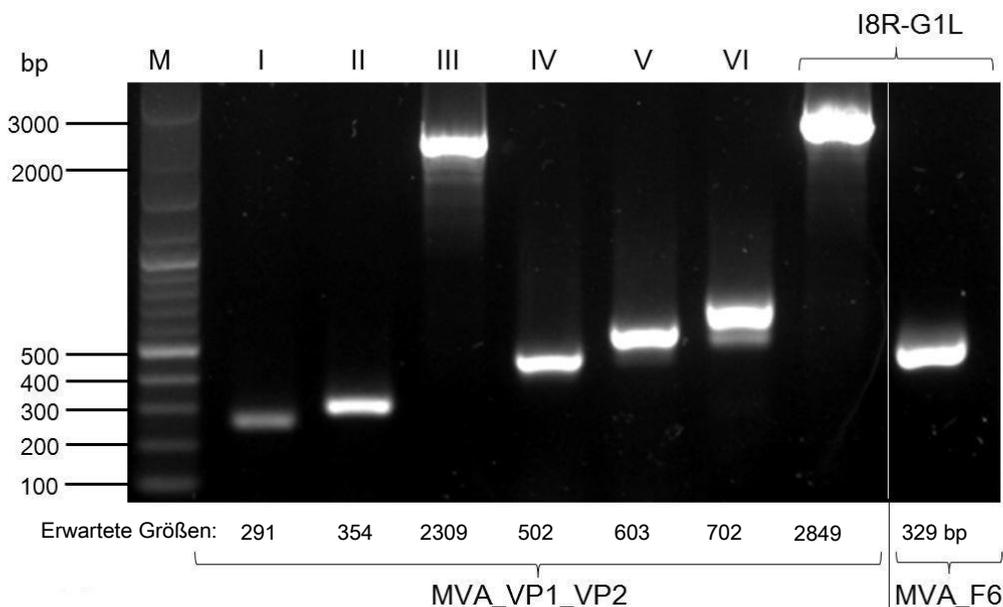


Abbildung 18: PCR-Analyse der sechs Deletionsstellen und der Insertionsstelle I8R-G1L des MVA_VP1_VP2. M=Marker: Quick-Load® 2-Log DNA Ladder. I-VI: Del I-Del VI. Zum Vergleich wurde auch das I8R-G1L-Amplifikationsprodukt des MVA_F6 dargestellt.

Als zusätzliche Absicherung wurde eine Insert-PCR mit allen Konstrukten durchgeführt. Hierfür wurden verschiedene Oligonukleotidprimer verwendet, die das GOI spezifisch darstellen. Die Primer FPV_VP2_Decaro_for und _rev amplifizieren eine 100 bp lange Sequenz im VP2 (somit auch im VP1) des CPV- bzw.

FPV-Genoms. Sie werden auch in der Diagnostik zur Detektion des karnivoren Protoparvovirus verwendet (Decaro et al., 2005a). Die Primer FPV_VP1_for und _rev binden an einer 219 bp-langen Sequenz im VP1-spezifischen Abschnitt, der nicht im VP2-Gen enthalten ist. Beide Oligonukleotide binden auch im VP1_{mod}-Gen des Doppelkonstruktes, da dessen Sequenz erst ab dem Startcodon des VP2-Gens modifiziert wurde. Um auch die Insertion des modifizierten Teils der VP1_{mod} zu bestätigen, wurden die Primer FPV_VP1_{mod}_for und _rev verwendet. Bei allen Konstrukten konnte gezeigt werden, dass die Zielsequenz korrekt inseriert worden ist (siehe Abbildung 19).

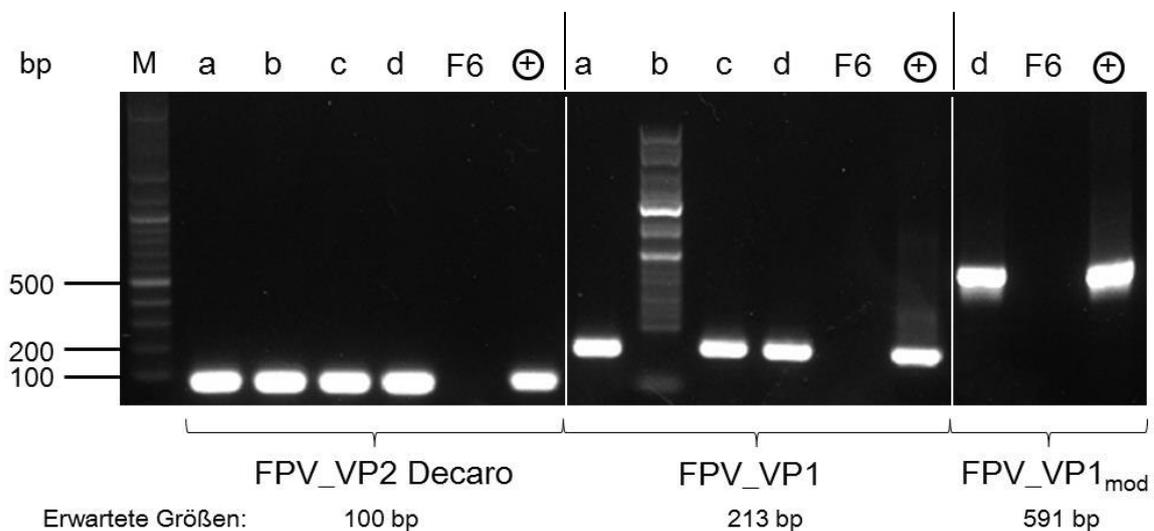


Abbildung 19: Insert-PCR der finalen MVA-Konstrukte. a: MVA_PmH5_VP1; b: MVA_PmH5_VP2; c: MVA_P7.5late_VP1; d: MVA_VP1_VP2; F6: MVA_F6. ⊕ : Positivkontrolle (FPV_ML2012 bei FPV_VP2 Decaro und FPV_VP1 bzw. Plasmid pLW-73-VP1_{mod} bei FPV_VP1_{mod})

2.2. Wachstumsanalyse

Eine Mehrstufen-Wachstumsanalyse diente der Untersuchung des Wachstumsverhaltens der vier rekombinanten MVA. Dadurch lässt sich die Replikationsdefizienz in nicht-permissiven Zellen darstellen, sowie nachweisen, dass die Vermehrungsfähigkeit in permissiven Produktionszelllinien durch die Insertion eines Fremdgens nicht beeinträchtigt wird. Durch die Infektion mit niedriger MOI (0,01) kann die Vermehrung der Viren in mehreren Replikationszyklen dargestellt werden. Bei den verwendeten Zielzellen handelte es sich um DF1, Vero, HaCaT und CRFK. Die Proben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. geerntet und auf CEF-Zellen rücktitriert.

Die Wachstumskurven der vier rekombinanten MVA-Konstrukte zeigen im Vergleich zum Wildtyp-Virus MVA_F6 einen sehr ähnlichen Verlauf (siehe Abbildung 20). Bei allen Zelllinien lag der Titer direkt nach der Infektion zwischen 10^2 und 10^3 pfu/ml. 4 h p.i. ist bei allen Viren eine leichte Reduktion des Titers erkennbar. Ab dem Zeitpunkt 12 p.i. werden Unterschiede zwischen den Zelllinien HaCaT, Vero, CRFK und der permissiven Zelllinie DF1 deutlich. In infizierten DF1-Zellen steigt der Virustiter bei allen getesteten MVA auf einen Wert von 10^6 bis 10^7 pfu/ml an und erreicht nach ca. 48 h ein Plateau. In CRFK und HaCaT-Zellen überschreitet der Titer zu keinem Zeitpunkt die Marke von 10^3 pfu/ml. In Vero-Zellen kann ein geringer Titeranstieg bei Infektion mit dem Wildtyp MVA_F6 sowie dem rekombinanten MVA_P7.5late_VP1 beobachtet werden, während das Wachstumsverhalten der anderen Konstrukte eher dem in nicht-permissiven Zelllinien ähnelt.

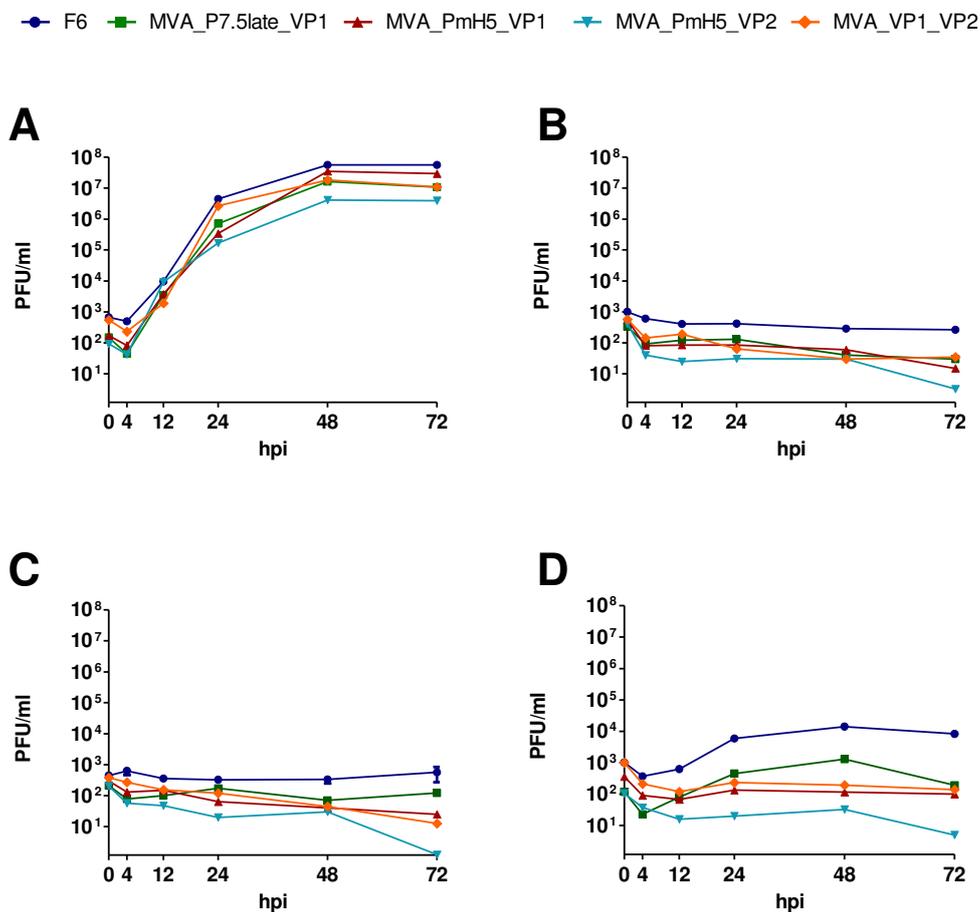


Abbildung 20: Mehrstufen-Wachstumsanalysen der rekombinanten MVA-Konstrukte im Vergleich zum Wildtypvirus MVA_F6. Die Infektion erfolgte mit einer MOI von 0,01. Es werden die Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente dargestellt. **A:** DF1 **B:** CRFK **C:** HaCaT **D:** Vero

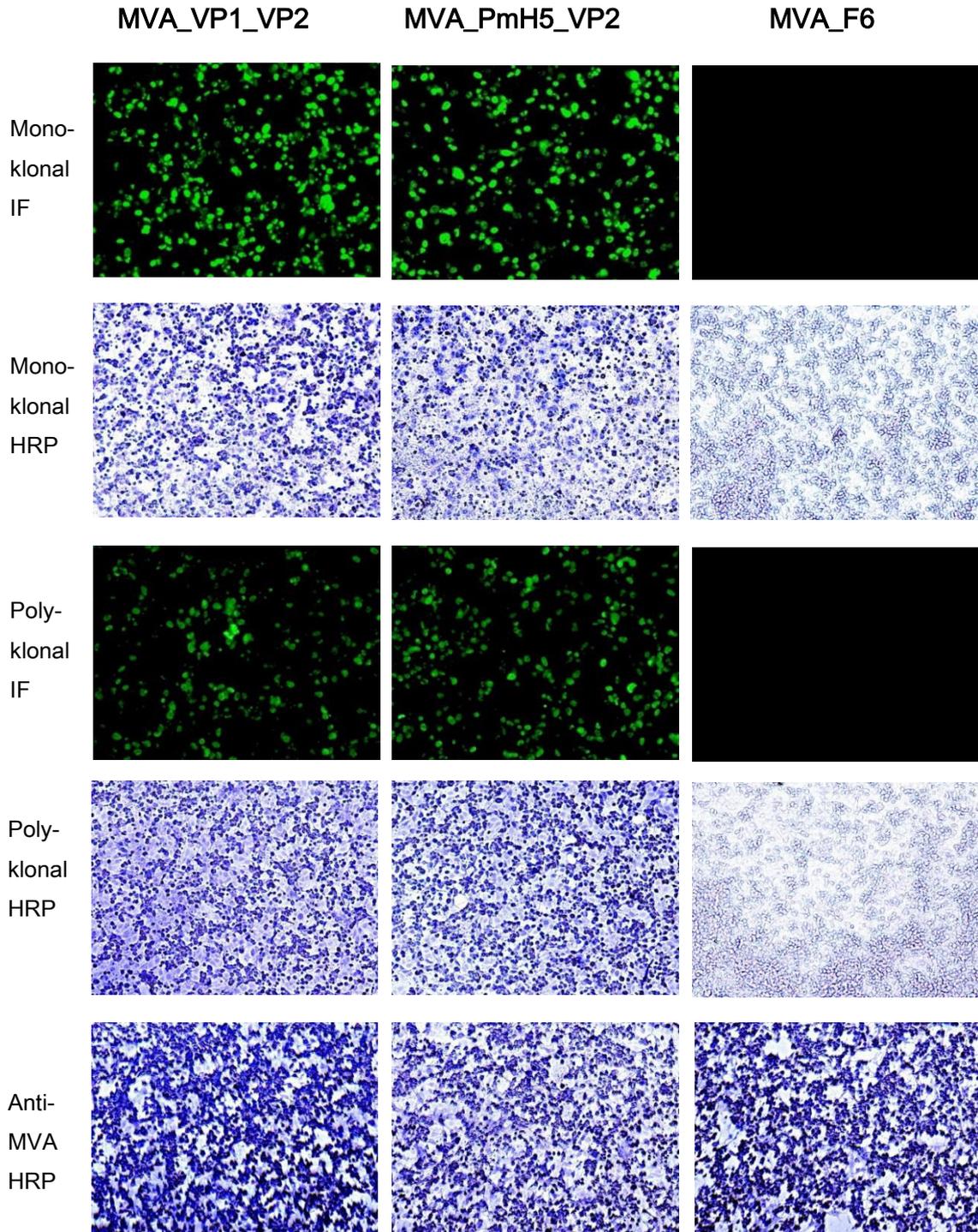
3. Analyse der Expression rekombinanter Proteine

3.1. Immunzytochemie

Um nachzuweisen, dass die rekombinanten MVA das GOI nicht nur in ihr Genom integriert haben, sondern auch in der Lage sind die entsprechenden Proteine (VP1 bzw. VP2) zu exprimieren, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung und eine Immunperoxidasefärbung durchgeführt (siehe Abbildung 21).

Hierfür wurden Verozellen mit den vier rekombinanten Konstrukten (MVA_VP1_VP2, MVA_PmH5_VP2, MVA_PmH5_VP1 und MVA_P7.5late_VP1) und MVA_F6 als Kontrolle infiziert (MOI 2). Nach 48 h wurden die Zellen fixiert und gefärbt. Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte mit dem monoklonalen „Mouse Anti Canine/Feline Parvovirus“-Antikörper bzw. einem polyklonalen FPV-Patientenserum und dem grün fluoreszierenden Sekundärantikörper „Alexa Fluor® 488“ bzw. FITC-gekoppelten Protein A. Zur Immunperoxidasefärbung wurde HRP-Protein A als Konjugat verwendet.

Bei allen vier rekombinanten Konstrukten konnte eine Fluoreszenz bzw. Peroxidase-Färbung sowohl mit polyklonalem als auch mit monoklonalem Antikörper nachgewiesen werden, was auf das Vorhandensein von parvoviralen Strukturproteinen schließen lässt. Die Kontrollen MVA_F6 und die Zellkontrolle zeigten in der Anti-Parvo-Färbung keine Reaktion. Mittels MVA-spezifischer Färbung wurde sichergestellt, dass in allen Ansätzen die gleiche Menge MVA eingesetzt wurde.



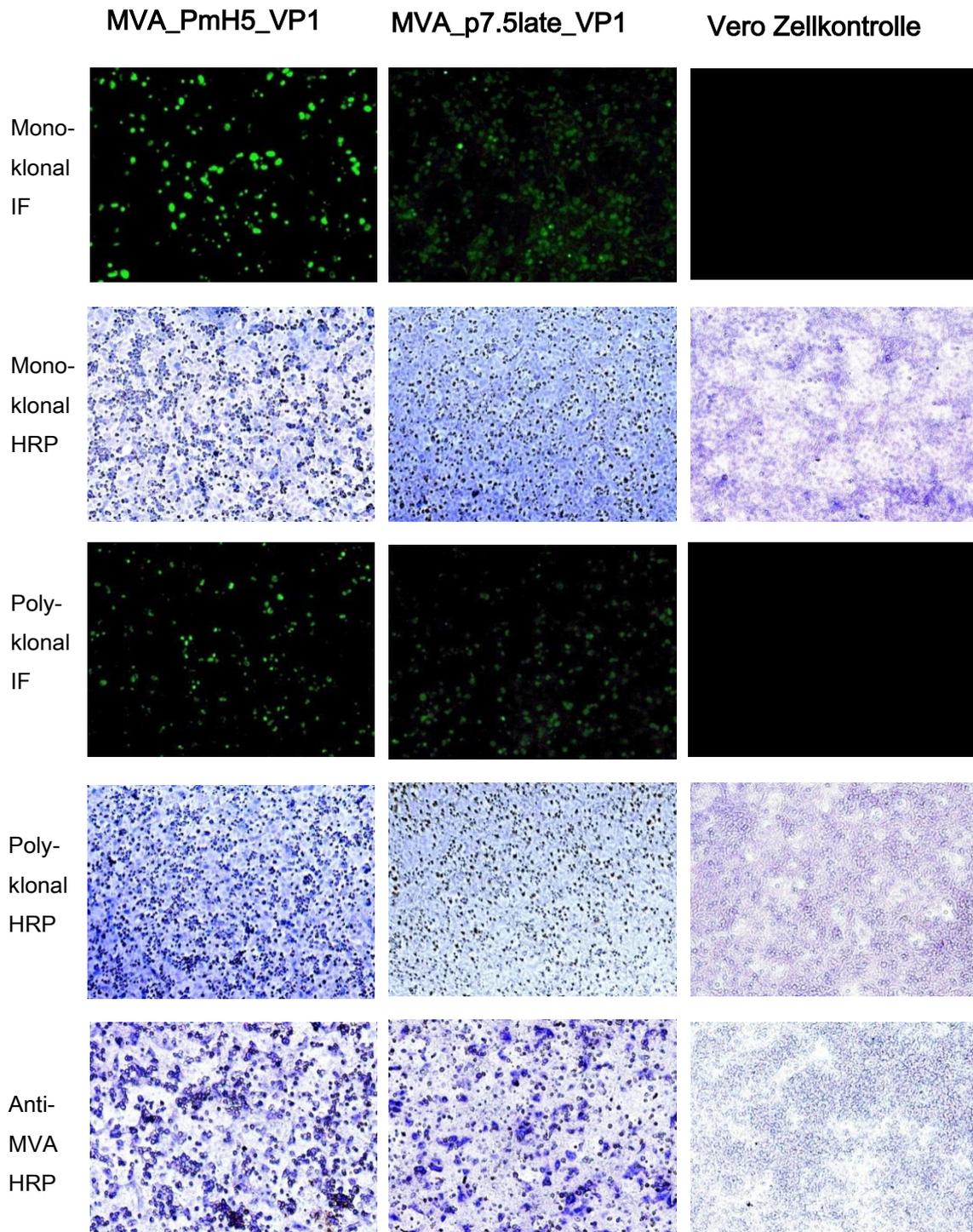


Abbildung 21: Immunzytochemie der FPV-Strukturproteine in infizierten Vero-Zellen. Die Infektion erfolgte mit den rekombinanten MVA-Konstrukten und einer MOI von 2. Als Negativkontrollen dienten MVA_F6 und nicht-infizierte Vero-Zellen. Zusätzlich wurde eine Anti-MVA-Färbung durchgeführt. Als primäre Antikörper wurden sowohl ein monoklonaler Anti-Parvo-Antikörper (Zeile 1+2), als auch ein polyklonales Probandenserum (Zeile 3+4) verwendet und diese jeweils mit einem Fluoreszenz- bzw. Peroxidase-gekoppelten Konjugat detektiert. Zellen, in denen VP1 bzw. VP2 exprimiert werden, sind grün (Immunfluoreszenz, IF) bzw. blau (Immunperoxidasefärbung, HRP) gefärbt. Vergrößerung: Fluoreszenz-Färbung 20x; Peroxidase-Färbung 10x.

4. Bildung Virus-ähnlicher Partikel (VLP)

Nachdem mit der Immunzytochemie die FPV-spezifischen Antigene in Vektorvirus-infizierten Zellen nachgewiesen werden konnten, wurde elektronenmikroskopisch untersucht, ob sich die entstandenen VP1- und VP2-Proteine selbstständig zu Parvovirus-ähnlichen Kapsiden zusammenlagern und somit VLP entstehen. Es wurden DF1-Zellen mit einer MOI von 5 bzw. 10 infiziert und nach 24 h Proben gewonnen.

Bei der Koinfektion mit den rekombinanten Viren MVA_PmH5_VP2 und MVA_PmH5_VP1 waren VLP zu finden (siehe Abbildung 22). Auch bei Infektion mit den rekombinanten Viren MVA_VP1_VP2 und MVA_PmH5_VP2 konnten VLP in großer Menge dargestellt werden (sowohl bei MOI 5 als auch bei MOI 10, siehe Abbildung 23+24). Der Durchmesser der gefundenen Kapside lag zwischen 20 und 24 nm. Bei alleiniger Infektion mit MVA_PmH5_VP1 konnten keine Parvovirus-ähnlichen Strukturen gefunden werden (siehe Abbildung 25). Als Positivkontrolle diente die Kotprobe einer mit FPV_ML2012 infizierten Katze (siehe Abbildung 26).

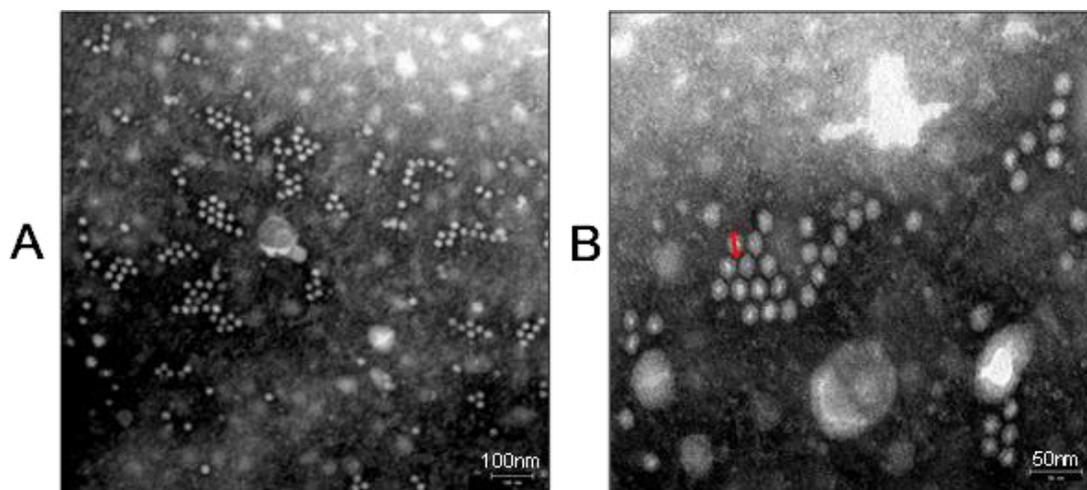


Abbildung 22: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von MVA_PmH5_VP2- und MVA_PmH5_VP1-infizierten DF1-Zellen (MOI 10). **A:** Übersichtsaufnahme **B:** Nahaufnahme der VLP. \varnothing 24 nm

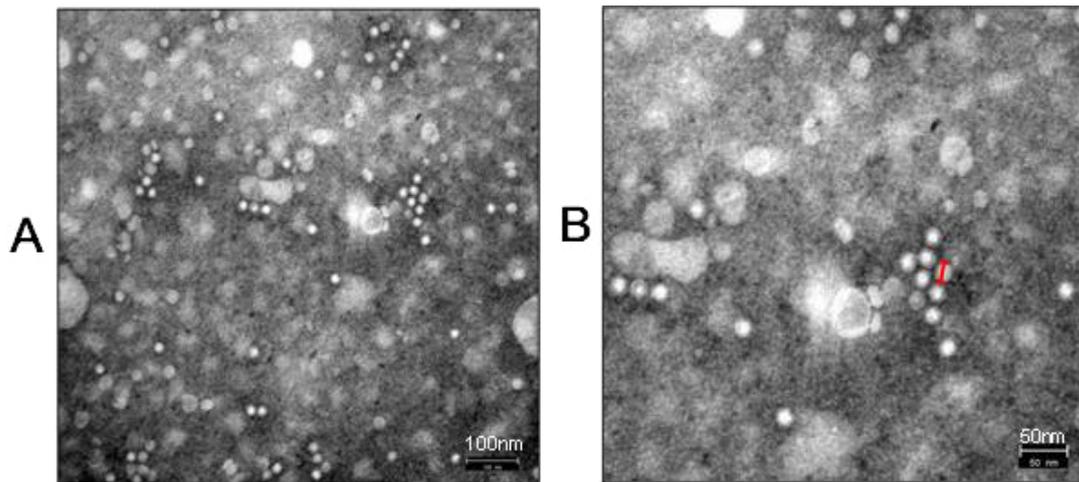


Abbildung 23: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von MVA_VP1_VP2-infizierten DF1-Zellen (MOI 5). **A:** Übersichtsaufnahme **B:** Nahaufnahme der VLP. \varnothing 23 nm

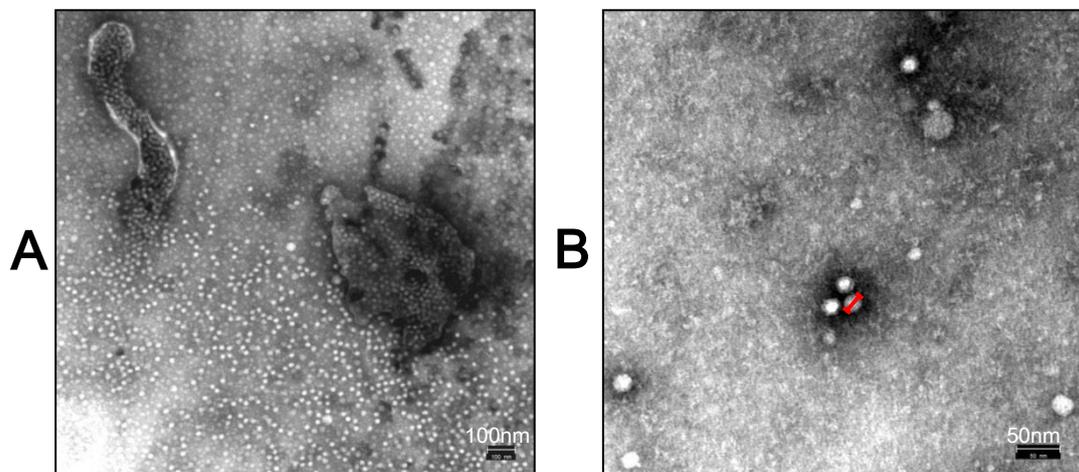


Abbildung 24: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von MVA_PmH5_VP2-infizierten DF1-Zellen (MOI 10). **A:** Übersichtsaufnahme **B:** Nahaufnahme der VLP. \varnothing 23 nm

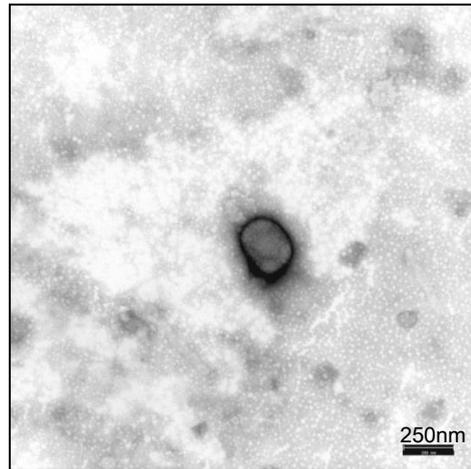


Abbildung 25: Elektronenmikroskopische Aufnahme von MVA_PmH5_VP1-infizierten DF1-Zellen (MOI 5). Keine VLP-Formation nachweisbar. Im Zentrum ist ein typisches Pockenvirion (MVA) zu erkennen.

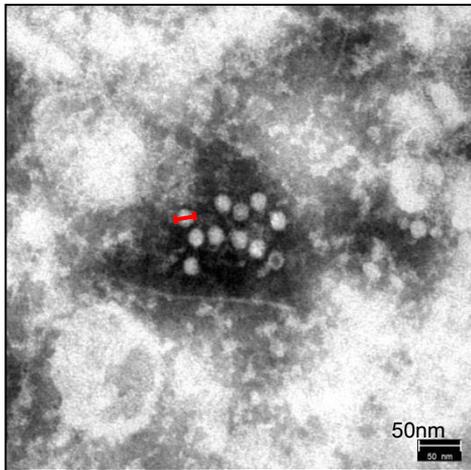


Abbildung 27: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer FPV_ML2012-haltigen Kotprobe. \varnothing 22 nm

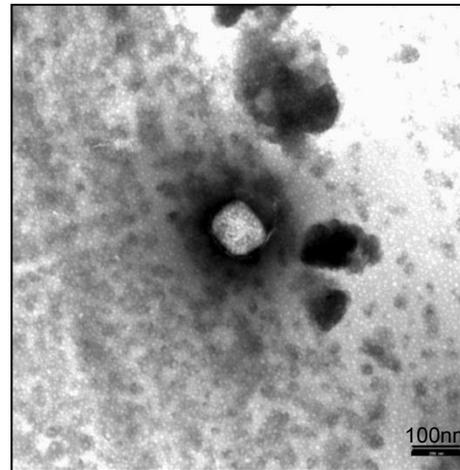


Abbildung 26: Elektronenmikroskopische Aufnahme von MVA_F6-infizierten DF1-Zellen (MOI 5).

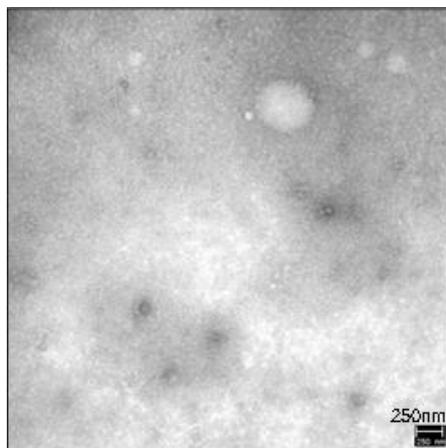


Abbildung 28: Elektronenmikroskopische Aufnahme nicht-infizierter DF1-Zellen

5. Hämagglutination (HA)

Um die von den vier rekombinanten MVA exprimierten Proteine auf ihre Fähigkeit der HA zu testen, wurden DF1- bzw. CRFK-Zellen mit den vier Konstrukten sowie mit MVA_F6 infiziert (MOI 5). Die Proben wurden nach 24 h gewonnen und der HA-Test durchgeführt. Der HA-Titer wird als reziproker Wert der höchsten Virusverdünnung angegeben, der eine komplette HA zeigt.

Die bei Infektion mit dem Doppelkonstrukt MVA_VP1_VP2 exprimierten Proteine waren sowohl in infizierten DF1-Zellen als auch in infizierten CRFK Zellen in der Lage eine HA auszulösen. Jedoch waren deutliche Unterschiede im HA-Titer erkennbar (DF1 4096, CRFK 512). Bei der Infektion mit MVA_PmH5_VP2 entstanden ebenfalls Proteine, die die gleichen HA-Titer wie das Doppelkonstrukt erzielten. Nach Infektion mit den Konstrukten MVA_PmH5_VP1 und MVA_P7.5late_VP1 führten die entstandenen VP1-Proteine mit einem Wert von 16 bzw. 1 in DF1-Zellen zu deutlich niedrigeren HA-Titern, während sie in CRFK-Zellen gar keine HA hervorriefen. Die mit MVA_F6 infizierte Zellsuspension sowie die Zellkontrolle als auch die Erythrozytenkontrolle zeigten ebenfalls keine HA. Durch Rücktitration wurde bestätigt, dass die CRFK bzw. DF1-Zellen mit der gleichen Menge MVA infiziert worden sind.

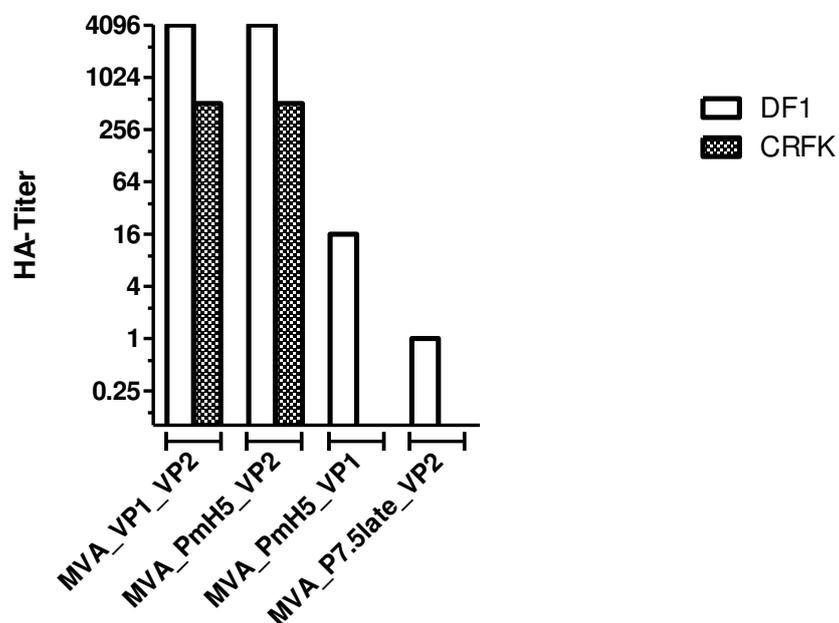


Abbildung 29: Hämagglutinierende Eigenschaften von Zellkultursuspensionen von DF1- und CRFK-Zellen, die mit den vier rekombinanten FPV-MVA-Konstrukten infiziert wurden (MOI 5). Der reziproke Wert der höchsten Virusverdünnungsstufe, in der eine HA stattfindet, wird als HA-Titer angegeben.

V. DISKUSSION

Die Verwendung von MVA als Expressionsvektor heterologer Antigene hat sich als vielversprechendes Werkzeug im Bereich der Impfstoffforschung etabliert. Aufgrund seiner geringen Virulenz und hohen Sicherheit bei verbesserter Immunogenität ist es anderen Vacciniavirus-Expressionsvektoren überlegen. In vielen präklinischen und klinischen Studien konnte die erfolgreiche Induktion einer Immunantwort nach Impfung mit rekombinanten MVA-Vektorimpfstoffen belegt werden.

Ziel dieser Arbeit war die Generierung vier rekombinanter MVA-Viren, welche die FPV-Strukturproteine VP1 und VP2 exprimieren; deren Charakterisierung auf molekularbiologischer Ebene sowie Untersuchungen zum Wachstumsverhalten und zur Proteinexpression. Schließlich soll deren Potential im Hinblick auf eine Verwendung als Vakzine gegen das Feline Panleukopenievirus bewertet werden.

1. Generierung und klonale Isolierung rekombinanter MVA-Viren zur Präsentation von FPV-Antigenen

Zur Generierung der vier Konstrukte wurden die Gensequenzen VP1 und VP2 des FPV_ML2012 verwendet. Dabei handelt es sich um ein aktuelles Feldisolat, das bei einer Gruppenhaltung von Feliden trotz vorangegangener Immunisierung schwere Erkrankungsfälle, teils mit Todesfolge, hervorgerufen hat. Bei *Alignments* (MegAlign, Lasergen-Software, DNASTar) der VP1- und VP2-Aminosäuresequenzen des FPV_ML2012 mit anderen bekannten FPV-Stämmen aus der NCBI GenBank® (Accession Number: EF988660, EU659111, EU659112, M10824, M38246) konnten nur zwei Aminosäuresubstitutionen festgestellt werden. Die erste Substitution befindet sich in der VP1-Aminosäuresequenz an der Stelle 10 (Arg → Ile). Diese Substitution ist auch im M10824 vorhanden und scheint damit nicht ungewöhnlich im FPV-VP1-Protein zu sein. Die zweite Substitution findet man sowohl im VP1 als auch im VP2 des FPV_ML2012, da diese demselben ORF entstammen. Im VP1 handelt es sich um die AS 157, im VP2 um die AS 14 (Ala → Thr). Es konnte gezeigt werden, dass die ersten 14 Aminosäuren des VP2-Proteins nicht essentiell zur VLP-Bildung sind (Hurtado et al., 1996). Außerdem wurden bei einem Impfversuch am Mausmodell mit einem synthetisierten Peptid aus den AS 11 bis 23 des VP2-Proteins keine CPV-neutralisierenden Antikörper gebildet (López De Turiso et al., 1991). Da die AS 14

demnach kein Bestandteil eines wichtigen Epitops zu sein scheint, sollte diese Aminosäuresubstitution keinen Einfluss auf die Immunogenität der potentiellen Vektorvakzine haben. Die restlichen Aminosäuresequenzen im VP2 des FPV_ML2012 sind jeweils mit mindestens vier der verglichenen FPV-VP2-Polypeptide identisch. Somit stellt das FPV_ML2012 als klassisches FPV-Feldvirus eine ideale Grundlage für die Produktion einer Vektorvakzine dar.

VP1 und VP2 bilden als Strukturproteine der Parvoviren das Kapsid. Dabei stellen die VP2-Proteine 54 der 60 Kapsomere eines Kapsids dar. Das Ziel dieser Arbeit war es, die Gene des VP1 und VP2 in Kombination mit verschiedenen Promotoren in das MVA-Genom zu integrieren. Dabei stellte das Konstrukt MVA_VP1_VP2 das Vielversprechendste dar, da es beide Strukturproteine exprimieren sollte. Die Expression des VP1 steht unter der Kontrolle des Promoters P7.5late, die Transkription des VP2-Gens wird vom PmH5 gesteuert. Bei letzterem handelt es sich um einen synthetischen früh-späten Promoter, der von Wyatt et al. modifiziert wurde. Versuche dieser Arbeitsgruppe zeigten, dass PmH5 eine etwa fünfmal stärkere Expression induzierte als P7.5. Sie konnten außerdem zeigen, dass der PmH5 in den frühen Genexpressionsphasen zu den stärksten Promotoren zählt, während er bei der späten Genexpression nur moderate Mengen an Protein exprimierte (Wyatt et al., 1996). Außerdem verbessert er die genetische Stabilität des integrierten Fremdgens und die Immunogenität des rekombinanten MVA bleibt auch nach mehreren Passagen erhalten (Wang et al., 2010). Der natürliche Vacciniavirus-Promoter P7.5 wurde 1985 entdeckt (Cochran et al., 1985) und findet seitdem Anwendung in der Produktion rekombinanter Vacciniaviren (Spriggs et al., 1987; Sutter & Moss, 1992; Hirsch et al., 1996; Wyatt et al., 1996). Er zählt zu den moderaten Promotoren. Die unterschiedlichen Expressionsstärken der beiden Promotoren wurden gezielt so gewählt, da hierdurch bei der Translation weniger VP1- als VP2-Proteine zu erwarten sind. Da das Kapsid des FPV zu 90 % aus VP2 und nur zu 10 % aus VP1-Proteinen besteht, soll sich die Proteinexpression im MVA-Doppelkonstrukt dem Verhältnis zwischen den VP1 und den VP2-Proteinen im FPV-Kapsid annähern. Dies könnte die Chance zur Bildung von Virus-ähnlichen Partikeln (VLP) erhöhen. Außerdem wurde der P7.5 für diese Untersuchungen zum P7.5late modifiziert. Es wurde der Teil verwendet, der für die späte Genexpression verantwortlich ist. Damit sollte gewährleistet werden, dass durch den PmH5 während der gesamten viralen Genexpression eine große Menge VP2-Proteine entstehen können und dann in der späten Genexpression zusätzlich eine kleinere Menge an VP1-Proteinen gebildet werden.

Um die einzelnen Komponenten des Doppelkonstrukts zu untersuchen und diese mit ihm zu vergleichen, wurden weitere rekombinante MVA hergestellt. Dabei wurden zwei MVA-Viren konstruiert, die das VP1 exprimieren (MVA_PmH5_VP1 und MVA_P7.5late_VP1). Diese eignen sich hervorragend für weitere Versuche, um die Expressionsstärken des PmH5 und des P7.5late zu vergleichen. Das MVA_PmH5_VP2 diente einerseits als Ausgangsvirus für das MVA_VP1_VP2, andererseits hat es auch als Einzelkonstrukt Potential, um als Vektorvakzine gegen FPV eingesetzt zu werden. Schließlich produziert es unter Kontrolle des starken Promoters PmH5 das VP2-Protein, welches die Haupt-Antigen-Bindungsstellen des FPV bildet (Strassheim et al., 1994).

Bei der Konstruktion der rekombinanten MVA-Viren war auch die Wahl der Insertionsstelle für das GOI entscheidend. Die in der Literatur am häufigsten beschriebene Insertionsstelle ist die Del III. Sie ist eine der sechs Deletionsstellen im MVA und schon erfolgreich getestet zur präzisen und stabilen Insertion von Fremdgenen (Sutter et al., 1994; Wyatt et al., 1996; Breathnach et al., 2004; Antonis et al., 2007; Chandran et al., 2010; Song et al., 2013; Van Den Doel et al., 2014). Aus diesem Grund wurde das GOI (VP1 bzw. VP2) bei den Konstrukten MVA_PmH5_VP1 und MVA_PmH5_VP2 mit Hilfe des Plasmides pIIIPmH5Red in die Del III des MVA eingebaut. In Hinblick auf das Doppelkonstrukt, welches das VP2 ebenfalls in der Del III tragen sollte, musste noch eine zweite Insertionsstelle ausgewählt werden, um das VP1 einzubauen. Da die beiden für MVA essentiellen Gene I8R und G1L keine überlappenden Enden besitzen, eignet sich deren Zwischengensequenz besonders gut als Insertionsstelle, was bereits von anderen Autoren bestätigt wurde (Wyatt et al., 2009). Somit wurde das VP1-Gen im MVA_VP1_VP2 an dieser Stelle integriert. Auch im MVA_P7.5late_VP1 wurde die Zwischengensequenz I8R-G1L zur Insertion des GOI verwendet, um zusammen mit dem MVA_PmH5_VP2 zwei Einzelkonstrukte zu haben, die den einzelnen Komponenten des Doppelkonstruktes MVA_VP1_VP2 entsprechen, sodass Vergleichsuntersuchungen durchgeführt werden können.

Zur Integration der Fremdgene in das MVA-Virus wurde das natürliche Auftreten der homologen Rekombination genutzt, die bereits Mackett et al. 1982 erfolgreich zur Konstruktion rekombinanter Vacciniaviren verwendeten (Mackett et al., 1982, 1984). Die Selektion rekombinanter MVA-Viren erfolgte mit Hilfe von Fluoreszenzmarkern, die im Ausgangsvirus und im Vektorplasmid vorhanden waren. Somit konnte eine vollständige Rekombination durch eine Farbveränderung der virusinfizierten Zellen im Fluoreszenzmikroskop visuell wahrgenommen werden. Diese Methode erleichterte die Isolierung der rekombinanten Viren innerhalb weniger Passagen unter

Eliminierung des Ausgangsvirus. Neben der ausgeprägten Effektivität hat diese Sichtungsmethode noch andere Vorteile. Somit konnte auf den Einsatz selektiver Substanzen wie Mycophenolsäure (MPA), die zur Guaninphosphoribosyltransferase(GPT)-Selektion verwendet wird, verzichtet werden, wodurch die Gefahr einer Beeinträchtigung der Replikationsfähigkeit von Viren und Zellen minimiert wurde (Falkner & Moss, 1988). Außerdem ist die Verwendung selektiver Fluoreszenzmarker der sogenannten „*host-range*“-Selektion, bei der die Viren auf RK13-Zellen selektiert werden, überlegen, da RK13-Zellen nicht für die Generierung rekombinanter MVA für den klinischen Einsatz zugelassen sind (Kremer et al., 2012).

2. Charakterisierung der rekombinanten MVA-Konstrukte

Um die korrekte Insertion der Fremd-DNA zu überprüfen und dabei die genetische Stabilität des restlichen MVA-Genoms zu beweisen, wurde bei allen Konstrukten eine PCR zur Amplifikation des Genbereichs der sechs MVA-Deletionsstellen durchgeführt. Damit kann außerdem ausgeschlossen werden, dass sich noch Wildtyp-Virus in der Viruspräparation befindet. Das deutlich kürzere Produkt der nicht-rekombinanten Deletionstelle III (447 bp) besitzt durch die kurze Sequenz einen Amplifikationsvorteil bei der PCR und würde somit deutlich effizienter von der DNA-Polymerase amplifiziert werden als das große Fragment des GOI (2738 bzw. 2309 bp). Bei keinem der untersuchten rekombinanten Konstrukte zeigte sich eine ca. 500 bp Bande, daher kann von der Wildtyp-Virus-Freiheit ausgegangen werden. Auch die Insert-PCR, bei der Fragmente der einzelnen GOIs amplifiziert und dargestellt wurden, beweist, dass in jedem rekombinanten MVA das gewünschte Fremdgen vorhanden bzw. im Kontrollvirus MVA_F6 nicht vorhanden ist. Im Genom des MVA_PmH5_VP2 sollten die Primer FPV_VP1_for und FPV_VP1_rev keine Bindungsstelle finden; bei den entstandenen dünnen Banden handelt es sich vermutlich um unspezifische Amplifikationsprodukte (siehe Abbildung 19). Deutlich zu sehen ist, dass keine Banden entstehen, die der Größe der Primer-Zielsequenz (213 bp) entsprechen, was die Theorie der unspezifischen Amplifikation untermauert. Somit wurde bei allen rekombinanten MVA-Konstrukten, mit Hilfe der Sechs-Deletionen- und Insert-PCRs, eine Qualitätskontrolle durchgeführt, die die korrekte Insertion der Fremdgene bei Integrität des übrigen Genoms bestätigt.

Neben der Kontrolle auf molekularbiologischer Ebene wurde auch das Wachstumsverhalten der rekombinanten MVA überprüft. Unter anderem wurde die

Vermehrung der Konstrukte auf der Zelllinie DF1 untersucht. Garber et al. konnten zeigen, dass diese immortalisierte Hühnerembryofibroblasten-Zelllinie in vollem Umfang permissiv für MVA-Infektionen ist und in der produzierten Virusmenge durchaus vergleichbar mit infizierten CEF-Zellen ist. Damit stellen DF1-Zellen bei der Produktion von MVA-basierten Vektorvakzinen eine geeignete Alternative zu den altbewährten CEF-Zellen dar (Garber et al., 2009). Die Verwendung von DF1- anstatt CEF-Zellen hat einige Vorteile, da DF1-Zellen als permanente Zelllinie unkomplizierter in der Handhabung sind. Die Präparation und Kultivierung von den primären CEF-Zellen muss jede Woche neu erfolgen und ist von Verfügbarkeit und Qualität spezifisch pathogenfreier Hühnerembryos abhängig (Drexler et al., 1998). Deshalb wurden zur Ausführung der Experimente und zur Produktion der Virusstocks auch DF1-Zellen erfolgreich verwendet, die einfach und ertragreich in der Virusproduktion eingesetzt werden könnten. Lediglich die Rücktitration wurde nur auf CEF-Zellen durchgeführt, da diese standardmäßig verwendet werden, um die Vergleichbarkeit der Titer zu gewährleisten.

Die Analyse des Wachstumsverhaltens der rekombinanten MVA auf DF1-Zellen beweist, dass die Integration der Fremdgene im Vergleich zum nicht-rekombinanten MVA_F6 keine Replikationsdefizite mit sich bringt und eine potentielle biotechnologische Impfstoffproduktion mit allen Konstrukten möglich wäre. Der leichte Rückgang des Titers 4 h p.i. ist auf das „*Uncoating*“ des Pockenvirus zurückzuführen, welches nach Eintritt in die Zelle stattfindet (Joklik, 1964). Hier wird die Virus-DNA freigesetzt und anschließend repliziert, weshalb zu diesem Zeitpunkt weniger vollständige, infektiöse Virionen nachgewiesen werden können (Garber et al., 2009). Dass MVA_F6 bei allen vier Graphen die höchste bzw. MVA_PmH5_VP2 die niedrigste Kurve darstellt, liegt vermutlich am eingesetzten Infektionstiter (siehe Abbildung 20). Dieser kann, in unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, einerseits schon durch die vorangegangene Titration des Virus, andererseits auch durch die tatsächliche Anzahl der infizierten Zellen nach theoretischer Berechnung der MOI, einer geringen Varianz unterliegen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Vermehrungsfähigkeit aller Konstrukte in permissiven Zellen der vom Wildtyp-Virus MVA_F6 entsprechen, da alle Wachstumskurven denselben Verlauf zeigen und die Virusausbeute 72 h p.i. mindestens das 10^4 -fache des Anfangstiters beträgt.

Weiterhin konnte die Replikationsdefizienz der rekombinanten MVA auf nicht-permissiven Zellen wie Katzennierenzellen (CRFK) und humanen Keratinozyten (HaCaT) demonstriert werden. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die rekombinanten Viren weiterhin unter den Bedingungen der Sicherheitsstufe 1 behandelt werden

können. Es kann damit gezeigt werden, dass der Einbau heterologer Fremdgene nicht zu einer Veränderung des Wirtsspektrums bzw. der Replikationslimitation führt.

Okeke et al. beschrieben Vero-Zellen als semi-permissive Zellen, in denen sich MVA bedingt vermehren kann, aber keine „*mature virions*“ gebildet werden (Okeke et al., 2006). Auch in dieser Arbeit stellten sich Vero-Zellen bei Infektion mit den Viren MVA_F6 und MVA_P7.5late_VP1 semi-permissiv dar, während sie sich bei Infektion mit MVA_PmH5_VP1, MVA_PmH5_VP2 und MVA_VP1_VP2 eher wie nicht-permissive Zellen verhielten.

Die Immunzytochemie wurde durchgeführt, um die Expression der FPV-Strukturproteine nachzuweisen und zu visualisieren. Auch andere Autoren wählten diese Methode, um die Antigenexpression rekombinanter MVA-Konstrukte zu detektieren (Nam et al., 1999; Fournillier et al., 2007). Die gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass die rekombinanten VP1- und VP2-Proteine sowohl mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers als auch mit polyklonalem Probandenserum detektiert werden können, wobei die Fluoreszenz beim polyklonalen Antikörper etwas schwächer wirkt. Bei Verwendung des monoklonalen Antikörpers zeigten alle rekombinanten MVA, die dem GOI den Promoter PmH5 vorgeschaltet haben (MVA_VP1_VP2, MVA_PmH5_VP2 und MVA_PmH5_VP1) eine ähnliche Expressionsstärke in der Immunfluoreszenz- als auch in der Immunperoxidasefärbung. Das rekombinante MVA, dessen VP1 vom P7.5late kontrolliert wird, zeigte eine deutlich schwächere Fluoreszenz als die anderen Konstrukte, weshalb für die Aufnahme der Bilder eine höhere Belichtungszeit verwendet werden musste. Dies ist im Einklang mit der erwarteten, eher moderaten Expressionsstärke des P7.5late im Vergleich zu der starken Transkriptionsaktivität des PmH5. Um dies zu bestätigen, könnten noch weitere vergleichende Experimente mit den Konstrukten MVA_P7.5late_VP1 und MVA_PmH5_VP1 durchgeführt werden. Bei der Darstellung beider rekombinanter Proteine nach Infektion mit dem Doppelkonstrukt MVA_VP1_VP2 kann anhand der Immunzytochemie nicht zwischen VP1 und VP2 unterschieden werden, da sowohl der monoklonale als auch die polyklonalen Antikörper beide Proteine binden. Zurzeit sind keine VP1-spezifischen kommerziellen Antikörper erhältlich, mit denen das Verhältnis der beiden entstandenen Proteine visualisiert werden könnte.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass alle MVA-Konstrukte hinsichtlich Insertion des GOI, Replikations- und Expressionsverhalten die erwarteten Eigenschaften zeigen.

3. VLP-Formation, Hämagglutination und Beurteilung des Potentials als Vektorvakzine

Mit einem rekombinanten Vektorimpfstoff, der alle nötigen Kapsidproteine exprimiert, können sich durch spontane Zusammenlagerung dieser Proteine nicht-infektiöse Kapside bilden. Gerade bei unbehüllten Viren könnte die Bildung dieser VLP eine wichtige Rolle bei der Induktion einer Immunantwort spielen. Werden rekombinante Proteine gebildet, die sich nicht zu VLP formieren, könnte es durch inkorrekte Faltung der Proteine zu Einbußen in der Immunogenität des Impfstoffes kommen. VLP bieten den Vorteil, dass sie die Struktur und Konformation des Viruskapsides authentisch nachbilden. Dadurch werden dem Immunsystem alle Epitope, die auch der natürliche Erreger besitzt, präsentiert, ohne die Gefahr einer Infektion einzugehen, da ein sich replizierendes Virusgenom fehlt. Somit gewährleisten solche rekombinanten Impfstoffe einen hohen Sicherheitsstandard, da eine Impferkrankung, wie sie bei attenuiertem Lebendimpfstoff theoretisch möglich ist, ausgeschlossen ist (zur Übersicht siehe (Noad & Roy, 2003)). Es liegen bereits Untersuchungen vor, die die Formation von VLP durch MVA-Vektoren belegen. Wyatt et al. zeigten die Bildung von VLP bei Expression der Gene *gag*, *env* und *pol* des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) durch MVA (Wyatt et al., 2004). Patch et al. beschrieben eine VLP-Formation bei Infektion mit verschiedenen rekombinanten MVA, die Nipah-Virus-Proteine exprimieren (Patch et al., 2007). Eine Impfung mit VLP ist sehr effektiv, da sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort stimuliert wird (Schirmbeck et al., 1996; Lo-Man et al., 1998; Paliard et al., 2000; Lechmann et al., 2001; Murata et al., 2003; Garrone et al., 2011). Gerade Parvoviren eignen sich durch ihre geringe Anzahl an Kapsidproteinen und ihrem relativ unkomplizierten Aufbau zur Bildung von VLP, weshalb hierzu schon einige Untersuchungen durchgeführt wurden. Neben dem Nerz-Enteritis-Virus (Christensen et al., 1994), dem humanen Parvovirus B19 (Brown et al., 1991; Kajigaya et al., 1991) und dem porcinen Parvovirus (Martínez et al., 1992), wurde auch beim CPV die spontane Formation von VLP bei Expression des VP2 nachgewiesen (López De Turiso et al., 1992; Saliki et al., 1992; Choi et al., 2000; Feng et al., 2011; Jin et al., 2015). In diesen Publikationen wurde das Baculovirus-Vektorsystem verwendet, um VP2-Proteine zu exprimieren. Die entstandenen VLP hatten dieselbe Größe und präsentierten die gleichen Epitope wie natürliche CPV-Kapside (López De Turiso et al., 1992; Saliki et al., 1992). Auch die eigenen Untersuchungen zeigen, dass die entstandenen VLP in ihrer Größe mit den Angaben der Literatur (Truyen, 2015) und den aus einer Feldinfektion stammenden FPV_ML2012-Viruskapsiden übereinstimmen. Alle in dieser Arbeit

elektronenmikroskopisch untersuchten VLP schienen undurchlässig für das Kontrastmittel zu sein, was darauf hinweist, dass vollständig geschlossene Kapside vorliegen (Burtonboy et al., 1979; Paradiso et al., 1982). De Turiso et al. und Saliki et al. bewiesen außerdem, dass auch VP2-Proteine alleine (ohne VP1) in der Lage sind, Kapsid-ähnliche Strukturen auszubilden, die strukturell und antigenetisch keine Unterschiede zu natürlichen CPV-Kapsiden aufweisen (López De Turiso et al., 1992; Saliki et al., 1992). Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die Beobachtung gemacht werden, dass sich bei der Infektion mit dem Konstrukt MVA_PmH5_VP2 VLP bilden. De Turiso et al. und Saliki et al. konnten in Impfversuchen zeigen, dass die aus VP2-Proteinen gebildeten VLP eine belastbare Immunität induzieren, die Hunde im Provokationsversuch vor einer Infektion schützt (López De Turiso et al., 1992; Saliki et al., 1992). Da VP2 den Großteil der B-Zell-spezifischen Epitope beherbergt (López De Turiso et al., 1991; López De Turiso et al., 1992) und die rekombinanten VLP-Impfstoffe von Saliki et al. und De Turiso et al., die ebenfalls nur auf dem VP2 basieren, immunogen wirken, besitzt auch das MVA_PmH5_VP2 Potential zur erfolgreichen Vektorvakzine. Auch Feng et al. konnten in Mäusen sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-T-Zellantwort und neutralisierende Antikörper nach einer Immunisierung mit VLP aus rekombinanten VP2 nachweisen. Zusätzlich konnten auch in Hunden noch 10 Wochen nach der Immunisierung Antikörper gefunden werden (Feng et al., 2011). Ebenso impften Jin et al. Hunde mit einem rekombinanten VLP-Impfstoff aus CPV-2a VP2-Proteinen, die über das Baculovirussystem exprimiert wurden. Auch sie konnten einen VP2-spezifischen Antikörpertiter über 3 Monate nachweisen (Jin et al., 2015).

Keine VLP bildeten sich dagegen bei der Infektion mit MVA_PmH5_VP1. VP1-Proteine alleine scheinen nicht in der Lage zu sein, sich zu einer Kapsid-ähnlichen Struktur zusammen zu lagern. Eventuell könnte die VP1-spezifische N-terminale Aminosäuresequenz zu einer sterischen Hemmung der Zusammenlagerung einzelner VP1-Proteine führen. Auch Kajigaya et al. machten mit Baculovirus-basierten Vektoren, die VP1 bzw. VP2-Proteine des humanen Parvovirus B19 exprimieren, die Entdeckung, dass VP1-Proteine alleine keine VLP erzeugen. Weiterhin stellten sie fest, dass eine Koinfektion mit VP1- und VP2-exprimierenden Vektoren zur VLP-Bildung führt (Kajigaya et al., 1991). Dieses Erkenntnis wurde durch die eigenen Versuche bestätigt.

Ein Doppelkonstrukt, das sowohl das VP1 als auch das VP2 des FPV bzw. CPV gemeinsam exprimiert, ist bis jetzt in der Literatur nicht beschrieben. Da aber das VP2 alleine bereits sehr gute immunogene Eigenschaften besitzt, könnte das rekombinante Virus MVA_VP1_VP2, das beide Kapsidproteine exprimiert und, wie in

dieser Arbeit bewiesen, VLP ausbildet, eine dem natürlichen CPV oder FVP-Virus ähnliche, belastbare Immunität induzieren.

Einen weiteren Nachweis der Expression parvoviraler Strukturproteine durch die rekombinanten MVA-Konstrukte lieferte in dieser Arbeit der Hämagglutinationstest. Infizierte DF1-Zellen, die zu den für MVA permissiven Zellen zählen, zeigten durch ihre höhere Virusproduktion und daraus resultierende stärkere Proteinexpression höhere HA-Titer als nicht-permissive CRFK-Zellen. Weiterhin wurde festgestellt, dass die Expression von VP1 durch die Konstrukte MVA_PmH5_VP1 und MVA_P7.5late_VP1 zu einem deutlich niedrigeren, in CRFK-Zellen gar keinem, HA-Titer führt. Der Grund hierfür könnte in der VLP-Bildung liegen, zu der nur die Expressionsprodukte der Konstrukte MVA_VP1_VP2 und MVA_PmH5_VP2 in der Lage sind. Die bei der Infektion mit diesen beiden MVA entstandenen VLP scheinen sich zwischen die Erythrozyten zu setzen und diese über deren N-Acetylneuraminsäure-Reste zu vernetzen. Da VP1-Proteine ohne VP2, wie in dieser Arbeit gezeigt, keine VLP bilden können, zeigen sie auch kaum hämagglutinierende Eigenschaften. In früheren Studien wurde der hämagglutinierende Effekt als Hinweis auf eine VLP-Bildung angesehen (Hurtado et al., 1996). Ob eine im Elektronenmikroskop nicht darstellbare Aggregation von VP1-Proteinen ebenfalls zu einer geringfügigen Hämagglutination führen könnte, bedarf weiterer Untersuchungen.

Auch Feng et al. und Jin et al. konnten mit VLP, die auf der Basis eines rekombinanten CPV-VP2-exprimierenden Baculovirus entstanden, eine Hämagglutination von Schweineerythrozyten nachweisen (Feng et al., 2011; Jin et al., 2015).

Ein großes Problem bei der Immunisierung mit attenuierten FPV-Lebendimpfstoffen, die zurzeit den Markt bestimmen, stellen maternale Antikörper (MAK) dar. In der Phase der immunologischen Lücke, die in den ersten Lebenswochen auftritt und von variabler Dauer ist, neutralisieren MAK das Impfvirus, gewährleisten aber keinen ausreichenden Schutz gegen eine FPV-Feldinfektion (Scott et al., 1970; Jakel et al., 2012). Im Gegensatz zu den herkömmlichen FPV-Impfstoffen werden die rekombinanten MVA-Vektorviren nach der Immunisierung an der Applikationsstelle nicht von maternalen Anti-FPV-Antikörpern abgefangen. Somit können die rekombinanten MVA-Viren die Zielzellen ungehindert infizieren, in deren Zytosol schließlich die rekombinanten Proteine exprimiert und anschließend im Proteasom in Peptide aufgespalten werden. Das Antigenpeptid-Transporter (TAP) katalysiert den Transport dieser Peptide ins Endoplasmatische Retikulum. Dort werden die Peptide an MHC-I bzw. MHC-II-Moleküle gebunden und auf der Zelloberfläche präsentiert und

eine Immunreaktion wird induziert (Murphy et al., 2009). Auf dieser Tatsache beruht die Idee, dass rekombinante MVA-Vektorimpfstoffe in der Lage sein könnten, die maternale Immunität gegen FPV zu umgehen. Bisläng gibt es sehr wenige Untersuchungen zu rekombinanten MVA-Impfstoffen, die bei Tieren mit MAK getestet wurden. Es wurden Mäuse, Ratten und Makaken mit einem rekombinanten MVA-Impfstoff immunisiert, der Masernvirus-Proteine (H- bzw. F-Protein) exprimiert (Stittelaar et al., 2000; Zhu et al., 2000; Weidinger et al., 2001). In den genannten Publikationen von Weidinger et al. und Stittelaar et al. wurde den Tieren vor der Impfung ein humanes Masern-Antiserum injiziert, das MAK nachahmen soll. Zhu et al. testeten junge Makaken mit MAK, die sie vom geimpften Muttertier erhielten, und passiv immunisierte Makaken im Vergleich. Die Autoren kamen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Während Zhu et al. und Weidinger et al. feststellten, dass die Induktion der humoralen Immunität durch die passiven bzw. maternalen Antikörper blockiert wurde, konnten Stittelaar et al. zeigen, dass das rekombinante MVA im Vergleich zum attenuierten Lebendimpfstoff beim Vorhandensein von Antikörpern gegen das Masernvirus effektiver ist. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten mit der Menge an vorhandenen bzw. eingesetzten Antikörpern zusammenhängen. Eine weitere Publikation zeigt, dass maternale Antikörper im Impfvorsuch an neugeborenen Makaken keinen negativen Einfluss auf die Wirkung einer MVA-Vakzine gegen das Simiane Immundefizienz-Virus hatten, demnach war hier der MVA-Vektor in der Lage die maternale Immunität zu umgehen (Van Rompay et al., 2003). Insgesamt liegen zu der Wirkung MVA-basierter Vektorvakzinen bei vorhandenen MAK nicht genügend Daten vor, um eine Hypothese über das immunogene Verhalten unter dem Einfluss maternaler Immunität der eigenen konstruierten rekombinanten MVA aufzustellen. Dies muss in Studien am Tiermodell untersucht werden.

Als gesichert gilt, dass die Verwendung von MVA als Vektorvirus ein hohes Maß an Sicherheit gewährleistet, da sich das Virus in Säugetierzellen (exklusive BHK-21) nicht replizieren kann (Carroll & Moss, 1997). Trotzdem hat es als Vektorvirus eine hohe Effizienz, da die Genexpression auch in nicht-permissiven Zellen vollständig abläuft und so rekombinante Proteine effizient exprimiert werden (Sutter & Moss, 1992). Durch die ausgeprägte immunmodulierende Wirkung des MVA (Price et al., 2013) ist ebenfalls eine wirksame Immunogenität der Vektorvakzine(n) zu erhoffen.

Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse sollen die Grundlage für die Entwicklung einer rekombinanten MVA-Vektorvakzine gegen das Feline Panleukopenievirus bilden. Mit den in dieser Arbeit generierten rekombinanten MVA müssen noch weitere Untersuchungen zur Immunogenität, im Speziellen auch bei vorhandenen MAK,

durchgeführt werden, um ihre Wirksamkeit und Sicherheit im Tiermodell zu testen. Außerdem können die Konstrukte zur Untersuchung der Unterschiede in der Genexpression der Promotoren P7.5late und PmH5 und zur näheren Analyse der Strukturproteine VP1 und VP2 des FPV verwendet werden.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Das Feline Panleukopenievirus (FPV) gehört zur Familie der *Parvoviridae* und ist in der Lage eine schwere zyklische Allgemeininfektion bei Katzen auszulösen. Durch die namensgebende Panleukopenie, sowie hochgradige Diarrhoe und Vomitus kann eine Erkrankung mit dem FPV lebensbedrohlich sein und führt in der Katzenpopulation trotz routinemäßiger Impfungen mit attenuierten Lebendvakzinen regelmäßig zu hohen Verlusten. Die Ursache hierfür liegt einerseits in der hohen Tenazität und Kontagiösität des Erregers, andererseits führt die herkömmliche Grundimmunisierung bei einigen Jungtieren nicht zur aktiven Immunisierung, da maternale FPV-spezifische Antikörper das Impfvirus neutralisieren können.

Ziel dieser Arbeit war die Generierung neuer Vakzinekandidaten gegen FPV, die in der Lage sein könnten, die maternale Antikörperlücke zu umgehen und so eine sichere Immunisierung zu jedem Zeitpunkt des Lebens zu gewährleisten. Als Basis für diese FPV-Vektorvakzine diente das Modifizierte Vacciniavirus Ankara (MVA), da es sowohl in Hinblick auf die Sicherheit als auch auf die Immunogenität eine besondere Stellung unter den Vektorvakzinen einnimmt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier rekombinante MVA generiert, die die Strukturproteine VP1 und/oder VP2 des FPV unter der Kontrolle verschiedener Promotoren exprimieren. Sie wurden charakterisiert, indem die korrekte Insertion der Fremdgene und die genetische Stabilität auf molekularbiologischer Ebene nachgewiesen, die Synthese der Proteine durch Immunzytochemie bestätigt und das Wachstumsverhalten der rekombinanten Viren untersucht wurde. Hierbei zeigte sich, dass sich alle vier Konstrukte in embryonalen Hühnerzellen uneingeschränkt vermehrten und damit eine biotechnologische Impfstoffproduktion in großem Maßstab möglich wäre. Die Insertion der Fremdgene hatte keinen Einfluss auf die Replikationsdefizienz des MVA in felines und humanen Zelllinien, wodurch deren biologische Sicherheit gewährleistet ist. Die durch die Vektorviren induzierte Synthese des VP2-Proteins führte zur Bildung Virus-ähnlicher Partikel (VLP), welche in Größe und Form natürlichen FPV-Kapsiden glichen. Die Expression des VP1-Gens führte hingegen nicht zur Bildung von VLP. Der Nachweis hämagglutinierender Eigenschaften durch VLP bzw. Kapsid-Proteine deutet auf die physiologische Tertiärstruktur der Antigene hin. Vektorvirus-infizierte Zellkultursuspensionen in denen VP2 vorhanden war, zeigten deutlich höhere Hämagglutinationstiter als Proben mit VP1.

Die bisher durchgeführten Untersuchungen bestätigen insbesondere für die rekombinanten Vektorviren MVA_VP1_VP2 und MVA_PmH5_VP2 ein Potential als FPV-Vakzinekandidaten. In zukünftigen Versuchen muss deren Immunogenität im Tiermodell getestet werden. Im Zuge dieser Experimente sollte auch weiter auf die Frage eingegangen werden, ob diese rekombinanten MVA in der Lage sind eine aktive Immunisierung in der Gegenwart von maternalen Antikörpern zu realisieren.

VII. SUMMARY

Feline Panleukopenia Virus (FPV), a member of the family *Parvoviridae*, causes a severe infection in cats that can be life-threatening. Diseased animals suffer from panleukopenia, as well as diarrhea and emesis. Although most cats are routinely vaccinated against FPV with modified live vaccines, regular outbreaks in the cat population cannot be fully prevented. This is due to the pathogen's high tenacity and contagiousity as well as the fact that the basic immunization does not always initiate a protective immune response in kittens because of the vaccine being neutralized by maternal FPV-specific antibodies.

The objective of the present study was to generate new vaccine candidates against FPV that could be able to overcome inhibition by maternal antibodies and thus provide a safe immunization of cats at any age. Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) was used as a vector platform for delivering FPV antigens since its safety profile as well as its immunogenicity are exceptional compared to other vector vaccines.

Four recombinant MVAs were generated expressing the FPV capsid proteins VP1 and/or VP2 controlled by different promoters. Via molecular analysis the gene of interest was validated to be located in the correct insertion site and the constructs were proven to be genetically stable. Immunocytochemistry confirmed that the FPV proteins were synthesized in cells infected with the vector viruses. Furthermore examination of the growth characteristics of the recombinant MVAs revealed that all four constructs showed unrestricted growth capability in embryonic chicken fibroblasts thus facilitating a large scale vaccine production. The insertion of the foreign genes did not have any influence on the replication deficiencies in feline as well as humane cell lines of all four recombinant MVAs, which ensures their biological safety. The synthesis of VP2-proteins by the vector viruses resulted in the formation of virus-like particles (VLPs) with similar size and shape as natural FPV capsids; whereas the expression of the VP1-gene did not lead to formation of VLPs.

To provide further evidence for the folding of the capsid proteins into correct tertiary structure, their hemagglutinating properties were examined. Vector virus infected cell culture suspensions containing VP2 showed significantly higher HA titers than samples with VP1.

The performed experiments suggest that particularly the recombinant constructs MVA_VP1_VP2 and MVA_PmH5_VP2 seem to be promising candidate vector viruses. Nevertheless, further examination of their immunogenicity in animal models is

required. These experiments should also target the presumption of the recombinant MVAs' ability to overcome interference with maternal antibodies.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Addie D, Jarrett O, Simpson J, Thompson H. Feline parvovirus in pedigree kittens. *Veterinary Record* 1996; 138: 119.

Alberca B, Bachanek-Bankowska K, Cabana M, Calvo-Pinilla E, Viaplana E, Frost L, Gubbins S, Urniza A, Mertens PPC, Castillo-Olivares J. Vaccination of horses with a recombinant modified vaccinia Ankara virus (MVA) expressing African horse sickness (AHS) virus major capsid protein VP2 provides complete clinical protection against challenge. *Vaccine* 2014; 32: 3670-4.

Alcami A, Smith GL. A soluble receptor for interleukin-1 β encoded by vaccinia virus: a novel mechanism of virus modulation of the host response to infection. *Cell* 1992; 71: 153-67.

Alcami A, Smith GL. Vaccinia, cowpox, and camelpox viruses encode soluble gamma interferon receptors with novel broad species specificity. *Journal of Virology* 1995; 69: 4633-9.

Alcamí A, Symons JA, Collins PD, Williams TJ, Smith GL. Blockade of chemokine activity by a soluble chemokine binding protein from vaccinia virus. *The Journal of Immunology* 1998; 160: 624-33.

Allison A, Kohler D, Fox K, Brown J, Gerhold R, Shearn-Bochsler V, Dubovi E, Parrish CR, Holmes E. Frequent cross-species transmission of parvoviruses among diverse carnivore hosts. *Journal of Virology* 2013; 87: 2342-7.

Allison AB, Kohler DJ, Ortega A, Hoover EA, Grove DM, Holmes EC, Parrish CR. Host-specific parvovirus evolution in nature is recapitulated by in vitro adaptation to different carnivore species. *PLoS pathogens* 2014; 10: e1004475.

Allison AB, Organtini LJ, Zhang S, Hafenstein SL, Holmes EC, Parrish CR. Single Mutations in the VP2 300 Loop Region of the Three-Fold Spike of the Carnivore Parvovirus Capsid Can Determine Host Range. *Journal of Virology* 2016; 90: 753-67.

Antoine G, Scheifflinger F, Holzer G, Langmann T, Falkner FG, Dorner F. Characterization of the vaccinia MVA hemagglutinin gene locus and its evaluation as an insertion site for foreign genes. *Gene* 1996; 177: 43-6.

Antoine G, Scheifflinger F, Dorner F, Falkner F. The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology* 1998; 244: 365-96.

Antonis A, van der Most R, Suezer Y, Stockhofe-Zurwieden N, Daus F, Sutter G, Schrijver R. Vaccination with recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing bovine respiratory syncytial virus (bRSV) proteins protects calves against RSV challenge. *Vaccine* 2007; 25: 4818-27.

Appel M, Scott F, Carmichael L. Isolation and immunisation studies of a canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. *Veterinary Record* 1979; 105: 156-9.

Assiri A, McGeer A, Perl TM, Price CS, Al Rabeeah AA, Cummings DA, Alabdullatif ZN, Assad M, Almulhim A, Makhdoom H. Hospital outbreak of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *New England Journal of Medicine* 2013; 369: 407-16.

Baldauf AQ, Willwand K, Mumtsidu E, Nüesch JP, Rommelaere J. Specific initiation of replication at the right-end telomere of the closed species of minute virus of mice replicative-form DNA. *Journal of Virology* 1997; 71: 971-80.

Baldick CJ, Keck JG, Moss B. Mutational analysis of the core, spacer, and initiator regions of vaccinia virus intermediate-class promoters. *Journal of Virology* 1992; 66: 4710-9.

Barbis DP, Chang S-F, Parrish CR. Mutations adjacent to the dimple of the canine parvovirus capsid structure affect sialic acid binding. *Virology* 1992; 191: 301-8.

Binn L, Lazar E, Eddy G, Kajima M. Recovery and characterization of a minute virus of canines. *Infection and Immunity* 1970; 1: 503-8.

Blanchard TJ, Alami A, Andrea P, Smith GL. Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine. *Journal of General Virology* 1998; 79: 1159-67.

Breathnach C, Rudersdorf R, Lunn D. Use of recombinant modified vaccinia Ankara viral vectors for equine influenza vaccination. *Veterinary immunology and immunopathology* 2004; 98: 127-36.

Breathnach C, Clark H, Clark R, Olsen C, Townsend H, Lunn D. Immunization with recombinant modified vaccinia Ankara (rMVA) constructs encoding the HA or NP gene protects ponies from equine influenza virus challenge. *Vaccine* 2006; 24: 1180-90.

Brown CS, Van Lent J, Vlaskovic Jt, Spaan W. Assembly of empty capsids by using baculovirus recombinants expressing human parvovirus B19 structural proteins. *Journal of Virology* 1991; 65: 2702-6.

Broyles S. Vaccinia virus transcription. *Journal of General Virology* 2003; 84: 2293-303.

Brun A, Albina E, Barret T, Chapman DAG, Czub M, Dixon LK, Keil GM, Klonjkowski B, Le Potier M-F, Libeau G, Ortego J, Richardson J, Takamatsu H-H. Antigen delivery systems for veterinary vaccine development: Viral-vector based delivery systems. *Vaccine* 2008; 26: 6508-28.

Burtonboy G, Coignoul F, Delferriere N, Pastoret PP. Canine hemorrhagic enteritis: Detection of viral particles by electron microscopy. *Archives of Virology* 1979; 61: 1-11.

Büttner M, Czerny C, Lehner K, Wertz K. Interferon induction in peripheral blood mononuclear leukocytes of man and farm animals by poxvirus vector candidates and some poxvirus constructs. *Veterinary immunology and immunopathology* 1995; 46: 237-50.

Cairns J. The initiation of vaccinia infection. *Virology* 1960; 11: 603-23.

Carmichael LE, Joubert JC, Pollock RV. Hemagglutination by canine parvovirus: serologic studies and diagnostic applications. *American Journal of Veterinary Research* 1980; 41: 784-91.

Carroll M, Moss B. 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* 1997; 238: 198-211.

Carson C, Antoniou M, Ruiz-Argüello M, Alcamí A, Christodoulou V, Messaritakis I, Blackwell J, Courtenay O. A prime/boost DNA/Modified vaccinia virus Ankara vaccine expressing recombinant Leishmania DNA encoding TRYP is safe and immunogenic in outbred dogs, the reservoir of zoonotic visceral leishmaniasis. *Vaccine* 2009; 27: 1080-6.

Castillo-Olivares J, Calvo-Pinilla E, Casanova I, Bachanek-Bankowska K, Chiam R, Maan S, Nieto JM, Ortego J, Mertens PPC. A Modified Vaccinia Ankara virus (MVA) vaccine expressing African Horse Sickness Virus (AHSV) VP2 protects against AHSV challenge in an IFNAR $-/-$ mouse model. *PLoS ONE* 2011; 6: e16503.

Chandran D, Reddy KB, Vijayan SP, Sugumar P, Rani GS, Kumar PS, Rajendra L, Srinivasan VA. MVA recombinants expressing the fusion and hemagglutinin genes of PPRV protects goats against virulent challenge. *Indian journal of microbiology* 2010; 50: 266-74.

Chang SF, Sgro JY, Parrish CR. Multiple amino acids in the capsid structure of canine parvovirus coordinately determine the canine host range and specific antigenic and hemagglutination properties. *Journal of Virology* 1992; 66: 6858-67.

Chappuis G. Neonatal immunity and immunisation in early age: lessons from veterinary medicine. *Vaccine* 1998; 16: 1468-72.

Chiam R, Sharp E, Maan S, Rao S, Mertens PPC, Blacklaws B, Davis-Poynter N, Wood J, Castillo-Olivares J. Induction of antibody responses to African horse sickness virus (AHSV) in ponies after vaccination with recombinant modified vaccinia Ankara (MVA). *PLoS ONE* 2009; 4: e5997.

Choi JY, Woo SD, Lee HK, Hong HK, Je YH, Park JH, Song JY, An SH, Kang SK. High-level expression of canine parvovirus VP2 using *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus vector. *Archives of Virology* 2000; 145: 171-7.

Christensen J, Alexandersen S, Bloch B, Aasted B, Uttenthal A. Production of mink enteritis parvovirus empty capsids by expression in a baculovirus vector system: a recombinant vaccine for mink enteritis parvovirus in mink. *Journal of General Virology* 1994; 75 (Pt 1): 149-55.

Christensen J, Pedersen M, Aasted B, Alexandersen S. Purification and characterization of the major nonstructural protein (NS-1) of Aleutian mink disease parvovirus. *Journal of Virology* 1995; 69: 1802-9.

Christensen J, Cotmore SF, Tattersall P. Minute virus of mice initiator protein NS1 and a host KDWK family transcription factor must form a precise ternary complex with origin DNA for nicking to occur. *Journal of Virology* 2001; 75: 7009-17.

Clarke DH, Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1958; 7: 561-73.

Cochran MA, Puckett C, Moss B. In vitro mutagenesis of the promoter region for a vaccinia virus gene: evidence for tandem early and late regulatory signals. *Journal of Virology* 1985; 54: 30-7.

Colamonici OR, Domanski P, Sweitzer SM, Lerner A, Buller RML. Vaccinia virus B18R gene encodes a type I interferon-binding protein that blocks interferon α transmembrane signaling. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270: 15974-8.

Cotmore S, Tattersall P. An asymmetric nucleotide in the parvoviral 3' hairpin directs segregation of a single active origin of DNA replication. *The EMBO Journal* 1994; 13: 4145.

Cotmore SF, Tattersall P. The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Advances in Virus Research* 1987; 33: 91-174.

Cotmore SF, Christensen J, Nüesch J, Tattersall P. The NS1 polypeptide of the murine parvovirus minute virus of mice binds to DNA sequences containing the motif [ACCA] 2-3. *Journal of Virology* 1995; 69: 1652-60.

Cotmore SF, Tattersall P. DNA replication in the autonomous parvoviruses. *Seminars in Virology* 1995; 6: 271-81.

Cowling BJ, Park M, Fang VJ, Wu P, Leung GM, Wu JT. Preliminary epidemiologic assessment of MERS-CoV outbreak in South Korea, May–June 2015. *Euro surveillance: bulletin European sur les maladies transmissibles= European communicable disease bulletin* 2015; 20

Csiza CK, Scott FW, De Lahunta A, Gillespie JH. Pathogenesis of Feline Panleukopenia Virus in Susceptible Newborn Kittens I. Clinical Signs, Hematology, Serology, and Virology. *Infection and Immunity* 1971; 3: 833-7.

Dales S. The uptake and development of vaccinia virus in strain L cells followed with labeled viral deoxyribonucleic acid. *The Journal of cell biology* 1963; 18: 51-72.

Davison AJ, Moss B. Structure of vaccinia virus late promoters. *Journal of molecular biology* 1989a; 210: 771-84.

Davison AJ, Moss B. Structure of vaccinia virus early promoters. *Journal of molecular biology* 1989b; 210: 749-69.

Dawson S, Willoughby K, Gaskell RM, Wood G, Chalmers WS. A field trial to assess the effect of vaccination against feline herpesvirus, feline calicivirus and feline panleukopenia virus in 6-week-old kittens. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2001; 3: 17-22.

Day M, Horzinek M, Schultz R. WSAVA guidelines for the vaccination of dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice* 2010; 51: e1-e32.

De Mari K, Maynard L, Eun HM, Lebreux B. Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo-controlled field trial. *Veterinary Record* 2003; 152: 105-8.

Decaro N, Elia G, Martella V, Desario C, Campolo M, Trani LD, Tarsitano E, Tempesta M, Buonavoglia C. A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. *Veterinary Microbiology* 2005a; 105: 19-28.

Decaro N, Campolo M, Desario C, Elia G, Martella V, Lorusso E, Buonavoglia C. Maternally-derived antibodies in pups and protection from canine parvovirus infection. *Biologicals* 2005b; 33: 261-7.

Decaro N, Martella V, Elia G, Desario C, Campolo M, Lorusso E, Colaianni ML, Lorusso A, Buonavoglia C. Tissue distribution of the antigenic variants of canine parvovirus type 2 in dogs. *Veterinary Microbiology* 2007; 121: 39-44.

Decaro N, Desario C, Elia G, Martella V, Mari V, Lavazza A, Nardi M, Buonavoglia C. Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. *New Microbiologica* 2008; 31: 125-30.

Decaro N, Cirone F, Desario C, Elia G, Lorusso E, Colaianni M, Martella V, Buonavoglia C. Severe parvovirus in a 12-year-old dog that had been repeatedly vaccinated. *Veterinary Record* 2009; 164: 593-5.

Desario C, Decaro N, Campolo M, Cavalli A, Cirone F, Elia G, Martella V, Lorusso E, Camero M, Buonavoglia C. Canine parvovirus infection: which diagnostic test for virus? *Journal of Virological Methods* 2005; 126: 179-85.

Digangi BA, Levy JK, Griffin B, Reese MJ, Dingman PA, Tucker SJ, Dubovi EJ. Effects of maternally-derived antibodies on serologic responses to vaccination in kittens. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2012; 14: 118-23.

Drexler I, Heller K, Wahren B, Erfle V, Sutter G. Highly attenuated 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. *Journal of General Virology* 1998; 79: 347-52.

Drexler I, Staib C, Kastenmüller W, Stevanović S, Schmidt B, Lemonnier F, Rammensee H, Busch D, Bernhard H, Erfle V. Identification of vaccinia virus epitope-specific HLA-A* 0201-restricted T cells and comparative analysis of smallpox vaccines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003; 100: 217-22.

Earl PL, Hügin AW, Moss B. Removal of cryptic poxvirus transcription termination signals from the human immunodeficiency virus type 1 envelope gene enhances expression and immunogenicity of a recombinant vaccinia virus. *Journal of Virology* 1990; 64: 2448-51.

Eugster AK, Nairn C. Diarrhoea in puppies: parvovirus-like particles demonstrated in their faeces. *Southwest Veterinary Journal* 1977; 30: 50-60.

Falkner FG, Moss B. Escherichia coli gpt gene provides dominant selection for vaccinia virus open reading frame expression vectors. *Journal of Virology* 1988; 62: 1849-54.

Feng H, Liang M, Wang H, Zhang T, Zhao P, Shen X, Zhang R, Hu G, Gao Y, Wang C, Wang T, Zhang W, Yang S, Xia X. Recombinant canine parvovirus-like particles express foreign epitopes in silkworm pupae. *Veterinary Microbiology* 2011; 154: 49-57.

Fenner F, Comben B. Genetic studies with mammalian poxviruses: I. Demonstration of recombination between two strains of vaccinia virus. *Virology* 1958; 5: 530-48.

Fenner F, Henderson DA, Arita I, Jezek Z, Ladnyi ID. Smallpox and its eradication. 1988.

Fournillier A, Gerossier E, Evlashev A, Schmitt D, Simon B, Chatel L, Martin P, Silvestre N, Balloul JM, Barry R, Inchauspé G. An accelerated vaccine schedule with a poly-antigenic hepatitis C virus MVA-based candidate vaccine induces potent, long lasting and in vivo cross-reactive T cell responses. *Vaccine* 2007; 25: 7339-53.

Garber DA, O'Mara LA, Zhao J, Gangadhara S, An I, Feinberg MB. Expanding the Repertoire of Modified Vaccinia Ankara-Based Vaccine Vectors via Genetic Complementation Strategies. *PLoS ONE* 2009; 4: e5445.

Garrone P, Fluckiger AC, Mangeot PE, Gauthier E, Dupeyrot-Lacas P, Mancip J, Cangialosi A, Du Chéné I, LeGrand R, Mangeot I. A prime-boost strategy using virus-like particles pseudotyped for HCV proteins triggers broadly neutralizing antibodies in macaques. *Science translational medicine* 2011; 3: 94ra71-94ra71.

Gilbert S. Clinical development of Modified Vaccinia virus Ankara vaccines. *Vaccine* 2013; 31: 4241-6.

Glover S, Anderson C, Piontkowski M, Ng T. Canine Parvovirus (CPV) Type 2b Vaccine Protects puppies with Maternal Antibodies to CPV when Challenged with Virulent CPV-2c Virus. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine* 2012; 10: 217-24.

Gómez C, Perdiguero B, García-Arriaza J, Esteban M. Clinical applications of attenuated MVA poxvirus strain. *Expert Review of Vaccines* 2013; 12: 1395-416.

Gordon JC, Angrick EJ. Canine parvovirus: environmental effects on infectivity. *American Journal of Veterinary Research* 1986; 47: 1464-7.

Graham KA, Lalani AS, Macen JL, Ness TL, Barry M, Liu L, Lucas A, Clark-Lewis I, Moyer RW, Mcfadden G. The T1/35kDa family of poxvirus-secreted proteins bind chemokines and modulate leukocyte influx into virus-infected tissues. *Virology* 1997; 229: 12-24.

Greene CE, Addie DD (2006) Feline parvovirus infections. 78-88

Haagmans BL, van den Brand JMA, Raj VS, Volz A, Wohlsein P, Smits SL, Schipper D, Bestebroer TM, Okba N, Fux R, Bensaid A, Solanes Foz D, Kuiken T, Baumgärtner W, Segalés J, Sutter G, Osterhaus ADME. An orthopoxvirus-based vaccine reduces virus excretion after MERS-CoV infection in dromedary camels. *Science* 2016; 351: 77-81.

Hafenstein S, Bowman VD, Sun T, Nelson CD, Palermo LM, Chipman PR, Battisti AJ, Parrish CR, Rossmann MG. Structural comparison of different antibodies interacting with parvovirus capsids. *Journal of Virology* 2009; 83: 5556-66.

Hanson ND, Rhode SL. Parvovirus NS1 stimulates P4 expression by interaction with the terminal repeats and through DNA amplification. *Journal of Virology* 1991; 65: 4325-33.

Hebben M, Brants J, Birck C, Samama J, Wasylyk B, Spehner D, Pradeau K, Domi A, Moss B, Schultz P, Drillien R. High level protein expression in mammalian cells using a safe viral vector: Modified vaccinia virus Ankara. *Protein Expression and Purification* 2007; 56: 269-78.

Hindle E, Findlay GM. Studies on Feline Distemper. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 1932; 45: 11-26.

Hirsch V, Fuerst T, Sutter G, Carroll M, Yang L, Goldstein S, Piatak M, Elkins W, Alvord W, Montefiori D. Patterns of viral replication correlate with outcome in simian immunodeficiency virus (SIV)-infected macaques: effect of prior immunization with a trivalent SIV vaccine in modified vaccinia virus Ankara. *Journal of Virology* 1996; 70: 3741-52.

Hu F, Smith CA, Pickup DJ. Cowpox virus contains two copies of an early gene encoding a soluble secreted form of the type II TNF receptor. *Virology* 1994; 204: 343-56.

Hueffer K, Parker J, Weichert WS, Geisel RE, Sgro JY, Parrish CR. The natural host range shift and subsequent evolution of canine parvovirus resulted from virus-specific binding to the canine transferrin receptor. *Journal of Virology* 2003; 77: 1718-26.

Hurtado A, Rueda P, Nowicky J, Sarraseca J, Casal JI. Identification of domains in Canine Parvovirus VP2 essential for the assembly of virus-like particles. *Journal of Virology* 1996; 70: 5422-9.

Ikeda Y., Nakamura K., Miyazawa T., Tohya Y., Takahashi E., M. M. Feline Host Range of Canine Parvovirus: Recent Emergence of New Antigenic Types in Cats. *Emerging Infectious Diseases* 2002; 8: 341-6.

Jakel V, Cussler K, Hanschmann KM, Truyen U, Konig M, Kamphuis E, Duchow K. Vaccination against Feline Panleukopenia: implications from a field study in kittens. *BMC Veterinary Research* 2012; 8: 62.

Jin H, Xia X, Liu B, Fu Y, Chen X, Wang H, Xia Z. High-yield production of canine parvovirus virus-like particles in a baculovirus expression system. *Archives of Virology* 2015: 1-6.

Johnson RH. Isolation of a Virus from a Condition Simulating Feline Panleukopenia in a Leopard. *Veterinary Record* 1964: 1008.

Joklik WK, Becker Y. The replication and coating of vaccinia DNA. *Journal of molecular biology* 1964; 10: 452-74.

Joklik WK. The intracellular uncoating of poxvirus DNA. *Journal of molecular biology* 1964; 8: 277-88.

Jongeneel CV, Sahli R, McMaster GK, Hirt B. A precise map of splice junctions in the mRNAs of minute virus of mice, an autonomous parvovirus. *Journal of Virology* 1986; 59: 564-73.

Kajigaya S, Fujii H, Field A, Anderson S, Rosenfeld S, Anderson LJ, Shimada T, Young NS. Self-assembled B19 parvovirus capsids, produced in a baculovirus system, are antigenically and immunogenically similar to native virions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1991; 88: 4646-50.

Kates JR, McAuslan BR. Poxvirus DNA-dependent RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1967; 58: 134-41.

Katsafanas GC, Moss B. Colocalization of Transcription and Translation within Cytoplasmic Poxvirus Factories Coordinates Viral Expression and Subjugates Host Functions. *Cell Host & Microbe* 2007; 2: 221-8.

Kelly WR. An Enteric Disease of Dogs resembling Feline Panleukopenia. *Australian Veterinary Journal* 1978; 54: 593-.

Kilham L, Margolis G. Viral etiology of spontaneous ataxia of cats. *The American Journal of Pathology* 1966; 48: 991-1011.

Kozak M. Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Research* 1981; 9: 5233-52.

Krady JK, Ward DC. Transcriptional activation by the parvoviral nonstructural protein NS-1 is mediated via a direct interaction with Sp1. *Molecular and Cellular Biology* 1995; 15: 524-33.

Kreijtz JHCM, Suezer Y, Van Amerongen G, De Mutsert G, Schnierle BS, Wood JM, Kuiken T, Fouchier RAM, Löwer RAM, Osterhaus ADME. Recombinant modified vaccinia virus Ankara-based vaccine induces protective immunity in mice against infection with influenza virus H5N1. *Journal of Infectious Diseases* 2007; 195: 1598-606.

Kremer M, Volz A, Kreijtz J, Fux R, Lehmann M, Sutter G. Easy and Efficient Protocols for Working with Recombinant Vaccinia Virus MVA. In: *Vaccinia Virus and Poxvirology*: 2012: 59-92.

Lane J, Millar JD. Routine childhood vaccination against smallpox reconsidered. *The New England Journal of medicine* 1969; 281: 1220.

Lane JM, Ruben FL, Neff JM, Millar JD. Complications of Smallpox Vaccination, 1968. *New England Journal of Medicine* 1969; 281: 1201-8.

Larsen S, Flagstad A, Aalbæk B. Experimental Feline Panleucopenia in the Conventional Cat. *Veterinary Pathology Online* 1976; 13: 216-40.

Lechmann M, Murata K, Satoi J, Vergalla J, Baumert TF, Liang TJ. Hepatitis C virus-like particles induce virus-specific humoral and cellular immune responses in mice. *Hepatology* 2001; 34: 417-23.

Lehmann M, Kastenmuller W, Kandemir J, Brandt F, Suezzer Y, Sutter G. Modified Vaccinia Virus Ankara Triggers Chemotaxis of Monocytes and Early Respiratory Immigration of Leukocytes by Induction of CCL2 Expression. *Journal of Virology* 2009; 83: 2540-52.

Lenghaus C, Studdert MJ. Acute and chronic viral myocarditis. Acute diffuse nonsuppurative myocarditis and residual myocardial scarring following infection with canine parvovirus. *The American Journal of Pathology* 1984; 115: 316-9.

Lo-Man R, Rueda P, Sedlik C, Deriaud E, Casal I, Leclerc C. A recombinant virus-like particle system derived from parvovirus as an efficient antigen carrier to elicit a polarized Th1 immune response without adjuvant. *European journal of immunology* 1998; 28: 1401-7.

López de Turiso J, Cortés E, Ranz A, García J, Sanz A, Vela C, Casal JI. Fine mapping of canine parvovirus B cell epitopes. *Journal of General Virology* 1991; 72: 2445-56.

López de Turiso J, Cortés E, Martínez C, De Ybáñez RR, Simarro I, Vela C, Casal I. Recombinant Vaccine for Canine Parvovirus in Dogs. *Journal of Virology* 1992; 66: 2748-53.

Macintire DK, Smith-Carr S, Jones R, Swango L (1999) Treatment of dogs naturally infected with canine parvovirus with lyophilized canine IgG. *Proceedings of the 17th Annual Conference of the American College of Veterinary Internal Medicine* June 10–13. 721

Mackett M, Smith GL, Moss B. Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1982; 79: 7415-9.

Mackett M, Smith GL, Moss B. General method for production and selection of infectious vaccinia virus recombinants expressing foreign genes. *Journal of Virology* 1984; 49: 857-64.

Martella V, Cavalli A, Pratelli A, Bozzo G, Camero M, Buonavoglia D, Narcisi D, Tempesta M, Buonavoglia C. A Canine Parvovirus Mutant Is Spreading in Italy. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42: 1333-6.

Martin V, Najbar W, Gueguen S, Grousseau D, Eun HM, Lebreux B, Aubert A. Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo-controlled challenge trial. *Veterinary Microbiology* 2002; 89: 115-27.

Martínez C, Dalsgaard K, de Turiso JL, Cortés E, Vela C, Casal J. Production of porcine parvovirus empty capsids with high immunogenic activity. *Vaccine* 1992; 10: 684-90.

Mayr A, Munz E. Veränderung von Vaccinevirus durch Dauerpassagen in Hühnerembryofibroblasten-Kulturen. *Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten und Hygiene Abteilung 1* 1964; 195: 24-35.

Mayr A, Hochstein-Mintzel V, Stickl H. Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes MVA. *Infection* 1975; 3: 6-14.

Mayr A, Stickl H, Müller H, Danner K, Singer H. Der Pockenimpfstamm MVA: Marker, genetische Struktur, Erfahrungen mit der parenteralen Schutzimpfung und Verhalten im abwehrgeschwächten Organismus. *Zentralblatt Bakteriologie B* 1978; 167: 375-90.

Mayr A, Baljer G, Wagner C, Sailer J. Development of a numerically additive combined vaccine against tetanus and smallpox. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene. Series A, Medical microbiology, infectious diseases, virology, parasitology* 1985; 259: 206-18.

McMaster GK, Tratschin JD, Siegl G. Comparison of Canine Parvovirus with Mink Enteritis Virus by Restriction Site Mapping. *Journal of Virology* 1981; 38: 368-71.

Meisinger-Henschel C, Schmidt M, Lukassen S, Linke B, Krause L, Konietzny S, Goesmann A, Howley P, Chaplin P, Suter M, Hausmann J. Genomic sequence of chorioallantois vaccinia virus Ankara, the ancestor of modified vaccinia virus Ankara. *Journal of General Virology* 2007; 88: 3249-59.

Meunier PC, Cooper BJ, Appel MJ, Lanieu ME, Slauson DO. Pathogenesis of Canine Parvovirus Enteritis: Sequential Virus Distribution and Passive Immunization Studies. *Vet Pathol* 1985; 22: 617-24.

Meyer H, Sutter G, Mayr A. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *Journal of General Virology* 1991; 72: 1031-8.

Minagawa T, Ishiwata K, Kajimoto T. Feline interferon- ω treatment on canine parvovirus infection. *Veterinary Microbiology* 1999; 69: 51-3.

Minnigan H, Moyer RW. Intracellular location of rabbit poxvirus nucleic acid within infected cells as determined by in situ hybridization. *Journal of Virology* 1985; 55: 634-43.

Mochizuki M, Nakatani H, Yoshida M. Inhibitory effects of recombinant feline interferon on the replication of feline enteropathogenic viruses in vitro. *Veterinary Microbiology* 1994; 39: 145-52.

Moss B. Vaccinia virus: a tool for research and vaccine development. *Science* 1991; 252: 1662-7.

Moss B. Poxviridae. In: *Fields Virology 6edn*. Knipe D, Howley P, edn.: 2013: 2129-60.

Mossman K, Upton C, Buller R, McFadden G. Species specificity of ectromelia virus and vaccinia virus interferon- γ binding proteins. *Virology* 1995; 208: 762-9.

Müller MA, Meyer B, Corman VM, Al-Masri M, Turkestani A, Ritz D, Sieberg A, Aldabbagh S, Bosch B-J, Lattwein E. Presence of Middle East respiratory syndrome coronavirus antibodies in Saudi Arabia: a nationwide, cross-sectional, serological study. *The Lancet Infectious Diseases* 2015; 15: 559-64.

Murata K, Lechmann M, Qiao M, Gunji T, Alter HJ, Liang TJ. Immunization with hepatitis C virus-like particles protects mice from recombinant hepatitis C virus-vaccinia infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003; 100: 6753-8.

Murphy K, Travers P, Walport M (2009) *Janeway's Immunology*, 7th edn

Nam J, Wyatt L, Chae S, Cho H, Park Y, Moss B. Protection against lethal Japanese encephalitis virus infection of mice by immunization with the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus expressing JEV prM and E genes. *Vaccine* 1999; 17: 261-8.

Nam J, Chae S, Cho H. Immunogenicity of a recombinant MVA and a DNA vaccine for Japanese encephalitis virus in swine. *Microbiology and immunology* 2002; 46: 23-8.

Nelson CDS, Palermo LS, Hafenstein SL, Parrish CR. Different mechanisms of antibody-mediated neutralization of parvoviruses revealed using the Fab fragments of monoclonal antibodies. *Virology* 2007; 361: 283-93.

Noad R, Roy P. Virus-like particles as immunogens. *Trends in Microbiology* 2003; 11: 438-44.

Nörder M, Becker PD, Drexler I, Link C, Erfle V, Guzmán CA. Modified Vaccinia Virus Ankara Exerts Potent Immune Modulatory Activities in a Murine Model. *PLoS ONE* 2010; 5: e11400.

Nüesch JP, Cotmore SF, Tattersall P. Sequence motifs in the replicator protein of parvovirus MVM essential for nicking and covalent attachment to the viral origin: identification of the linking tyrosine. *Virology* 1995; 209: 122-35.

Nüesch JPF, Cotmore SF, Tattersall P. Expression of functional parvoviral NS1 from recombinant vaccinia virus: Effects of mutations in the nucleotide-binding motif. *Virology* 1992; 191: 406-16.

Okeke MI, Nilssen Ø, Traavik T. Modified vaccinia virus Ankara multiplies in rat IEC-6 cells and limited production of mature virions occurs in other mammalian cell lines. *Journal of General Virology* 2006; 87: 21-7.

Paliard X, Liu Y, Wagner R, Wolf H, Baenziger J, Walker CM. Priming of strong, broad, and long-lived HIV type 1 p55gag-specific CD8+ cytotoxic T cells after administration of a virus-like particle vaccine in rhesus macaques. *AIDS research and human retroviruses* 2000; 16: 273-82.

Panicali D, Paoletti E. Construction of poxviruses as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1982; 79: 4927-31.

Panicali D, Davis SW, Weinberg RL, Paoletti E. Construction of live vaccines by using genetically engineered poxviruses: biological activity of recombinant vaccinia virus expressing influenza virus hemagglutinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1983; 80: 5364-8.

Paradiso PR, Rhode SL, Singer II. Canine Parvovirus: a Biochemical and Ultrastructural Characterization. *Journal of General Virology* 1982; 62: 113-25.

Parker JS, Murphy WJ, Wang D, O'Brien SJ, Parrish CR. Canine and Feline Parvoviruses Can Use Human or Feline Transferrin Receptors to Bind, Enter, and Infect Cells. *Journal of Virology* 2001; 75: 3896-902.

Parker JSL, Parrish CR. Cellular Uptake and Infection by Canine Parvovirus Involves Rapid Dynamin-Regulated Clathrin-Mediated Endocytosis, Followed by Slower Intracellular Trafficking. *Journal of Virology* 2000; 74: 1919-30.

Parrish C, Aquadro C, Strassheim L, Evermann J, Sgro J-Y, Mohammed H. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *Journal of Virology* 1991; 65: 6544-52.

Parrish CR, O'Connell PH, Evermann JF, Carmichael LE. Natural Variation of Canine Parvovirus. *Science* 1985; 230: 1046-8.

Parrish CR, Aquadro C, Carmichael LE. Canine host range and a specific epitope map along with variant sequences in the capsid protein gene of canine parvovirus and related feline, mink, and raccoon parvoviruses. *Virology* 1988; 166: 293-307.

Parrish CR. Emergence, Natural History, and Variation of Canine, Mink, and Feline Parvoviruses. *Advances of Virus Research* 1990; 38: 403-50.

Parrish CR. Mapping Specific Functions in the Capsid Structure of Canine Parvovirus and Feline Panleukopenia Virus Using Infectious Plasmid Clones. *Virology* 1991; 183: 195-205.

Parrish CR. The emergence and evolution of canine parvovirus—an example of recent host range mutation. *Seminars in Virology* 1994; 5: 121-32.

Parrish CR. Structures and Functions of Parvovirus Capsids and the Process of Cell Infection. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2010; 343: 149-76.

Patch JR, Crameri G, Wang L-F, Eaton BT, Broder CC. Quantitative analysis of Nipah virus proteins released as virus-like particles reveals central role for the matrix protein. *Virology Journal* 2007; 4: 17204159.

Pollock RV. Experimental Canine Parvovirus Infection in Dogs. *Cornell Vet* 1982; 72: 103-19.

Pollock RV, Carmichael LE. Maternally Derived Immunity to Canine Parvovirus Infection: Transfer, Decline, and Interference with Vaccination. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1982; 180: 37-42.

Poulet H. Alternative Early Life Vaccination Programs for Companion Animals. *Journal of Comparative Pathology* 2007; 137, Supplement 1: S67-S71.

Pratelli A, Cavalli A, Martella V, Tempesta M, Decaro N, Carmichael LE, Buonavoglia C. Canine Parvovirus (CPV) Vaccination: Comparison of Neutralizing Antibody Responses in Pups after Inoculation with CPV2 or CPV2b Modified Live Virus Vaccine. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 2001; 8: 612-5.

Price P, Torres-Domínguez L, Brandmüller C, Sutter G, Lehmann M. Modified Vaccinia virus Ankara: Innate immune activation and induction of cellular signalling. *Vaccine* 2013; 31: 4231-4.

Price P, Bánki Z, Scheideler A, Stoiber H, Verschoor A, Sutter G, Lehmann M. Complement Component C5 Recruits Neutrophils in the Absence of C3 during Respiratory Infection with Modified Vaccinia Virus Ankara. *The Journal of Immunology* 2015; 194: 1164-8.

Ramos I, Alonso A, Marcen J, Peris A, Castillo J, Colmenares M, Larraga V. Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response. *Vaccine* 2008; 26: 333-44.

Redfield RR, Wright DC, James WD, Jones TS, Brown C, Burke DS. Disseminated vaccinia in a military recruit with human immunodeficiency virus (HIV) disease. *New England Journal of Medicine* 1987; 316: 673-6.

Reed AP, Jones EV, Miller TJ. Nucleotide Sequence and Genome Organization of Canine Parvovirus. *Journal of Virology* 1988; 62: 266-76.

Reusken C, Farag E, Haagmans B, Mohran K, Godeke G, Raj V, Alhajri F, Al-Marri SA, Al-Romaihi HE, Al-Thani M, Bosch B-J, van der Eijk AA, El-Sayed AM, Ibrahim AK, Al-Molawi N, Müller MA, Pasha SK, Drosten C, AlHajri MM, Koopmans MPG. Occupational Exposure to Dromedaries and Risk for MERS-CoV Infection, Qatar, 2013–2014. *Emerging Infectious Diseases* 2015; 21: 1422-5.

Rhode SL. trans-Activation of Parvovirus P38 Promoter by the 76K Noncapsid Protein. *Journal of Virology* 1985; 55: 886-9.

Rhode SL. Both Excision and Replication of Cloned Autonomous Parvovirus DNA Require the NS1 (rep) Protein. *Journal of Virology* 1989; 63: 4249-56.

Rimmelzwaan GF, van der Heijden RW, Tijhaar E, Poelen MC, Carlson J, Osterhaus AD, UytdeHaag FG. Establishment and characterization of canine parvovirus-specific murine CD4+ T cell clones and their use for the delineation of T cell epitopes. *Journal of General Virology* 1990; 71 (Pt 5): 1095-102.

Robinson WF, Wilcox GE, Flower RLP. Canine Parvoviral Disease: Experimental Reproduction of the Enteric Form with a Parvovirus Isolated from a Case of Myocarditis. *Veterinary Pathology Online* 1980; 17: 589-99.

Saliki JT, Mizak B, Flore HP, Gettig RR, Burand JP, Carmichael LE, Wood HA, Parrish CR. Canine parvovirus empty capsids produced by expression in a baculovirus vector: use in analysis of viral properties and immunization of dogs. *Journal of General Virology* 1992; 73 (Pt 2): 369-74.

Saxena L, Kumar GR, Saxena S, Chaturvedi U, Sahoo AP, Singh LV, Santra L, Palia SK, Desai GS, Tiwari AK. Apoptosis induced by NS1 gene of Canine Parvovirus-2 is caspase dependent and p53 independent. *Virus Research* 2013; 173: 426-30.

Scherk MA, Ford RB, Gaskell RM, Hartmann K, Hurley KF, Lappin MR, Levy JK, Little SE, Nordone SK, Sparkes AH. AAFP Feline Vaccination Advisory Panel Report. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2013; 15: 785-808.

Schirmbeck R, Böhm W, Reimann J. Virus-like particles induce MHC class I-restricted T-cell responses. *Intervirology* 1996; 39: 111-9.

Schunck B, Kraft W, Truyen U. A simple touch-down polymerase chain reaction for the detection of canine parvovirus and feline panleukopenia virus in feces. *Journal of Virological Methods* 1995; 55: 427-33.

Scott F, Csiza C, Gillespie J. Maternally Derived Immunity to Feline Panleukopenia. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1970; 156: 439-53.

Senda M, Hirayama N, Yamamoto H, Kurata K. An improved hemagglutination test for study of canine parvovirus. *Veterinary Microbiology* 1986; 12: 1-6.

Senda M, Hirayama N, Itoh O, Yamamoto H. Canine parvovirus: strain difference in haemagglutination activity and antigenicity. *Journal of General Virology* 1988; 69 (Pt 2): 349-54.

Shackelton LA, Parrish CR, Truyen U, Holmes EC. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102: 379-84.

Smith CA, Hu F, Smith TD, Richards CL, Smolak P, Goodwin RG, Pickup DJ. Cowpox virus genome encodes a second soluble homologue of cellular TNF receptors, distinct from CrmB, that binds TNF but not LT α . *Virology* 1996; 223: 132-47.

Smith CA, Smith TD, Smolak PJ, Friend D, Hagen H, Gerhart M, Park L, Pickup DJ, Torrance D, Mohler K. Poxvirus genomes encode a secreted, soluble protein that preferentially inhibits β chemokine activity yet lacks sequence homology to known chemokine receptors. *Virology* 1997a; 236: 316-27.

Smith GL, Mackett M, Moss B. Infectious vaccinia virus recombinants that express hepatitis B virus surface antigen. *Nature* 1983; 302: 490-5.

Smith GL, Moss B. Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25 000 base pairs of foreign DNA. *Gene* 1983; 25: 21-8.

Smith GL. Vaccinia virus glycoproteins and immune evasion. *Journal of General Virology* 1993; 74: 1725-40.

Smith GL, Symons JA, Khanna A, Vanderplasschen A, Alcamì A. Vaccinia virus immune evasion. *Immunological reviews* 1997b; 159: 137-54.

Song F, Fux R, Provacía L, Volz A, Eickmann M, Becker S, Osterhaus A, Haagmans B, Sutter G. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein Delivered by Modified Vaccinia Virus Ankara Efficiently Induces Virus-Neutralizing Antibodies. *Journal of Virology* 2013; 87: 11950-4.

Spriggs MK, Murphy BR, Prince GA, Olmsted RA, Collins PL. Expression of the F and HN Glycoproteins of Human Parainfluenza Virus Type 3 by Recombinant Vaccinia Viruses: Contributions of the Individual Proteins to Host Immunity. *Journal of Virology* 1987; 61: 3416-23.

Spriggs MK, Hruby DE, Maliszewski CR, Pickup DJ, Sims JE, Buller RML, VanSlyke J. Vaccinia and Cowpox Viruses Encode a Novel Secreted Interleukin-1-Binding Protein. *Cell* 1992; 71: 145-52.

Ständige Impfkommision Vet. Leitlinie zur Impfung von Kleintieren. Bundestierärztekammer e.V.(BTK), Bundesverband Praktizierender Tierärzte e.V.(bpt), Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V.(DVG) 2009.

Stickl H, Hochstein-Mintzel V, Mayr A, Huber H, Schäfer H, Holzner A. MVA-Stufenimpfung gegen Pocken. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift* 1974; 99: 2386-92.

Stittelaar KJ, Wyatt LS, de Swart RL, Vos HW, Groen J, van Amerongen G, van Binnendijk RS, Rozenblatt S, Moss B, Osterhaus AD. Protective Immunity in Macaques Vaccinated with a Modified Vaccinia Virus Ankara-Based Measles Virus Vaccine in the Presence of Passively Acquired Antibodies. *Journal of Virology* 2000; 74: 4236-43.

Stittelaar KJ, Kuiken T, de Swart RL, van Amerongen G, Vos HW, Niesters HG, van Schalkwijk P, van der Kwast T, Wyatt LS, Moss B. Safety of modified vaccinia virus Ankara (MVA) in immune-suppressed macaques. *Vaccine* 2001; 19: 3700-9.

Storgaard T, Christensen J, Aasted B, Alexandersen S. cis-Acting Sequences in the Aleutian Mink Disease Parvovirus Late Promoter Important for Transcription: Comparison to the Canine Parvovirus and Minute Virus of Mice. *Journal of Virology* 1993; 67: 1887-95.

Strassheim ML, Gruenberg A, Veijalainen P, Sgro JY, Parrish CR. Two dominant neutralizing antigenic determinants of canine parvovirus are found on the threefold spike of the virus capsid. *Virology* 1994; 198: 175-84.

Studdert MJ, Peterson JE. Some properties of feline panleukopenia virus. *Archiv für die gesamte Virusforschung* 1973; 42: 346-54.

Sutter G, Moss B. Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1992; 89: 10847-51.

Sutter G, Wyatt L, Foley P, Bennink J, Moss B. 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* 1994; 12: 1032-40.

Symons JA, Alcamí A, Smith GL. Vaccinia virus encodes a soluble type I interferon receptor of novel structure and broad species soecificity. *Cell* 1995; 81: 551-60.

Thomson GW, Gagnon AN. Canine Gastroenteritis Associated with a Parvovirus-Like Agent. *The Canadian Veterinary Journal* 1978; 19: 346-.

Tratschin JD, McMaster GK, Kronauer G, Siegl G. Canine Parvovirus: Relationship to Wild-type and Vaccine Strains of Feline Panleukopenia Virus and Mink Enteritis Virus. *Journal of General Virology* 1982; 61 (Pt I): 33-41.

Truyen U, Evermann J, Vieler E, Parrish CR. Evolution of Canine Parvovirus Involved Loss and Gain of Feline Host Range. *Virology* 1996; 215: 186-9.

Truyen U, Muller T, Heidrich R, Tackmann K, Carmichael LE. Survey on viral pathogens in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) in Germany with emphasis on parvoviruses and analysis of a DNA sequence from a red fox parvovirus. *Epidemiology & Infection* 1998; 121: 433-40.

Truyen U. Evolution of canine parvovirus—A need for new vaccines? *Veterinary Microbiology* 2006; 117: 9-13.

Truyen U, Addie D, Belak S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Hosie MJ, Lloret A, Lutz H, Marsilio F, Pennisi MG, Radford AD, Thiry E, Horzinek MC. Feline panleukopenia. ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2009; 11: 538-46.

Truyen U, Parrish CR. Feline panleukopenia virus: Its interesting evolution and current problems in immunoprophylaxis against a serious pathogen. *Veterinary Microbiology* 2013; 165: 29-32.

Truyen U. Familie Parvoviridae. In: *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, 10 edn: 2015: 458-64.

Tsao J, Chapman MS, Agbandje M, Keller W, Smith K, Wu H, Luo M, Smith TJ, Rossmann MG, Compans RW, et al. The Three-Dimensional Structure of Canine Parvovirus and Its Functional Implications. *Science* 1991; 251: 1456-64.

Van den Doel P, Volz A, Roose J, Sewbalaksing V, Pijlman G, van Middelkoop I, Duiverman V, van de Wetering E, Sutter G, Osterhaus A. Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara Expressing Glycoprotein E2 of Chikungunya Virus Protects AG129 Mice against Lethal Challenge. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2014; 8: e3101.

Van Rompay KKA, Greenier JL, Cole KS, Earl P, Moss B, Steckbeck JD, Pahar B, Rourke T, Montelaro RC, Canfield DR, Tarara RP, Miller C, McChesney MB, Marthas ML. Immunization of Newborn Rhesus Macaques with Simian Immunodeficiency Virus (SIV) Vaccines Prolongs Survival after Oral Challenge with Virulent SIVmac251. *Journal of Virology* 2003; 77: 179-90.

Veits J, Römer-Oberdörfer A, Helferich D, Durban M, Suezer Y, Sutter G, Mettenleiter T. Protective efficacy of several vaccines against highly pathogenic H5N1 avian influenza virus under experimental conditions. *Vaccine* 2008; 26: 1688-96.

Verge J, Cristoforoni N. La gastro-enterite infectieuse des chats; est-elle due a un virus filtrable? *Comptes Rendus Biologies* 1928; 312-4.

Vihinen-Ranta M, Wang D, Weichert WS, Parrish CR. The VP1 N-Terminal Sequence of Canine Parvovirus Affects Nuclear Transport of Capsids and Efficient Cell Infection. *Journal of Virology* 2002; 76: 1884-91.

Volz A, Langenmayer M, Jany S, Kalinke U, Sutter G. Rapid Expansion of CD8+ T Cells in Wild-Type and Type I Interferon Receptor-Deficient Mice Correlates with Protection after Low-Dose Emergency Immunization with Modified Vaccinia Virus Ankara. *Journal of Virology* 2014; 88: 10946-57.

Volz A, Kupke A, Song F, Jany S, Fux R, Shams-Eldin H, Schmidt J, Becker C, Eickmann M, Becker S. Protective efficacy of recombinant Modified Vaccinia virus Ankara (MVA) delivering Middle East Respiratory Syndrome coronavirus spike glycoprotein. *Journal of Virology* 2015: 614-15.

Waibler Z, Anzaghe M, Ludwig H, Akira S, Weiss S, Sutter G, Kalinke U. Modified Vaccinia Virus Ankara Induces Toll-Like Receptor-Independent Type I Interferon Responses. *Journal of Virology* 2007; 81: 12102-10.

Wang Z, Martinez J, Zhou W, La Rosa C, Srivastava T, Dasgupta A, Rawal R, Li Z, Britt WJ, Diamond D. Modified H5 promoter improves stability of insert genes while maintaining immunogenicity during extended passage of genetically engineered MVA vaccines. *Vaccine* 2010; 28: 1547-57.

Weichert WS, Parker JSL, Wahid ATM, Chang S-F, Meier E, Parrish CR. Assaying for Structural Variation in the Parvovirus Capsid and Its Role in Infection. *Virology* 1998; 250: 106-17.

Weidinger G, Ohlmann M, Schlereth B, Sutter G, Niewiesk S. Vaccination with recombinant modified vaccinia virus Ankara protects against measles virus infection in the mouse and cotton rat model. *Vaccine* 2001; 19: 2764-8.

Weyer J, Rupprecht CE, Mans J, Viljoen GJ, Nel LH. Generation and evaluation of a recombinant modified vaccinia virus Ankara vaccine for rabies. *Vaccine* 2007; 25: 4213-22.

Wyatt L, Shors S, Murphy B, Moss B. Development of a replication-deficient recombinant vaccinia virus vaccine effective against parainfluenza virus 3 infection in an animal model. *Vaccine* 1996; 14: 1451-8.

Wyatt LS, Earl PL, Liu JY, Smith JM, Montefiori DC, Robinson HL, Moss B. Multiprotein HIV Type 1 Clade B DNA and MVA Vaccines: Construction, Expression, and Immunogenicity in Rodents of the MVA Component. *AIDS research and human retroviruses* 2004; 20: 645-53.

Wyatt LS, Earl PL, Xiao W, Americo JL, Cotter CA, Vogt J, Moss B. Elucidating and minimizing loss of vaccinia virus recombinant HIV gene expression resulting from spontaneous mutations and positive selection. *Journal of Virology* 2009;

Zádori Z, Szelei J, Lacoste M, Li Y, Gariépy S, Raymond P, Allaire M, Nabi IR, Tijssen P. A Viral Phospholipase A₂ Is Required for Parvovirus Infectivity. *Developmental cell* 2001; 1: 291-302.

Zaki AM, Van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. *New England Journal of Medicine* 2012; 367: 1814-20.

Zhu Y-d, Rota P, Wyatt L, Tamin A, Rozenblatt S, Lerche N, Moss B, Bellini W, McChesney M. Evaluation of Recombinant Vaccinia Virus—Measles Vaccines in Infant Rhesus Macaques with Preexisting Measles Antibody. *Virology* 2000; 276: 202-13.

Zumla A, Hui DS, Perlman S. Middle East respiratory syndrome. *The Lancet* 2015; 386: 995-1007.

IX. ANHANG

1. Chemikalien und Nährmedien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose LE	Biozym, Wien
Alsever's Solution	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
Ampicillin	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
Deoxynucleotide (dNTP) Solution Mix	New England Biolabs, Ipswich USA
Gel Loading Dye, Purple (6x)	New England Biolabs, Ipswich USA
Gel Red	Biotium, Hayward USA
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Proteinase K	Merck, Darmstadt
PureYield Plasmid Miniprep System	Promega, Madison USA
QIAamp DNA Mini Kit (250)	Quiagen, Venlo Niederlande
Quick-Load® 2-Log DNA Ladder	New England Biolabs, Ipswich USA
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, Ipswich USA
Q5® Reaction Buffer	New England Biolabs, Ipswich USA
Tris	Appli Chem, Darmstadt
Triton X	Carl Roth, Karlsruhe
True Blue Peroxidase Reagent	KPL, Gaithersburg USA
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Ipswich USA
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega, Madison USA
X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent	Roche, Basel Schweiz

Tabelle 8: Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEA)	Sigma- Aldrich, St. Louis USA
VLE Dulbecco's MEM	Biochrom, Berlin
Fetales Kälberserumalbumin (FKS)	Sigma- Aldrich, St. Louis USA
HEPES	Sigma- Aldrich, St. Louis USA
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe

Minimum Essential Medium Eagle with Earle's salts (MEM)	Sigma- Aldrich, St. Louis USA
Minimum Essential Medium Eagle with Hank's salts (Hank's)	Sigma- Aldrich, St. Louis USA
Penicillin/Streptomycin (100x)	Sigma- Aldrich, St. Louis USA
SOC Outgrowth Medium	New England Biolabs, Ipswich USA
Trypsin-EDTA	Sigma- Aldrich, St. Louis USA
VP-SFM	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham USA

Tabelle 9: Nährmedien und Zusätze

2. Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung									
BBS pH=9	<table> <tr> <td>8%</td> <td>1,5 M NaCl</td> <td rowspan="4">} in Aqua dest.</td> </tr> <tr> <td>10%</td> <td>0,5 M H₃BO₃</td> </tr> <tr> <td>1,2%</td> <td>2 M NaOH</td> </tr> <tr> <td>0,2%</td> <td>BSA</td> </tr> </table>	8%	1,5 M NaCl	} in Aqua dest.	10%	0,5 M H ₃ BO ₃	1,2%	2 M NaOH	0,2%	BSA
8%	1,5 M NaCl	} in Aqua dest.								
10%	0,5 M H ₃ BO ₃									
1,2%	2 M NaOH									
0,2%	BSA									
Blocking Puffer Immunfärbung	<table> <tr> <td>0,2%</td> <td>BSA</td> </tr> <tr> <td>0,1%</td> <td>Triton X</td> </tr> <tr> <td>0,06%</td> <td>Natriumazid</td> </tr> </table> in PBS	0,2%	BSA	0,1%	Triton X	0,06%	Natriumazid			
0,2%	BSA									
0,1%	Triton X									
0,06%	Natriumazid									
LB-Medium	<table> <tr> <td>1%</td> <td>Trypton</td> <td rowspan="3">} in Aqua dest. autoklaviert</td> </tr> <tr> <td>0,5%</td> <td>Hefeextrakt</td> </tr> <tr> <td>1%</td> <td>NaCl</td> </tr> </table>	1%	Trypton	} in Aqua dest. autoklaviert	0,5%	Hefeextrakt	1%	NaCl		
1%	Trypton	} in Aqua dest. autoklaviert								
0,5%	Hefeextrakt									
1%	NaCl									
PBS	<table> <tr> <td>1,5 mM</td> <td>KH₂PO₄</td> </tr> <tr> <td>0,8 mM</td> <td>Na₂HPO₄</td> </tr> <tr> <td>137 mM</td> <td>NaCl</td> </tr> <tr> <td>3mM</td> <td>KCl</td> </tr> </table> pH 7,4	1,5 mM	KH ₂ PO ₄	0,8 mM	Na ₂ HPO ₄	137 mM	NaCl	3mM	KCl	
1,5 mM	KH ₂ PO ₄									
0,8 mM	Na ₂ HPO ₄									
137 mM	NaCl									
3mM	KCl									
TAE, 20x	<table> <tr> <td>0,32 M</td> <td>Tris</td> </tr> <tr> <td>2,3% (v/v)</td> <td>Essigsäure</td> </tr> <tr> <td>25 mM</td> <td>EDTA</td> </tr> </table> pH 8,0	0,32 M	Tris	2,3% (v/v)	Essigsäure	25 mM	EDTA			
0,32 M	Tris									
2,3% (v/v)	Essigsäure									
25 mM	EDTA									
VAD pH=4	<table> <tr> <td>0,15 M</td> <td>NaCl</td> </tr> <tr> <td>0,3 M</td> <td>NaH₂PO₄ x 2 H₂O</td> </tr> </table>	0,15 M	NaCl	0,3 M	NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O					
0,15 M	NaCl									
0,3 M	NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O									

Tabelle 10: Puffer und Lösungen

3. Antikörper und Konjugate

Name	Spezifität	Ursprung Klonalität	Markierung	Verdün- nung	Bezugsquelle
Mouse Anti Canine/Feline Parvovirus	Parvovirus	Maus monoklonal	-	1:200	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Anara Tigerserum	Parvovirus	Tiger polyklonal	-	1:200	Virologische Diagnostik
HRP-Prot A	Säuger-IgG	Staphylo- coccus aureus	Peroxidase	1:500	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
FITC-Prot A	Säuger-IgG	Staphylo- coccus aureus	Floureszenz	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Alexa Fluor® 488F (ab') 2 fragment of goat anti-mouse IgG (H+L)	Maus IgG	Ziege polyklonal	Floureszenz	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Anti-Vaccinia Virus (Lister Strain) purified	Vaccinia Virus	Kaninchen polyklonal	-	1:2000	Acris Antibodies, Herford
Goat-anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP	Kaninchen IgG	Ziege polyklonal	Peroxidase	1:5000	Dianova, Hamburg

Tabelle 11: Antikörper und Konjugate mit Eigenschaften und Bezugsquelle

4. Enzyme

Bezeichnung	Bezugsquelle
BamHI-HF®	New England Biolabs, Ipswich USA
KpnI-HF®	New England Biolabs, Ipswich USA
SaII-HF®	New England Biolabs, Ipswich USA
NotI-HF®	New England Biolabs, Ipswich USA
HindIII-HF®	New England Biolabs, Ipswich USA
SpeI-HF®	New England Biolabs, Ipswich USA
PstI-HF®	New England Biolabs, Ipswich USA

Tabelle 12: Restriktionsendonukleasen und deren Bezugsquelle

5. Geräte und Materialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Ultraschallgerät Sonoplus mit Schallbecher UW2200 und Spitze	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
ChemiDoc MP System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Transilluminator UST-30M-8R	Biostep, Burkhardtsdorf
Avanti® J-26XP	Beckman Coulter Biomedical GmbH, München
Vortex-Schüttler Paramix II	Julabo GmbH, Seelbach
Sigma 3-16	Sigma Centrifuges, Shrewsbury UK
Optima™ LE-80K Ultracentrifuge	Beckman Coulter Biomedical GmbH, München
Elektronenmikroskop IM10	Carl Zeiss GmbH, Oberkochen
Inversmikroskop MBL3200	A. Krüss Optronic GmbH, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop CKX41	Olympus Europa GmbH, Hamburg
Kompaktes Fluoreszenzmikroskop BZ-X710	Keyence, Ōsaka Japan
Brutschrank New Brunswick, Galaxy 170 S	Eppendorf AG, Hamburg
Zellkulturplatten und -flaschen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Wasserbad	Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg
pH-Meter	Inolab, Weilheim
Schüttelinkubator KS10	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
peqSTAR 2X Thermocycler	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Tabelle 13: Geräte und Materialien und deren Bezugsquelle

6. Bakterien

5-alpha Competent E.Coli (High Efficiency)	New England Biolabs, Ipswich USA
--	----------------------------------

Tabelle 14: Bakterien und deren Bezugsquelle

7. Sequenzen

VP1-Sequenz:

10 20 30 40 50 60
GGTACCTCCA**AACCCACCCGCTTTTTATAGTAAGTTTTTCACCCATAAATA**GGATCC**ACCAT**GGCAC
 CTCCGGCAAAGAGAGCCAGGATAGGACTTGTGCCTCCAGTTATAAATATCTTGGGCCTGGGAACA
 GTCTTGACCAAGGAGAACCAACTAACCTTCTGACGCCGCTGCAAAAGAACACGACGAAGCTTACG
 CTGCTTATCTTCGCTCTGGTAAAAACCCATACTTATATTTCTCGCCAGCAGATCAACGCTTTATAGAT
 CAAACTAAGGACGCTAAAGATTGGGGAGGAAAAATAGGACATTATTTCTTTAGAGCTAAAAAGGCAA
 TTGCTCCAGTATTAAGTACACCCAGATCATCCATCAACATCAAGACCAACAAAACCAACTAAAAGA
 AGTAAACCACCACCTCATATTTTCATCAATCTTGCAAAAAAAAAAAGCCGGTGCAGGACAAGTAA
 AAAGAGACAATCTTGCACCA**ATG**AGTGATGGAGCAGTTCAACCAGACGGTGGTCAACCTACTGTCA
 GAAATGAAAGAGCTACAGGATCTGGGAACGGGTCTGGAGCGGAGGTGGTGGTGGTTCTGGAGGT
 GTGGGAATTTCTACGGGTACTTTCAATAATCAGACGGAATTTAAATTTTTGGAAAACGGATGGGTGG
 AAATCACAGCAAACTCAAGCAGACTTGTACATTTAAATATGCCAGAAAAGTAAAAATTATAAAAGAGTA
 GTTGTAATAATATGGATAAAACTGCAGTTAAAGGAAACATGGCTTTAGATGATACTCATGTACAAAT
 TGTAACACCTTGGTCATTGGTTGATGCAAATGCTTGGGGAGTTTGGTTAATCCAGGAGATTGGCAA
 CTAATTGTTAATACTATGAGTGAGTTGCATTTAGTTAGTTTTGAACAAGAAATTTTAAATGTTGTTTTA
 AAGACTGTTTTCAGAATCTGCTACTCAGCCACCAACTAAAGTTTATAATAATGATTTAACTGCATCATT
 GATGGTTGCATTAGATAGTAATAACTATGCCATTTACTCCAGCAGCTATGAGATCTGAGACATTG
 GGTCTTCTATCCATGGAAACCAACCATAACCACTCCATGGAGATATTATTTTCAATGGGATAGAACATT
 AATACCATCTCATACTGGAAGTGGTGGCACACCAACAAATGTATATCATGGTACAGATCCAGATGAT
 GTTCAATTTTATACTATTGAAAATTCTGTGCCAGTACACTACTAAGAACAGGTGATGAATTTGCTAC
 AGGAACATTTCTTTGATTGTAACCATGTAGACTAACACATACATGGCAAACAAATAGAGCATTGG
 GCTTACCACCTTTCTAAATTTCTTGCCTCAATCTGAAGGAGCTACTAACTTTGGTGATATAGGAGTT
 CAACAAGATAAAAGACGTGGTGTAACTCAAATGGGAAATACAGACTATATTACTGAAGCTACTATTAT
 GAGACCAGCTGAGGTTGGTTATAGTGCACCATATTATTTCTTTGAAGCATCTACACAAGGGCCATTT
 AAAACACCTATTGCAGCAGGACGAGGAGGAGCGCAAACAGATGAAAATCAAGCAGCAGATGGTGAT
 CCAAGATATGCATTTGGTAGACAACATGGTCAAAAACTACTACAACAGGAGAAACACCCGAGAGAT
 TTACATATATAGCACATCAAGATACAGGAAGATATCCAGAAGGAGATTGGATTCAAATATTAACCTT
 AACCTTCCTGTAACAAATGATAATGTATTGCTACCAACAGATCCAATTGGAGGTAAAACAGGAATTAA
 CTATACTAATATATTTAATACTTATGGTCCTTTAACTGCATTAATAATGTACCACCAGTTTATCCAAA
 TGGTCAAATTTGGGATAAAGAATTTGATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAAATGCACCATTTG
 TTTGTCAAATAATTGTCCTGGTCAATTATTTGTAAAAGTTGCGCCTAATTTAACAAATGAATATGATC
 CTGATGCATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTGACTTACTCAGATTTTTGGTGGAAAGGTAAATTAGTA
 TTTAAAGCTAAACTAAGAGCATCTCATACTTGAATCCAATTCAACAAATGAGTATTAATGTAGATAA
 CCAATTTAACTATGTACCAAATAATATTGGAGCTATGAAAATTGTATATGAAAAATCTCAACTAGCAC
 CTAGAAAATTATATTAGTAGCGCGCCGCTCGAC

GGTACC KpnI **Promoter p7.5late** **G/GATCC** BamHI **ACC** Kozak **ATG/TAG** Start-/Stopp-Codon
GC/GGCCGC NotI **GTCGAC** SalI

Unterstrichen sind die Modifikationen, um das Ablesen durch die MVA-RNA-Polymerase zu verbessern.

VP2 nach Amplifikation aus VP1 mit den Primern FPV_VP2_for und _rev:

```

          10          20          30          40          50          60
GGATCCACCATGAGTGATGGAGCAGTTCAACCAGACGGTGGTCAACCTACTGTCAGAAATGAA
AGAGCTACAGGATCTGGGAACGGGTCTGGAGGCCGAGGTGGTGGTGGTTCTGGAGGTGTGG
GAATTTCTACGGTACTTTCAATAATCAGACGGAATTTAAATTTTTGGAAAACGGATGGGTGGA
AATCACAGCAAACCTCAAGCAGACTTGTACATTTAAATATGCCAGAAAGTGAAAATTATAAAAGAG
TAGTTGTAATAATATGGATAAAACTGCAGTTAAAGGAAACATGGCTTTAGATGATACTCATGTA
CAAATTGTAACACCTTGGTCATTGGTTGATGCAAATGCTTGGGGAGTTTGGTTTAAATCCAGGAG
ATTGGCAACTAATTGTTAATACTATGAGTGAGTTGCATTTAGTTAGTTTTGAACAAGAAATTTTA
ATGTTGTTTTAAAGACTGTTTCAGAATCTGCTACTCAGCCACCAACTAAAGTTTATAATAATGATT
TAACTGCATCATTGATGGTTGCATTAGATAGTAATAACTATGCCATTTACTCCAGCAGCTATG
AGATCTGAGACATTGGGTTTCTATCCATGGAAACCAACCATACCAACTCCATGGAGATATTATTT
TCAATGGGATAGAACATTAATACCATCTCATACTGGAAGTAGTGGCACACCAACAAATGTATATC
ATGGTACAGATCCAGATGATGTTCAATTTATACTATTGAAAATTCTGTGCCAGTACACTTACTA
AGAACAGGTGATGAATTTGCTACAGGAACATTTCTTTGATTGTAAACCATGTAGACTAACACA
TACATGGCAAACAAATAGAGCATTGGGCTTACCACCATTTCTAAATTTCTTGCCTCAATCTGAAG
GAGCTACTAACTTTGGTGATATAGGAGTTCAACAAGATAAAAAGACGTGGTGTAACTCAAATGGG
AAATACAGACTATATTACTGAAGCTACTATTATGAGACCAGCTGAGGTTGGTTATAGTGCACCAT
ATTATCTTTTGAAGCATCTACACAAGGGCCATTTAAACACCTATTGCAGCAGGACGAGGAGG
AGCGCAAACAGATGAAAATCAAGCAGCAGATGGTGATCCAAGATATGCATTTGGTAGACAACAT
GGTCAAAAAACTACTACAACAGGAGAAACACCCGAGAGATTTACATATATAGCACATCAAGATA
CAGGAAGATATCCAGAAGGAGATTGGATTCAAAATATTAACTTTAACTTCTCCTGTAACAAATGAT
AATGTATTGCTACCAACAGATCCAATTGGAGGTAACAGGAATTAATACTATACTAATATATTTAA
TACTTATGGTCCTTTAACTGCATTAATAATGTACCACAGTTTATCCAAATGGTCAAATTTGGG
ATAAAGAATTTGATACTGACTTAAACCAAGACTTCATGTAATGCACCATTTGTTTGTCAAATA
ATTGTCCTGGTCAATTATTTGTAAGTTGCGCCTAATTTAACAAATGAATATGATCCTGATGCA
TCTGCTAATATGTCAAGAATTGTGACTTACTCAGATTTTTGGTGGAAAGGTAAATTAGTATTTAA
AGCTAAACTAAGAGCATCTCATACTTGAATCCAATTCACAAATGAGTATTAATGTAGATAACC
AATTTAACTATGTACCAAATAATATTGGAGCTATGAAAATTGTATATGAAAAATCTCAACTAGCAC
CTAGAAAATTATATTAGTAGCGGCCGC

```

G/GATCC BamHI ACC Kozak ATG/TAG Start-/Stopp-Codon GC/GGCCGC NotI

Primer FPV_VP2_for: AGCTAGGATCCACCATGAGTGATGGAGCAGTTCAAC

FPV_VP2_rev: TAGCTCGGCCGCCTACTAATAT

VP1_{mod} nach Modifikation des VP2- Anteils:

10 20 30 40 50 60
 GGTACC TCCA ACCCACCGCTTTTATAGTAAGTTTTTCACCCATAAATAGGATCCACCATGGCAC
 CTCCGGCAAAGAGAGCCAGGATAGGACTTGTGCCTCCAGGTTATAAATATCTTGGGCCTGGGAACA
 GTCTTGACCAAGGAGAACCAACTAACCTTCTGACGCCGCTGCAAAAGAACACGACGAAGCTTACG
 CTGCTTATCTTCGCTCTGGTAAAAACCCATACTTATATTTCTCGCCAGCAGATCAACGCTTTATAGAT
 CAAACTAAGGACGCTAAAGATTGGGGAGGAAAAATAGGACATTATTTCTTTAGAGCTAAAAAGGCAA
 TTGCTCCAGTATTAAGTACACAGATCATCCATCAACATCAAGACCAACAAAACCAACTAAAAGA
 AGTAAACCACCACCTCATATTTTCATCAATCTTGCAAAAAAAAAAAAAAGCCGGTGCAGGACAAGTAA
 AAAGAGACAATCTTGCACCAATGTCGGACGGGGCGGTCCAGCCGGATGGCGGCCAGCCAACGGT
GCGTAACGAGCGTGCGACCGGCAGCGGAAATGGTAGCGGCGGAGGCGGGGGCGGCGGCAGCGG
CGGCGTAGGTATATCAACCGGAACATTTAACACCAAACCGAGTTCAAGTTCTTAGAGAATGGTTGG
GTCGAGACTACTGCTAATTCTAGTAGGTTAGTTCACCTTAACATGCCTGAGTCTGAGAACTACAAGC
GGGTTGTAGTTAACACATGGACAAGACAGCTGTAAAGGGTAATATGGCACTCGACGACACACACG
TTAGATAGTTACTCCATGGAGCCTAGTAGACGCTAACGCATGGGGTGTATGGTTCAACCCTGGTG
ACTGGCAGTTAATAGTAAACACAATGTCAGAATTACACCTCGTATCATTGAGCAGGAGATATTCAA
CGTAGTACTAAAAACAGTAAGCGAGAGCGCAACACAACCTCCTACAAAGGTATACAACAACGACCTA
ACAGCTAGTCTTATGGTAGCTCTTGACTCAAACAACAATGCCTTTACACCTGCTGCAATGCGTA
GTGAAACTCTAGGATTTTACCCTTGAAGCCTACGATTCTACACCTTGGCGTTACTACTTCCAGTG
GGACCGTACTCTTATTCCTAGCCACACAGGTACATCAGGGACTCCTACTAACGTTTACCACGGAAC
GACCCTGACGACGTACAGTTCTACACAATAGAGAACAGTGTCCCTGTTTCATCTTTTGAGGACTGGAG
ACGAGTTTCGCAACTGGTACTTTCTTCTTTCGACTGCAAGCCTTGCCGTTTGACTCACACTTGGCAGAC
TAACCGTGCTCTAGGGCTTCTCCTTTCTTGAACAGTCTACCACAGAGTGAGGGTGAACAAATTTT
GGAGACATTGGTGTACAGCAGGACAAGCGTAGAGGAGTTACACAGATGGGTAACACTGATTACATA
ACAGAGGCAACAATAATGCGACCTGCAGAAGTAGGATACTCTGCTCCTTACTACAGTTTCGAGGGTA
GTACTCAGGGCCCTTTCAAGACTCCAATAGCTGCTGGTAGGGTGGTGCCAGACTGACGAGAAC
CAGGCTGCTGACGGAGACCCTCGTTACGCTTTTCGGACGTCAGCACGGACAGAAGACAACAACACTACT
GGTGAGACTCCGGAACGATTCACTTACATTGCTCACCGAGACTGGTCGATACCCTGAGGGTGAC
TGGATACAGAACATAAATTTCAATTTGCCAGTACTAACGACAACGTTCTATTGCCTACTGACCCTAT
AGGTGGAAAGACTGGTATAAATTACACAACATCTTCAACACATACGGACCACTTACAGCTCTGAAC
AACGTTCTCCTGTATACCCTAACGGACAGATATGGGACAAGGAGTTCGACACAGATCTTAAGCCTC
GTTTGCACGTTAACGCTCCTTTTCGTATGCCAGAACAACCTGCCAGGACAGCTATTTCGTTAAGGTAGC
CCCAAACCTTACTAACGAGTACGACCCAGACGCTAGTGCAAACATGAGTCGTATAGTAACATATAGT
GACTTCTGGTGGAAAGGAAAGCTTGTGTTCAAGGCAAAGTTGCGTGCCAGTCACACATGGAACCCT
ATACAGCAGATGTCTATAAACGTTGACAATCAGTTCAATTACGTTCTAACAAACATAGGTGCAATGAA
GATAGTTTACGAGAAGAGTCAGTTGGCTCCACGTAAGCTTTATTAGTAGGCGGCCGCGTCGAC

GGTACC KpnI Promoter p7.5late G/GATCC BamHI ACC Kozak ATG/TAG Start-/Stopp-Codon
 GC/GGCCGC NotI GTCGAC SalI

Unterstrichen ist der VP2-Anteil, dessen Nukleotidsequenz modifiziert wurde, um eine homologe
 Rekombination zwischen VP1 und VP2 im Doppelkonstrukt zu verhindern.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Zeichnung der VP2-Polypeptid Topologie.....	6
Abbildung 2:	Oberfläche des CPV-Kapsids, dargestellt mittels Röntgenkristallographie	8
Abbildung 3:	Elektronenmikroskopische Aufnahme von CPV-Virionen	9
Abbildung 4:	Phylogenetische Verwandtschaft des FPV_ML2012	28
Abbildung 5:	Konstruktion des rekombinanten MVA-Vektorvirus	37
Abbildung 6:	Protokoll Immunzytochemie	41
Abbildung 7:	Konstruktion des rekombinanten MVA_VP1_VP2	44
Abbildung 8:	Restriktionsanalyse des Plasmids pUC-57-VP1	45
Abbildung 9:	Schematisch Darstellung der Vektorplasmide pLW-73-VP1 bzw. pLW-73-VP1 _{mod.}	46
Abbildung 10:	Schematisch Darstellung der Vektorplasmide pIIIPmH5Red-VP1 bzw. pIIIPmH5Red-VP2.....	46
Abbildung 11:	PCR-Amplifikation des VP2-Gens aus dem pUC-57-VP1.	47
Abbildung 12:	Restriktionsanalyse des Vektorplasmids pIIIPmH5Red-VP1.....	48
Abbildung 13:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen transfizierter DF1-Zellen.	49
Abbildung 14:	PCR-Analyse der sechs Deletionsstellen des MVA_F6.....	50
Abbildung 15:	PCR-Analyse der sechs Deletionsstellen des MVA_PmH5_VP1	51
Abbildung 16:	PCR-Analyse der sechs Deletionsstellen des MVA_PmH5_VP2	51
Abbildung 17:	PCR-Analyse der sechs Deletionsstellen und der Insertionsstelle I8R-G1L des MVA_P7.5late_VP1	52
Abbildung 18:	PCR-Analyse der sechs Deletionsstellen und der Insertionsstelle I8R-G1L des MVA_VP1_VP2.....	52
Abbildung 19:	Insert-PCR der finalen MVA-Konstrukte	53
Abbildung 20:	Mehrstufen-Wachstumsanalysen der rekombinanten MVA-Konstrukte	54
Abbildung 21:	Immunzytochemie der FPV-Strukturproteine in infizierten Vero-Zellen.....	56/57
Abbildung 22:	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von MVA_PmH5_VP2- und MVA_PmH5_VP1-infizierten DF1-Zellen	58
Abbildung 23:	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von MVA_VP1_VP2-infizierten DF1-Zellen.....	59
Abbildung 24:	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von MVA_PmH5_VP2-infizierten DF1-Zellen.....	59
Abbildung 25:	Elektronenmikroskopische Aufnahme von MVA_PmH5_VP1-infizierten DF1-Zellen.....	60
Abbildung 26:	Elektronenmikroskopische Aufnahme einer FPV_ML2012-haltigen Kotprobe. .	60
Abbildung 27:	Elektronenmikroskopische Aufnahme von MVA_F6-infizierten DF1-Zellen	60
Abbildung 28:	Elektronenmikroskopische Aufnahme nicht-infizierter DF1-Zellen	60
Abbildung 29:	Hämagglutinierende Eigenschaften	61

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht aller in dieser Arbeit verwendeten Zellen und Zelllinien	25
Tabelle 2: Übersicht aller in dieser Arbeit verwendeten Viren	27
Tabelle 3: Übersicht aller in dieser Arbeit verwendeten Plasmide	30
Tabelle 4: Protokoll Restriktionsverdau mit zwei Endonukleasen.....	31
Tabelle 5: Protokoll PCR	32
Tabelle 6: Übersicht aller in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotidprimer.	33/34
Tabelle 7: Protokoll Ligation	35
Tabelle 8: Chemikalien und Reagenzien	97
Tabelle 9: Nährmedien und Zusätze	98
Tabelle 10: Puffer und Lösungen	98
Tabelle 11: Antikörper und Konjugate mit Eigenschaften und Bezugsquelle	99
Tabelle 12: Restriktionsendonukleasen und deren Bezugsquelle	99
Tabelle 13: Geräte und Materialien und deren Bezugsquelle	100
Tabelle 14: Bakterien und deren Bezugsquelle	100

X. DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. Gerd Sutter herzlichst für die äußerst fachkundige und stets freundliche Unterstützung, sowie für die rasche und gründliche Korrektur meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Robert Fux, dessen Begeisterung und Leidenschaft für seinen Beruf mich täglich neu motiviert haben. Nur durch seine tatkräftige Unterstützung und seine Bereitschaft sämtliche Fragen jederzeit zu beantworten, konnte diese Arbeit in dieser Form entstehen. Tschakka Robert, wir haben's geschafft!

Meinen Mitdotorandinnen Ellen Link, Anna Lülfi, Lisa Marr, Katharina Müller, Martina Resch und Monique Richards danke ich für die fantastische Zusammenarbeit, die vielen lustigen und manchmal traurigen Stunden im Doktorandenzimmer und in unserer Freizeit. Ihr seid einfach die besten Kolleginnen der Welt und ich werde euch sehr vermissen!

Weiterhin möchte ich mich bei Andrea Jahnke für die Aufnahme der elektronenmikroskopischen Bilder bedanken, sowie für unsere netten und immer witzigen Katzen-Gespräche.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Virologie danke ich für die sehr freundliche Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft in jeglichen Situationen.

Den wichtigsten Menschen - ohne deren Aufmunterung, Beistand und motivierenden Worte ich diese Doktorarbeit vielleicht nie geschafft hätte - Tobias Wörl, Anja Herzog und Rike Winkler möchte ich danken, dass sie mich und meine manchmal nervigen Entscheidungsfragen stets ertragen und letztere so gut wie möglich beantwortet haben.

Meiner kleinen Schwester Helena Herzog, sowie meinen Großeltern und meiner Tante Edda Messner danke ich für die moralische Unterstützung und die liebevollen Worte, als ich sie am meisten brauchte.