

**Untersuchung rekombinanter Modifizierter Vacciniaviren  
Ankara hinsichtlich ihrer Eignung als Hendra-Virus-  
spezifische Impfstoffkandidaten**

von Martina Resch

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

**Untersuchung rekombinanter Modifizierter Vacciniaviren Ankara hinsichtlich ihrer Eignung  
als Hendra-Virus-spezifische Impfstoffkandidaten**

von

Martina Resch  
aus München

München 2016

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

Lehrstuhl für Virologie  
Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen

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

Mitbetreuung durch: Dr. med. vet. Asisa Volz

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Korreferent/in: Prof. Dr. Herbert Kaltner

Tag der Promotion: 16. Juli 2016

Meinen Eltern.

Meinem Vater Josef und meiner Mama Marita.

*„You just need to persevere.“*

Dr. Philip Price

# Inhaltsverzeichnis

I Einleitung.....	1
II Literaturübersicht .....	2
1. Das Hendra-Virus (HeV) .....	2
1.1 Entdeckung des neuen Erregers .....	2
1.1.1 Erstausbruch - eine neue Krankheit tritt auf .....	2
1.1.2 Die Jahre 1994-2010 .....	3
1.1.3 2011 .....	5
1.1.4 Hendra von 2011 bis heute.....	6
1.2 Taxonomie und Aufbau des Virus .....	9
1.2.1 Das Genus Henipavirus.....	9
1.2.2 Klassifikation .....	10
1.2.3 Morphologie.....	11
1.2.4 Das Genom.....	11
1.2.5 Erregerdiversität.....	13
1.2.6 Beispiele viraler Proteine .....	13
1.2.6.1 Das G- Protein.....	14
1.2.6.2 Das F-Protein .....	15
1.2.6.3 Die P-Gen-Produkte .....	17
1.2.7 Replikationszyklus .....	18
1.3 Pathogenese.....	19
1.4 Flughunde als Wirt.....	20
1.5 Prävention .....	21
2. Das Modifizierte Vacciniavirus Ankara (MVA).....	22
3. Zielsetzung der Arbeit.....	25
III Material und Methoden.....	26
1. Chemikalien und Reagenzien.....	26
2. Puffer und Lösungen .....	26
3. Kommerzielle Kits .....	27
4. Nährmedien und Zusätze .....	27
5. Zelllinien .....	28
6. Plasmide .....	28
7. Enzyme.....	29
8. Viren.....	29
9. Antikörper .....	29
9.1 Nicht-konjugierte Antikörper.....	29
9.2 Konjugierte Antikörper .....	30
10. Synthetische Oligonukleotide (Primer).....	30

12. Verbrauchsmaterial.....	31
13. Software .....	32
14. Geräteliste .....	32
15. Zellkultur.....	33
15.1 Auftauen von Zellen.....	33
15.2 Kultivierung und Passagierung permanenter Zelllinien.....	33
15.3 Bestimmung der Zellzahl .....	33
16. Molekular- und mikrobiologische Methoden .....	34
16.1 Präparation viraler DNA .....	34
16.2 PCR (Polymerasekettenreaktion).....	34
16.3 Auftrennung von DNA-Fragmenten via Gelelektrophorese .....	37
17. Virologische Methoden .....	38
17.1 Infektion von Zellen.....	38
17.2 Bestimmung des Virustiters .....	38
17.3 Wachstumskinetik – Mehrstufenwachstumsanalyse .....	40
18. Proteinbiochemische Methoden.....	41
18.1 Gewinnung von Proteinlysaten aus infizierten Zellen .....	41
18.2 Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine via SDS-Page .....	41
18.2.1 Erstellung von SDS-Page-Gelen.....	42
18.2.2 Durchführung des SDS-Page .....	43
18.3 Western blot (Tank-Blot-Verfahren).....	43
18.3.1 Proteintransfer.....	43
18.3.2 Proteinnachweis .....	44
18.4 Strippen .....	45
IV Ergebnisse .....	46
1. Aufbau der Konstrukte .....	46
1.1 MVA_HeV-F .....	46
1.2 MVA_HeV-G .....	46
1.3 MVA_HeV-sG.....	47
2. Molekularbiologische Charakterisierung der rekombinanten Viren .....	48
.....	53
3. Wachstumsanalysen auf verschiedenen Zelllinien.....	54
4. Analyse der rekombinanten Proteine .....	56
4.1 Cef-Zellen .....	57
4.2 HeLa-Zellen .....	59
4.3 Equine Fibroblasten .....	61
V Diskussion .....	63
1. Generierung der Vakzinekonstrukte.....	63
2. Bewertung der Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen.....	65
2.1 Intaktheit des Genoms.....	65
2.2 Vermehrungsfähigkeit der rekombinanten Viren .....	66

2.3 Produktion rekombinanter HeV-Proteine.....	68
2.4 Bewertung der Gesamtheit der Ergebnisse .....	70
3. Weitergehende Arbeiten .....	71
VI Zusammenfassung .....	73
VII Summary.....	75
VIII. Literaturverzeichnis.....	76
IX. Anhang.....	97
1. Tabellenverzeichnis.....	97
2. Abbildungsverzeichnis .....	98
3. Abkürzungsverzeichnis .....	99



# I Einleitung

Der erste datierte Hendra-Virus Ausbruch im Jahre 1994 in der Nähe von Brisbane, Australien, betraf 21 Pferde und zwei Personen. Vierzehn Tiere und ein Mensch, der im direkten Kontakt mit den erkrankten Pferden stand, starben.

Die neuartige Erkrankung ging einher mit grippeähnlichen Symptomen, die sich hauptsächlich in Fieber und schwerer respiratorischer Problematik sowie zentralnervösen Störungen manifestierten. Man identifizierte ein bis dahin unbekanntes Virus der Familie der *Paramyxoviridae* als Erreger des Krankheitsbildes. Die ursprüngliche Annahme, dass es sich um ein Morbillivirus handelte, wurde rasch korrigiert und das Hendra-Virus einem neuen Genus Henipavirus zugeordnet.

Als natürliches Reservoir und asymptomatische Träger dieser Viren wurden verschiedene Arten der Gattung der Flughunde (*Pteropus* sp.) identifiziert. Da Flughunde in Süd- und Mittelamerika, Afrika und Südostasien beheimatet sind und auch dort als Träger von Paramyxoviren ausgemacht werden konnten, kann eine weitere Verbreitung von Henipa-like-viruses nicht ausgeschlossen werden.

Die vom Hendra-Virus hervorgerufene Erkrankung weist eine außergewöhnlich hohe Letalität bei Mensch und Tier auf.

Aufgrund dieser Tatsache sowie der hohen Empfänglichkeit des Menschen für das Virus, dessen außergewöhnlich breites Wirtsspektrum, das Fehlen einer universell einsetzbaren, praktikablen Therapie oder Vakzine und das seit dem ersten Ausbruch nahezu jährliche Wiederkehren des Krankheitsbildes führten zur Einstufung in die höchste biologische Schutzstufe (BSL4).

Das Modifizierte Vacciniavirus Ankara (MVA), ein ausgesprochen sicheres Pockenimpfvirus, dient heute auch zur Expression heterologer Gensequenzen und zur Entwicklung und Untersuchung von Vektorimpfstoffen gegen mannigfaltige Infektionen und Tumorerkrankungen.

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene rekombinante MVA-Viren zur Expression von Hendra-Virus-Gensequenzen virologisch und molekularbiologisch charakterisiert.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen Aufschluss geben über die Eignung der rekombinanten Viren für den Einsatz als Testimpfstoff gegen Hendra-Virusinfektionen bei Mensch und Tier. Die Arbeit dient somit als Beitrag zur Begegnung einer wichtigen Zoonose, die derzeit ein ernstzunehmendes und bisher noch nicht abzuschätzendes Risiko darstellt.

## II Literaturübersicht

### 1. Das Hendra-Virus (HeV)

#### 1.1 Entdeckung des neuen Erregers

##### 1.1.1 Erstaussbruch - eine neue Krankheit tritt auf

Am 23. September 1994 erkrankten einundzwanzig Vollblutpferde in einem Stall nahe Brisbane, Australien. Die Tiere zeigten Anorexie, Depression, mitunter Ataxie und wiesen hohes Fieber (bis zu 41°C) auf. Im Vordergrund aber standen die starken respiratorischen Symptome und ein schaumiger, blutiger Nasenausfluss schien bezeichnend, der gerade terminal in nicht geringer Menge austrat. Am 26. September waren vierzehn Tiere verendet. Die übrigen betroffenen Tiere wiesen nur milde Klinik auf oder waren asymptomatisch; sie wurden jedoch im Verlauf des Ausbruchs getötet.

Vic Rail, Pferdetrainer in dem Stall bei Hendra, und ein Stallarbeiter bemühten sich, die Tiere zu pflegen und erkrankten kurze Zeit später ebenfalls; die Symptome erinnerten an eine Influenzavirus-Infektion mit hohem Fieber, Myalgie, Kopfschmerzen, Lethargie und Schwindel. Der Trainer verstarb eine Woche nach Beginn der Krankheit im Hospital an Nierenversagen und seinen starken respiratorischen Beschwerden.

Als "Patient 0" des Geschehens wurde eine trächtige Stute ausgemacht, die am 7. September bereits kränklich vom Weidepaddock in die Stallungen gebracht wurde; das Tier erlag der Erkrankung zwei Tage später, hatte aber in der Zwischenzeit bereits zwanzig weitere Tiere und auch die beiden Männer angesteckt. Bei dem Trainer hatten sich Abrasionen an den Armen entwickelt, nachdem er versucht hatte, die Stute zu füttern. Der Stallarbeiter erholte sich nur mühsam nach sechs Wochen klinisch manifester Symptome (Murray K et al. 1995, Selvey L et al. 1995).

Dank der Tatsache, dass sich nahe des Ausbruchsgeschehens zwei Labore mit entsprechend geeigneter Ausstattung befanden (University of Queensland, Brisbane und CSIRO Australian Animal Health Laboratory in Geelong, Victoria) wurde das verantwortliche Agens innerhalb einer Woche detektiert.

Die bei der Autopsie der Pferde entnommenen Gewebeproben wurden auf infektiöse Erreger untersucht, unter anderem beimpfte man Vero-Zellkulturen; hier zeigten sich nach drei Tagen bereits Synzytien. Dieser Vorgang erwies sich auf einigen anderen Zelllinien als reproduzierbar, wie beispielsweise auf MDBK, BHK, RK13 und LLK-MK2 (Nierenzelllinien von Rind, Hamster, Kaninchen und Rhesusaffe) (Murray K et al. 1995).

Die partielle Sequenzierung des Matrixgens offenbarte eine nahe Verwandtschaft zu den Mitgliedern des Genus Morbillivirus der Unterfamilie Paramyxoviridae. In der Folge wurde das neu entdeckte Virus zunächst als "Equines Morbillivirus" deklariert (Selvey L et al. 1995, Murray K et al. 1995). Da sich jedoch viele der genetischen Eigenschaften dieses Virus unter den Paramyxoviridae als einzigartig darstellten, beispielsweise die Genomgröße und die Sequenz des L-Gens, wurde schnell klar, dass ein neues Genus in dieser Unterfamilie geschaffen werden musste (Wang L et al. 1998, Wang L et al. 2000). Das Virus wurde schließlich nach dem Ort seines ersten Auftretens "Hendra-Virus" benannt (Murray K et al. 1998).

Bei der Suche nach der Herkunft des Virus wurden zunächst verschiedene Hypothesen geprüft; kontaminierte biologische Produkte wie Essensreste, illegale leistungssteigernde Substanzen und mutwillige Infektion der Tiere wurden vermutet. Da keine dieser Theorien Bestand hatte, zog man die Möglichkeit eines natürlichen Wirts in Betracht. Nach eineinhalb Jahren gezielter Forschung diesbezüglich konnte man neutralisierende Antikörper in Flughunden der Gattung Pteropus sp. (Ordnung Chiroptera) nachweisen (Field H et al. 2001, Halpin K et al. 2000, Halpin K et al. 2011, Young P et al. 1996).

### 1.1.2 Die Jahre 1994-2010

Der namensgebende Erstausbruch im Jahre 1994 bei Hendra blieb zunächst der zahlenmäßig Größte.

Das Virus weist zwar grundsätzlich eine langsame Transmission auf, ist aber, wenn die Infektion erfolgt, in den meisten Fällen letal. Es ist der Unvorsichtigkeit der agierenden Personen im Umgang mit den erkrankten Tieren zuzuschreiben, dass dieses erste Infektionsgeschehen derartige Ausmaße annehmen konnte. Zu bedenken gilt aber, dass ohne diese große Anzahl an betroffenen Tieren, und natürlich auch der beiden infizierten Personen, das Virus zu diesem Zeitpunkt eventuell nicht entdeckt worden wäre.

Im selben Jahr kam es zu einer Infektion in der Stadt Mackay, die etwa 1000km von Brisbane entfernt liegt. Dieser Vorfall ereignete sich sogar bereits im August, wurde aber erst retrospektiv als Hendra-Infektion identifiziert. Ein Farmer hatte der Autopsie zweier verendeter Pferde beigewohnt und sich hierbei infiziert. Nach einer milden Meningitis schien der Mann gesund; dreizehn Monate später erlag er jedoch der Viruserkrankung aufgrund einer akuten Enzephalitis (Anonymous. 1996).

Weitere Einzelfallinfektionen traten in Cairns (1999 und 2004) auf, welches ca. 1700km von Brisbane entfernt liegt, und ebenfalls im Jahr 2004 in Townsville (ca. 1350km Distanz zum

namensgebenden Ausbruch in Hendra).

Auch in den folgenden Jahren bis 2010 ereigneten sich die Vorfälle ausschließlich an der australischen Ostküste, allerdings mehrten sich die Ansteckungsfälle. Durchschnittlich kam es zu zwei Episoden pro Jahr, über eine Distanz von 1500km verteilt; meist waren einzelne Pferde betroffen oder kleinere Gruppen bis zu fünf Tieren. Menschen infizierten sich immer im Kontakt mit den betroffenen Equiden.

Insgesamt erkrankten in diesen sechzehn Jahren 45 Pferde, 31 Tiere davon letal, und sieben Menschen; nur drei von ihnen überlebten die Virusinfektion.

Zeitpunkt	Ort	Infizierte Pferde (tödlich)	Infizierte Menschen (tödlich)
1994 August	Mackay, QLD	2(2)	1(1)
1994 September	Hendra, QLD	20(13)	2(1)
1999 Januar	Trinity Beach (Cairns), QLD	1(1)	0
2004 Oktober	Gordonvale (Cairns), QLD	1(1)	1(0)
2004 Dezember	Townsville, QLD	1(1)	0
2006 Juni	Peachester, QLD	1(1)	0
2006 Oktober	Murwillumbah, NSW	1(1)	0
2007 Juni	Peachester, QLD	1(1)	0
2007 Juli	Clifton Beach (Cairns), QLD	1(1)	0
2008 Juli	Redlands, QLD	5(4)	2(1)
2008 Juli	Proserpine, QLD	3(2)	0
2009 Juli	Cawarral, QLD	4(3)	1(1)
2009 September	Bowen, QLD	2	0
2010 Mai	Tewantin, QLD	1	0
Insgesamt	14 Vorfälle	45(31)	7(4)

Tabelle 1: Auflistung der Hendra-Ausbrüche von 1994-2010 (modifiziert nach Lee und Rota 2012)

Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Rosemary McFarlane ergaben, dass zwölf dieser vierzehn Episoden zwischen Mai und Oktober stattfanden, also im australischen Winter. Diese Jahreszeit zeichnet sich durch niedrigere Temperaturen und geringere Niederschläge aus, sie wird auch als "dry season" bezeichnet. Ebenfalls in diesen Zeitraum fällt die Paarungs- und Wurfperiode bestimmter Flughundarten. Man postulierte die Theorie, dass die Flughunde saisonal (mehr) Virus ausschieden (McFarlane R et al. 2011).

Im selben Jahr konnte man im Urin von Flughunden Hendra-Virus nachweisen und darlegen, dass das Pathogen tatsächlich auf diese Weise sezerniert wird (Smith I et al. 2011).

## 1.1.3 2011

Eine drastische Häufung von Hendra- Ausbrüchen ereignete sich im Jahr 2011. 18 gemeldete Zwischenfälle mit 23 infizierten Pferden wurden in einem Zeitraum von Juni bis September gemeldet.

Auch die Geographie der Virusinfektionen hatte sich verändert; war zuvor bis auf den Fall in Murwillumbah ausschließlich der Bundesstaat Queensland betroffen, so weitete sich das Hendra-Gebiet südlich aus. Im angrenzenden New South Wales erfolgten acht Krankheitsausbrüche. Ebenso kam es zum ersten Vorfall im Landesinneren (Chinchilla, ca. 250km von der Küste entfernt) (Field H et al. 2012).

Erstaunlicherweise gab es bei dieser Episode keine menschlichen Infektionsfälle. Man schrieb dies der erhöhten Vorsicht im Umgang mit erkrankten Pferden zu, nachdem seit 2008 unaufhörlich Kampagnen zur Achtsamkeit vor dem Hendra-Virus von den australischen Behörden abgehalten worden waren (siehe Abb. 1).

Hinzu kam, dass die Krankheit der breiten Öffentlichkeit inzwischen ein Begriff war, so als Differentialdiagnose rascher in Betracht gezogen wurde und Quarantänebedingungen kompromissloser durchgeführt wurden; der gesamte Ablauf für den Verdachtsfall von der korrekten Probennahme bis hin zur Diagnosestellung im Labor war optimiert worden (Lee und Rota 2012).

## SPECIES-TO-SPECIES TRANSMISSION

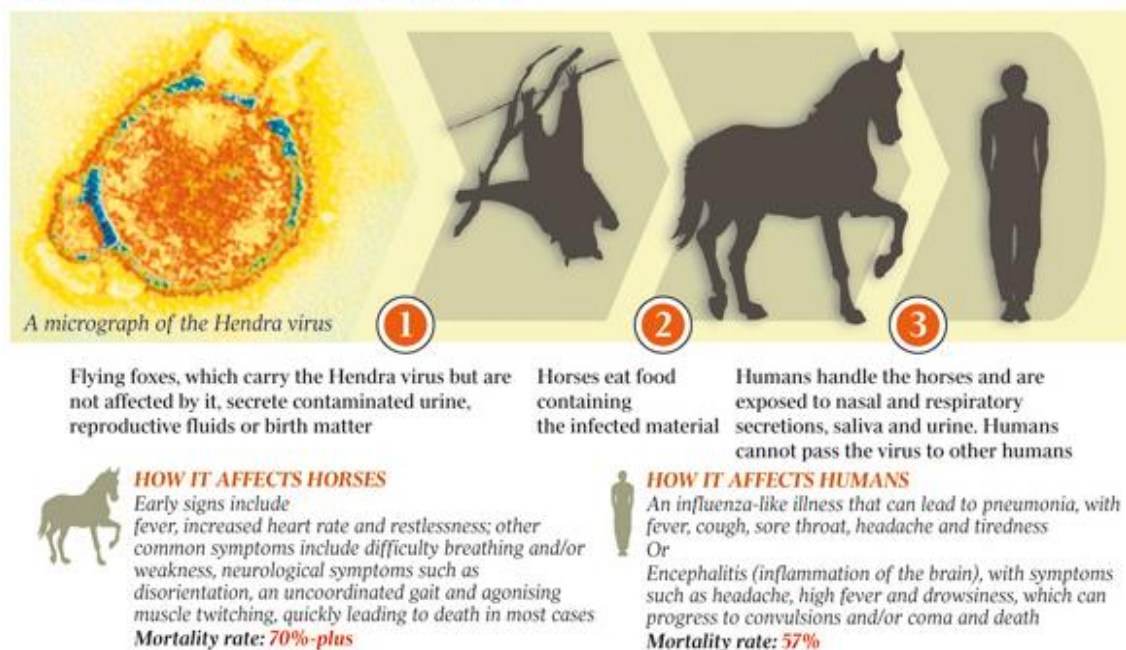


Abbildung 1: Ausschnitt aus The Australian vom 09.07.2011

Zusätzlich zu dieser überraschenden Häufung von Infektionsfällen kam die Entdeckung eines serokonvertierten Hundes in Beaudesert, im Süd-Osten von Queensland. Der zwei Jahre alte Kelpie zeigte zwar keine klinischen Symptome, es wurden aber neutralisierende Antikörper in seinem Blut nachgewiesen. Auf dem Anwesen waren drei infizierte Pferde detektiert worden. Es handelte sich um die erste bekannte Infektion eines anderen Säugetiers, ausgenommen Flughunde und Pferde, auf natürlichem Wege; der Hund wurde euthanasiert. (Internetauftritt Australian Veterinary Association, Hendra Virus).

#### 1.1.4 Hendra von 2011 bis heute

Seit dem Katastrophenjahr 2011 kam es weiterhin jährlich zu Hendra-Episoden. Im Jahre 2012 erlagen zehn Pferde der viralen Infektion. Seit 2013 sinkt die Zahl der Neuinfektionen; in diesem Jahr kamen sechs Rösser zu Tode und ein weiterer Hund wurde positiv auf neutralisierende Antikörper getestet. 2014 gab es zwei gemeldete Episoden und bisher drei im Jahre 2015 (Stand September).

Diese Verringerung der viralen Infektionen ist auf den Einsatz der equinen Vakzine zurückzuführen, die seit November 2012 auf dem Markt ist. Der Großteil der seit Ende 2012 am Hendra-Virus verendeten Tieren war nicht geimpft.

Zu beachten ist, dass auch Virusübertragung in den Monaten Januar und Februar (2012 und 2013) stattfand, was bis dahin nicht beobachtet werden konnte. Das bedeutet, dass die Transmission grundsätzlich immer erfolgen kann, aber in dieser Zeit des Jahres eher unwahrscheinlich ist.

Hendra-Viren sind sehr empfindlich gegenüber Temperaturen von über 37°C, Sonneneinstrahlung und Austrocknung. Die Viren bleiben so außerhalb eines Wirtes schon unter günstigen Bedingungen nur wenige Tage infektiös (im Mittel vier Tage bei 22°C) (Fogarty R et al. 2008).

Dass es dennoch zur Übertragung des Pathogens auf Pferde kommen kann, ist durch viele Faktoren bedingt. Das Risiko einer Ansteckung ist einerseits abhängig von den Flughunden; wieviele Tiere sich an einem Nistplatz aufhalten, ob und wie stark sie infiziert sind und welche Virusmenge sie ausscheiden. Das hängt natürlicherweise mit den Futter- und Nistplätzen der Flughunde zusammen und der Aufenthaltsdauer der Pferde in deren unmittelbarer Nähe.

Weiterhin ist beim Pferd als Fehlwirt die Haltungsart und Fürsorge entscheidend; ist zum Beispiel die Weidequalität gut, sind die Pferde nicht unbedingt auf das Gras unter Bäumen, in denen eventuell Flughundnester sind, angewiesen.

Zudem sind die Empfänglichkeit der Equiden für das Virus, bezüglich angeborener oder erworbener

Immunität, und auch der Infektionsweg (oral, nasal, etc.) entscheidend für das Zustandekommen einer Übertragung mit Krankheitsfolge (Plowright R et al. 2015).

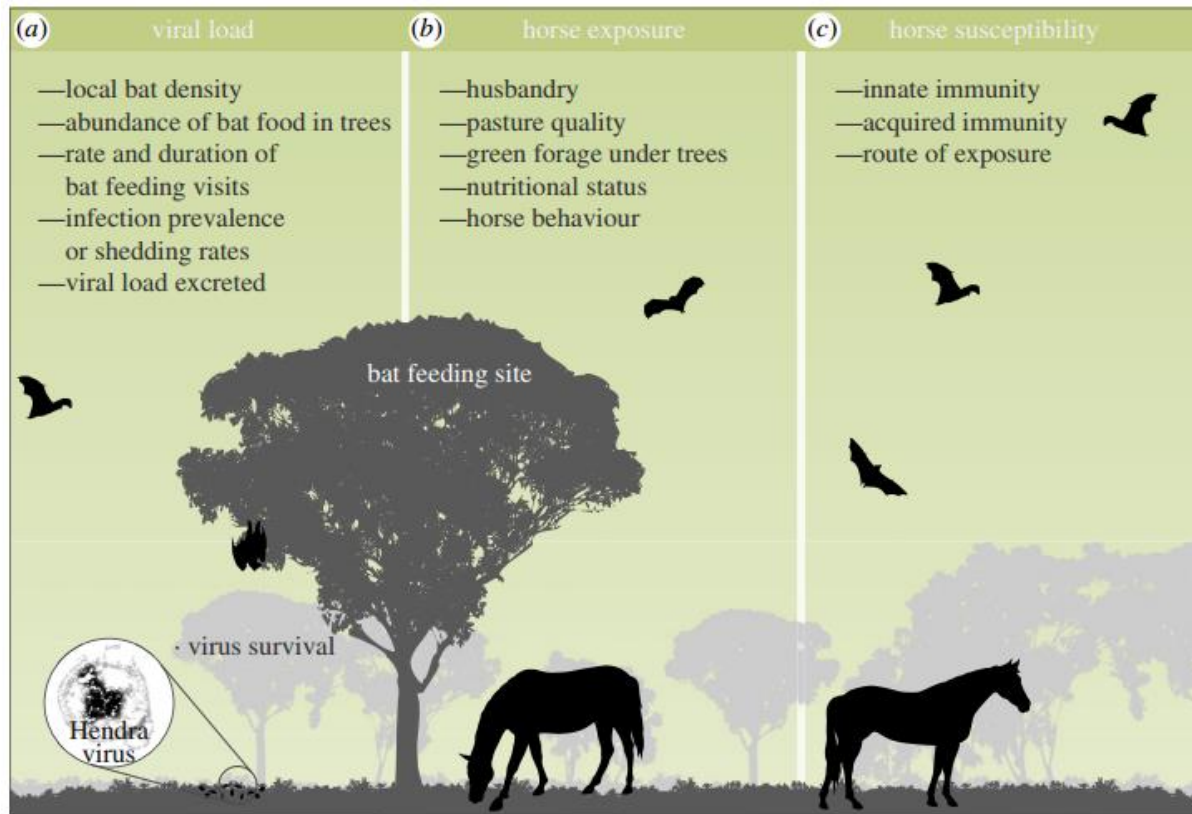


Abbildung 2: Risikofaktoren für die Infektion mit dem Hendra-Virus (aus Plowright R et al. 2015)

Zeitpunkt	Ort	Infizierte Pferde (tödlich)
<b>2011</b>		
Juni	Kerry, QLD	1(1)
	Wollongbar, NSW	2(2)
	Macksville, NSW	1(1)
	Mt Alford, QLD	3(3)
Juli	Park Ridge, QLD	1(1)
	Kuranda, QLD	1(1)
	Hervey Bay, QLD	1(1)
	Boondall, QLD	1(1)
	Lismore, NSW	1(1)
	Logan, QLD	1(1)
	Chinchilla, QLD	1(1)
	Mullumbimby, NSW	1(1)
August	Ballina, NSW	1(1)
	South Ballina, NSW	2(2)
	Mullumbimby, NSW	1(1)
	Currumbin, QLD	1(1)
	North Ballina, NSW	1(1)
September	Beachmere, QLD	2(1)
<b>Insgesamt 18 Episoden</b>		<b>23(22)</b>
<b>2012</b>		
Januar	Townsville, QLD	1(1)
Mai	Rockhampton, QLD	1(1)
	Ingham, QLD	1(1)
Juni	Mackay, QLD	1(1)
Juli	Rockhampton, QLD	3(3)
	Cairns, QLD	1(1)
September	Port Douglas, QLD	1(1)
Oktober	Ingham, QLD	1(1)
<b>Insgesamt 8 Episoden</b>		<b>10(10)</b>
<b>2013</b>		
Januar	Mackay, QLD	1(1)
Februar	Tablelands, QLD	1(1)
Juni	North- west Macksville, NSW	1(1)
	Brisbane- Valley, QLD	1(1)
Juli	Macksville, NSW	1(1)
	Gold Coast, QLD	1(1)
	West Kempsey, NSW	1(1)
	Kempsey, NSW	1(1)
<b>Insgesamt 8 Episoden</b>		<b>8(8)</b>
<b>2014</b>		
März	Bundaberg, QLD	1(1)
Juni	Murwillumbah, NSW	1(1)
<b>Insgesamt 2 Episoden</b>		<b>2(2)</b>
<b>2015</b>		
Juni	Murwillumbah, NSW	1(1)
Juli	Atherton Tablelands, QLD	1(1)
September	Lismore, NSW	1(1)
<b>Bisher 3 Episoden</b> (Stand September 2015)		<b>3(3)</b>



Tabelle 2: Auflistung der bekannten Hendra-Fälle von 2011 bis heute (Stand September 2015)

## 1.2 Taxonomie und Aufbau des Virus

### 1.2.1 Das Genus Henipavirus

Anfang des Jahres 1999 kam es in Malaysia zu einer schweren Enzephalitis-Epidemie beim Menschen. Der ursprüngliche Verdacht, es handle sich um einen Ausbruch Japanischer Enzephalitis (Japanisches Enzephalitis-Virus, Flaviviridae), wurde rasch beigelegt, da die meisten Fälle in Zusammenhang mit Kontakt zu Schweinen gebracht werden konnten. Mensch und Tier litten unter schwerer respiratorischer Symptomatik und fiebrigen Enzephalitiden.

Im Verlaufe dieses Geschehens wurden über eine Million Schweine auf Malaysia gekeult, um die Epidemie in Schach halten zu können. Bis Mai waren 265 Menschen an akuter Enzephalitis erkrankt und 105 Personen verstorben.

Von einem der Patienten wurde aus der zerebrospinalen Flüssigkeit das verantwortliche Virus isoliert und nach dessen Herkunftsdorf Nipah benannt. Genetische, elektronenmikroskopische und vor allem serologische Untersuchungen ließen auf eine nahe Verwandtschaft zum kurz zuvor aufgetretenen Hendra-Virus schließen; es besteht eine hohe Übereinstimmung in Genomorganisation, Proteingröße und Gensequenz. Man erkannte eine starke Kreuzreaktivität von neutralisierenden Hendra-Antikörpern mit den Nipah-Viren (Wang L et al. 2013, Chua K et al. 1999 und 2000).

Konsequenterweise gründete man im Jahr 2002 das neue Genus "Henipavirus", damals mit den Spezies Hendra- und Nipah-Virus (Wang L et al. 2000, Lamb R et al. 2005).

Fast zehn Jahre später entdeckte man im Zuge der Erforschung der Verbreitung und genetischen Diversität des Hendra-Virus in den Flughund-Populationen ein weiteres Virus, das bei experimentellen Infektionen Antikörper hervorrief, die Kreuzreaktivität (aber nicht -neutralität) mit Hendra- und Nipah-Viren aufwiesen (Tierversuche in Frettchen und Meerschweinchen).

Da die Urinproben aus dem Cedar-Wald stammten, wurde der Erreger Cedar-Virus getauft. Marsh G et al. fanden heraus, dass Genomgröße und -organisation von Hendra- und Nipah-Virus nahezu vollständig mit dem des Cedar-Virus übereinstimmen, das neue Mitglied der Henipaviren jedoch keinerlei Klinik in den bisherigen Tierversuchen hervorrufen konnte. Trotz erfolgreicher Replikation

in Säugetierzellen wurde es daher als apathogene Spezies der Henipaviren eingestuft (Marsh G et al. 2012).

### 1.2.2 Klassifikation

Das Hendra-Virus hat ein einzelsträngiges RNA-Genom, das negativ orientiert und nicht segmentiert ist; es gehört damit zur Ordnung der Mononegavirales. Unter den vier Familien der Mononegavirales ist es den Paramyxoviridae zuzuteilen (Unterfamilie Paramyxovirinae). Diese Virusfamilie wird nicht durch Vektoren übertragen, sondern fast ausschließlich via Tröpfcheninfektion (griech. myxa Schleim). Alle dieser Familie zugehörigen Mitglieder sind behüllt und weisen die Besonderheit auf, dass ihre Genomlänge ausnahmslos durch sechs dividiert werden kann. Diese "Rule of six" beruht auf der Tatsache, dass für eine erfolgreiche Replikation des Virusgenoms jedes Nukleoprotein an genau sechs Nukleotide binden muss (Calain P et al. 1993).

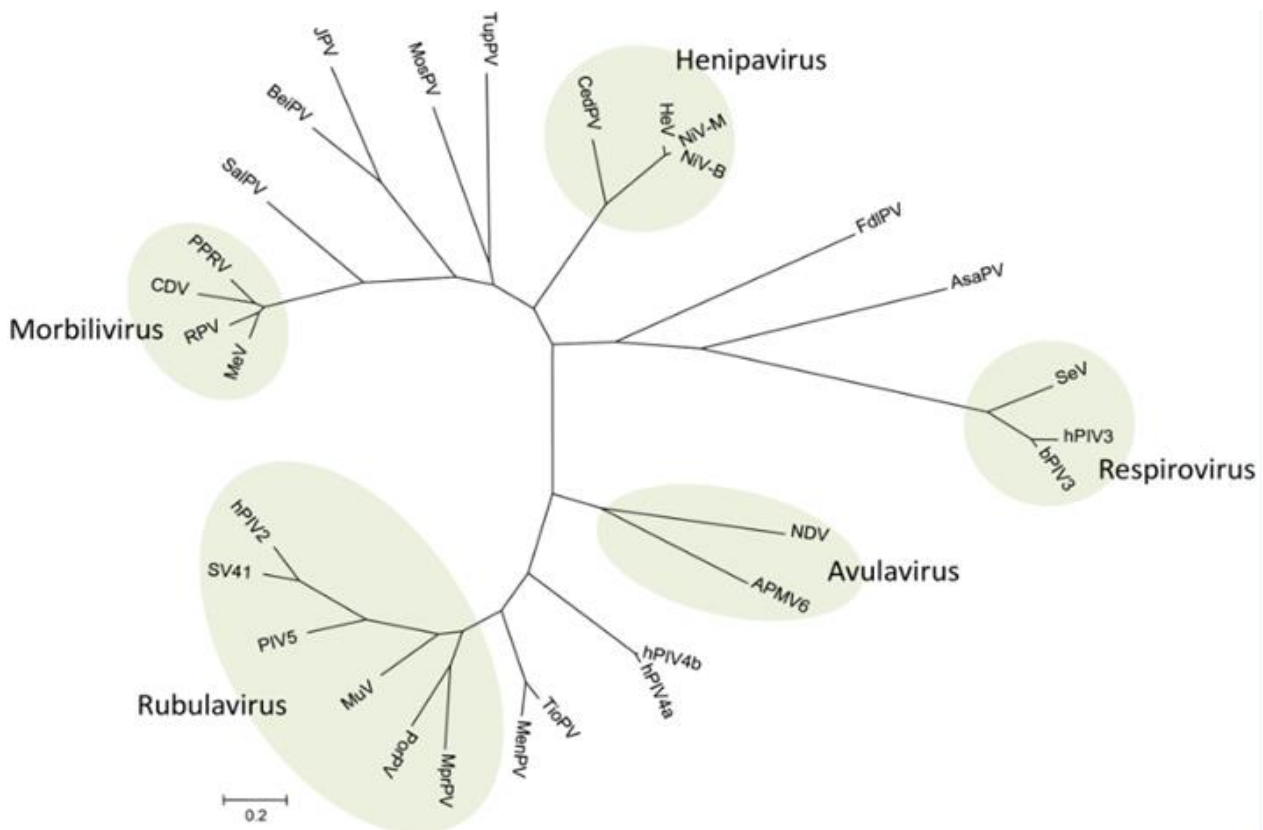


Abbildung 3: Phylogenetischer Baum basierend auf der Sequenz des N-Proteins von ausgewählten Paramyxoviren (aus Marsh G et al. 2012)

### 1.2.3 Morphologie

Hendrapartikel sind pleomorph, erscheinen also in nahezu jeder Form von kugel- bis fadenförmig in einer Größe von 40 bis 1900nm. Das Nukleokapsid hat einen Durchmesser von 18 bis 19nm und erinnert vom Erscheinungsbild an ein Fischgrätenmuster.

Das Hendra-Virus zeigt sich unter dem Elektronenmikroskop mit einer doppelt gesäumten Fassade; eine Erscheinung, die bisher einzigartig bleibt. Verantwortlich hierfür sind Oberflächenprojektionen, die entweder ca. 15nm oder 8nm groß sind (Wang L et al. 2013).

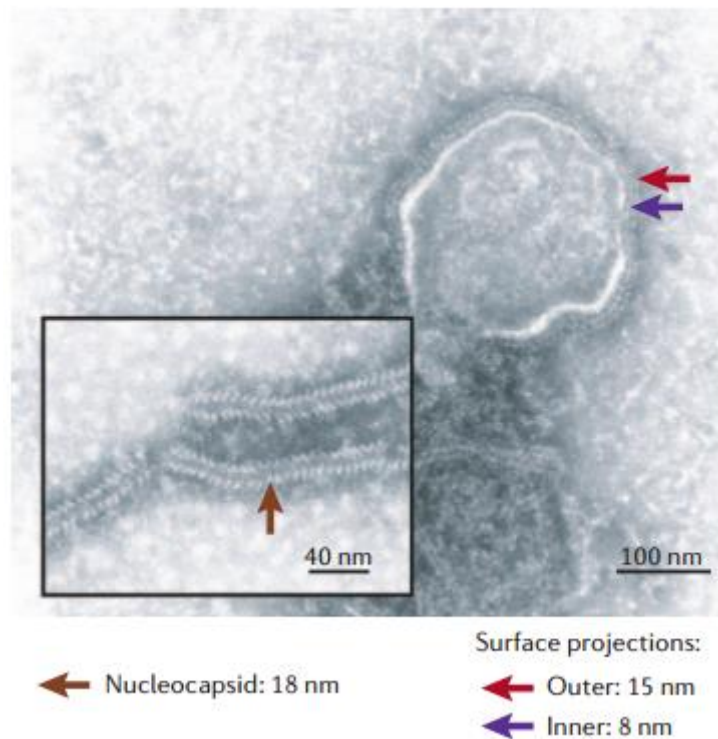


Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Hendra-Virus.  
 Outer: äußerer Saum, Inner: innerer Saum der Fassade (aus Eaton B et al. 2006)

### 1.2.4 Das Genom

Henipaviren besitzen das größte Genom unter den Vertretern der Paramyxoviridae (18234 Nukleotide insgesamt). Die Länge dessen übersteigt die der übrigen Viren um etwa 15% (mehr als 2700 Nukleotide). Das liegt begründet in längeren, nicht-translatierten Regionen am 3'-Ende der mRNA, eine Ausnahme hierzu stellt das L-Gen dar. Die Größe der für die sechs Hauptproteine

codierenden Gene ist nahezu identisch mit denen anderer Genera der Unterfamilie Paramyxovirinae.

Wie bei Respiro- und Morbilliviren auch sind die ersten zwölf Nukleotide des 3'- und 5'-Endes der codierenden Sequenzen hoch konserviert und komplementär; sie enthalten Promotorelemente für Replikation und Transkription.

Bei Henipaviren handelt es sich hierbei um die Sequenz 5'-ACC-3' zu Beginn des offenen Leserahmens; diese ist ausnahmslos in der Subfamilie der Paramyxovirinae vorhanden.

Außerdem besitzen alle Mitglieder der Unterfamilie intergenetische, hochkonservierte Start- und Stoppsignale für die Transkription. Es handelt sich um die Sequenz 5'-CTT-3'; diese ist beim Hendra-Virus vor und nach jedem der sechs Gene vorhanden, wohingegen das bei den anderen Vertretern der Paramyxovirinae nicht bei jedem Gen der Fall ist (Wang L et al. 2000, Wang L et al. 2013).

Außergewöhnlich ist zudem, dass bei den Henipaviren ein streng konserviertes Motiv in der Sequenz des L-Gens modifiziert ist. Bei nahezu allen nicht-segmentierten, negativ orientierten RNA-Viren gibt es die Aminosäuresequenz GDNQ, die für die Polymerase-Aktivität verantwortlich zeichnet. Nur bei Henipaviren, dem Tupaia Paramyxovirus und dem Mossman Virus, welche beide bislang keinem Genus zugeteilt worden sind, ist das Glutamin (Q) durch Glutaminsäure (E) ersetzt (GDNE) (Poch O et al. 1989, Wang L et al. 2000, Miller P et al. 2003, Sasaki M et al. 2012).

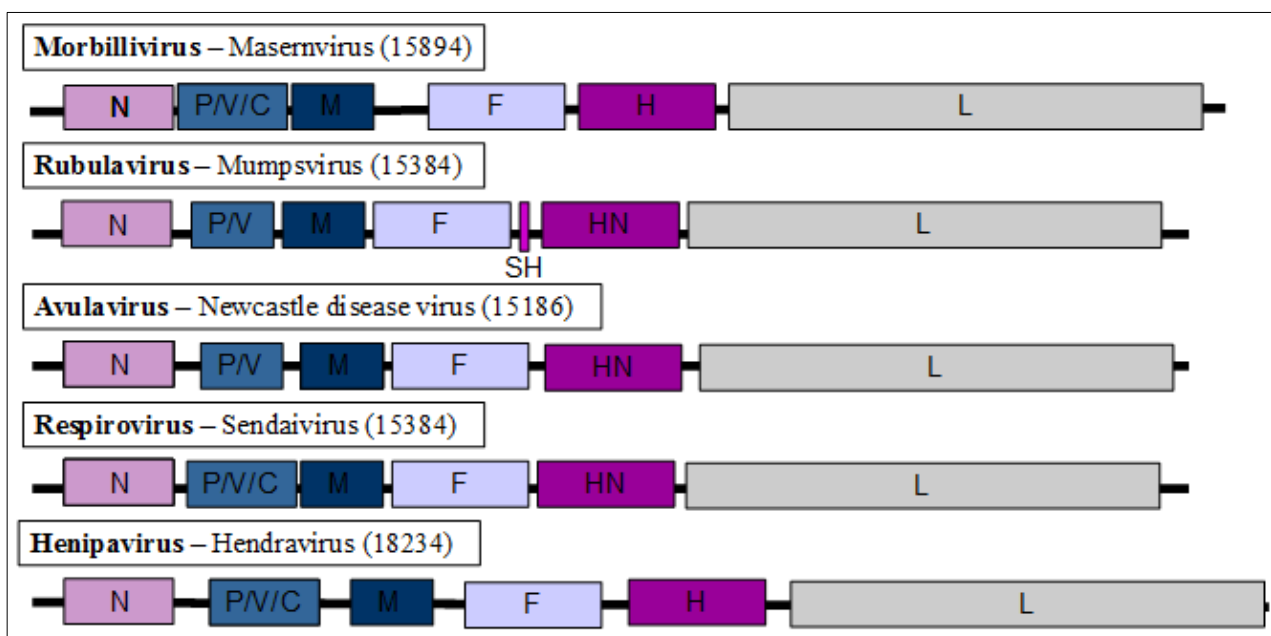


Abbildung 5: Genomgröße und -organisation des Hendra-Virus im Vergleich mit Speziesbeispielen von jedem der anderen vier Genera der Unterfamilie Paramyxovirinae (modifiziert nach Wang L et al., Fields virology, 2013)

### 1.2.5 Erregerdiversität

Grundsätzlich lassen sich verschiedene Hendra-Stämme unterscheiden; diese divergieren aber in so geringem Ausmaße, dass man von einer hohen genetischen Übereinstimmung sprechen kann. Marsh G et al. fanden heraus, dass die Variationen sowohl auf Nukleotid- als auch auf Aminosäurebasis unter 1% liegen (Marsh G et al. 2010).

Diese Erkenntnisse zeigen zum einen, dass die verschiedenen Hendra-Ausbrüche tatsächlich unabhängig voneinander stattfanden (bis auf die Fälle, in denen nachgewiesen werden konnte, dass durch Pferdetransporte dieselbe Episode verschleppt wurde). Zum anderen wird deutlich, wie hoch konserviert das Virus ist. Das lässt darauf schließen, dass kein hoher Anpassungsdruck für den Erreger, sondern eine gute Adaption an den Wirt bestand und besteht (Smith I et al. 2011).

### 1.2.6 Beispiele viraler Proteine

Die sechs Gene kodieren für neun Proteine: das Nukleokapsid- Protein (N), das Large Polymerase-Protein (L) und das Phosphoprotein (P) bilden den Transkriptasekomplex. Das P-Gen codiert für drei weitere Proteine, das V-, W- und C-Protein.

Die drei äußeren Proteine sind das Matrix-Protein (M), das Attachment-Protein (G) und das Fusions-Protein (F).

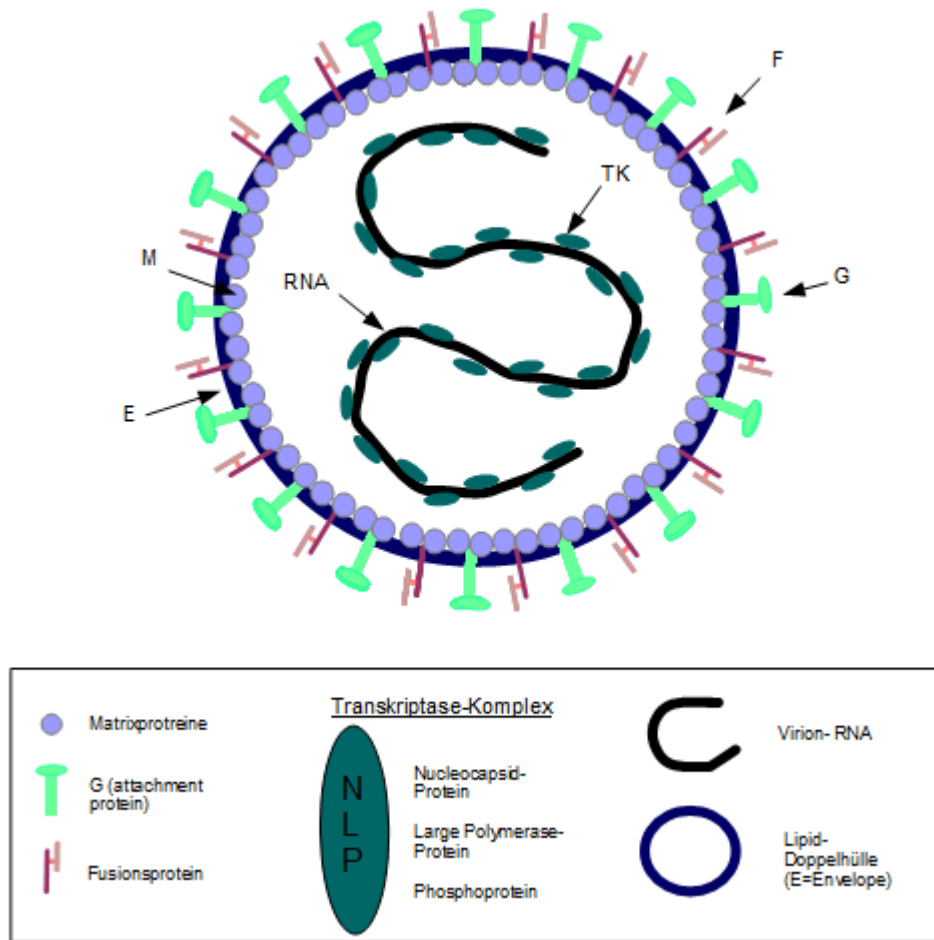


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Hendra-Virus

### 1.2.6.1 Das G- Protein

Das G-Glykoprotein ist ein Typ-II-Membranprotein, das auf der Zelloberfläche zur Oligomerbildung (Dimere und Tetramere) neigt (Bossart K et al. 2005). Das G-Protein des Hendra-Virus ist 604 Aminosäuren lang und zeigt keinerlei Hämagglutinin- oder Neuraminidase-Aktivität, wie es bei den meisten anderen Vertretern der Paramyxovirinae der Fall ist (Yu M et al. 1998, Bossart K et al. 2005). Es weist außerdem eine Aminosäure-Übereinstimmung von 83% mit dem Attachment-Protein des Nipah-Virus auf (Bossart K et al. 2002).

Am N-Terminus befindet sich der zytoplasmatische Anteil des Proteins, gefolgt von einer hydrophoben Transmembrandomäne, einem kurzen, extrazellulären Stil und schließlich dem C-Terminus, einer großen, kugelförmigen, Kopfdomäne (Whitman S et al. 2007). Das Tetramer setzt sich zusammen aus vier sechs-blättrigen  $\beta$ -Propeller-gefalteten Monomeren. Die Arbeitsgruppe um

H. Aguilar fand heraus, dass es im Stilabschnitt des Proteins von Nipah-Viren eine Rezeptorbindungsaktivierungsstelle gibt, die für das Triggering des Fusions-Proteins verantwortlich zeichnet, und es konnte nachgewiesen werden, dass das G-Protein nötig ist, damit eine Fusion der viralen mit der Zellmembran stattfinden kann (Bossart K et al. 2001, Aguilar H et al. 2009).

Hendra- und Nipah-Viren sind sich so ähnlich, dass sie in Experimenten sogar das G-Protein des jeweils anderen für die Fusion nutzen konnten (Smith E et al. 2009).

Das G-Protein des Hendra-Virus bindet in pH-neutraler Umgebung an den Zelloberflächenrezeptor Ephrin- $\beta$ 2 (Bonaparte M et al. 2005, Negrete O et al. 2005). Ephrin- $\beta$ 2 gehört zu den Ephrinrezeptoren, der größten bekannten Unterfamilie der Rezeptortyrosinkinasen. Es wird an Neuronen, glatter Muskulatur und arteriellen Endothelzellen exprimiert; die Rezeptoren sind entscheidend bei der embryonalen Entwicklung, der Angiogenese und Neurogenese (auch im adulten Organismus). Weiterhin spielen sie eine Rolle in der Aktivierung von Teilen des Immunsystems, bei verschiedenen Tumorerkrankungen und tragen zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Osteoblasten und Osteoklasten beim ständigen Knochenumbau bei (Edwards C et al. 2008).

Aufgrund dessen, dass diese Rezeptoren bei allen warmblütigen Wirbeltieren, also Säugetieren und Vögeln, zu finden sind, und in sehr ähnlicher Form bei poikilothermen Wirbeltieren und auch Wirbellosen, lässt sich das erstaunlich große Wirtsspektrum der Henipaviren erklären (<https://ephenomenclature.med.harvard.edu/>). Dieses umfasst sechs Säugetierordnungen zum derzeitigen Wissensstand: Fledertiere, Primaten, Nagetiere, Un- und Paarhufer sowie Carnivora (Drexler J et al. 2012, Mire C et al. 2014).

Außerdem nutzen Hendra- wie Nipah-Viren nicht-permissive, zirkulierende Leukozyten zur Dissemination im Körper; hierfür binden sie an Heparan-Sulfat auf der Oberfläche der weißen Blutkörperchen (Mathieu C et al. 2015).

#### 1.2.6.2 Das F-Protein

Nach erfolgter Bindung des Virus an den Zellrezeptor, muss die Fusion der viralen mit der zellulären Membran erfolgen, damit das virale Nukleokapsid in die Zelle eingeschleust werden kann. Hierfür zeichnet das Fusionsprotein verantwortlich, ein 546 Aminosäuren-langes Typ I-Transmembranprotein, das sich als Homotrimer darstellt. Die Synthese dessen erfolgt im endoplasmatischen Retikulum; das hierfür verantwortliche Signalpeptid wird dann im trans-Golgi-Netzwerk an seiner cleavage site entfernt und das F-Protein liegt anschließend in seiner inaktiven Form als  $F_0$  vor.

$F_0$  wird von der zellulären endosomalen Protease Cathepsin L nach erfolgter Endozytose im trans-Golgi-Netzwerk an einer einzelnen Base (Lysin) in seine zwei aktiven, Disulfid-verbundenen (S-S) Untereinheiten  $F_1$  und  $F_2$  gespalten und hierauf wieder an die Zelloberfläche verbracht; es liegen also im fertigen Virion  $F_1$  und  $F_2$  in einem metastabilen Zustand vor. Bei den meisten anderen Paramyxoviren geschieht diese Spaltung durch die zelluläre Protease Furin. Da das Attachment-Protein für die Fusion nötig ist, das G-Protein jedoch einem anderen intrazellulären Weg folgt, muss das Zusammenspiel der beiden Proteine zu einem späteren Zeitpunkt stattfinden (Garten W et al. 1994, Pager C et al. 2005, Eaton B et al. 2006).

Das Protein besteht aus einem hydrophoben Fusionspeptid (FP), zwei Heptad-repeat Regionen (HRA und HRB), einer Transmembrandomäne (TM) und einem C-terminalen zytoplasmatischen Anteil (C-Tail) (Lamb R et al. 2007).

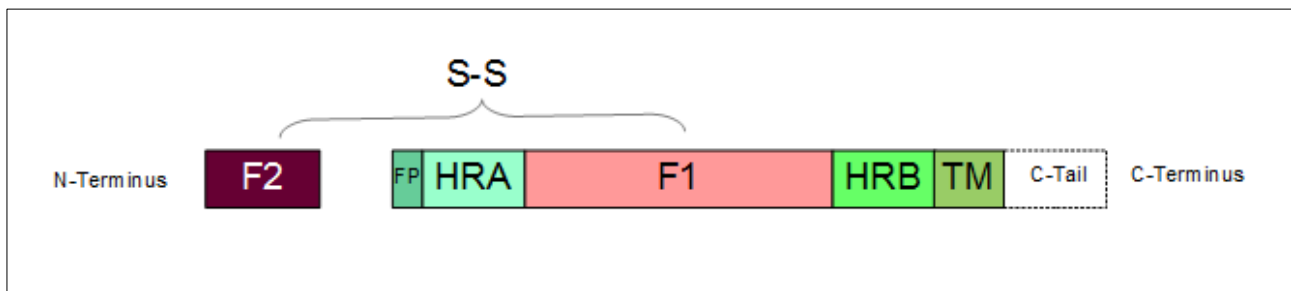


Abbildung 7: Darstellung des Fusions-Proteins der Paramyxoviridae (modifiziert nach Smith E et al. 2009)

In diesem metastabilen Zustand, der sogenannten Präfusionsform (siehe Abbildung 8a), befindet sich HRB als Anker in der viralen Membran; das Fusionspeptid und HRA formen eine Kopfdomäne. Nach erfolgtem Triggering durch das G-Protein, schmelzen die drei HRB-Anteile auseinander in die "open stalk"-Form und separieren sich vom Kopfteil(b). Das Fusionspeptid wird in die zelluläre Membran harpuniert und mit ihm HRA von HRB entfernt(c). Diese "lipid stalk"-Form wird durch mehrere F-Proteine herbeigeführt und übergangsweise gehalten(d). Da dieser Zustand jedoch energetisch ungünstig ist, strebt HRA danach, sich zurück in räumliche Nähe zu HRB zu bewegen. Dadurch entsteht die stabile Sechs-Helices-Formation, in der HRA und HRB parallel nebeneinander zu liegen kommen. Durch diesen Prozess erfolgt erst die Annäherung der viralen an die zelluläre Membran und schließlich die Verschmelzung(e); die Fusionspore entsteht (Yin H et al. 2006, Aguilar H et al. 2009, Lee und Rota 2012).



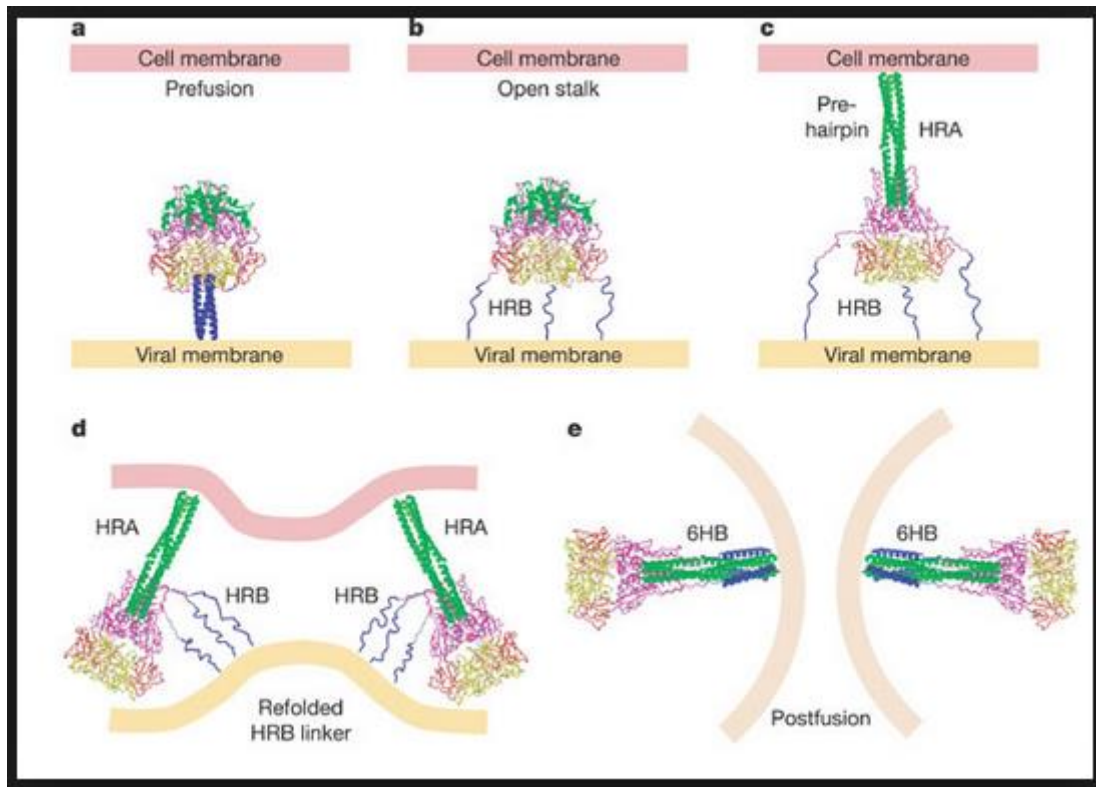


Abbildung 8: Darstellung des Fusionsvorgangs der viralen mit der zellulären Membran durch das F-Protein der Paramyxoviren (aus Yin H et al. 2006)  
(HRA: grün, HRB: blau)

### 1.2.6.3 Die P-Gen-Produkte

Das Hendra-Virus-P-Gen ist länger als das anderer Paramyxovirinae; es codiert nicht nur für das Phosphoprotein (P), das gemeinsam mit den Proteinen N und L essentiell für die Genomreplikation ist, sondern auch für drei weitere Nicht-Struktur-Proteine.

Durch Hinzufügen von einem bzw. zweier Guanin- Reste an die mRNA (sogenanntes RNA editing) werden das V- bzw. W-Protein translatiert. P-, V- und W-Protein sind also identisch in ihren ersten 405 Aminosäuren.

Ein C-Protein entsteht durch einen zweiten Open-reading-frame (ORF), der etwas strangabwärts des Leserahmens für das P-Protein beginnt und damit überlappt (Wang L et al. 2013).

Die P-Gen-Produkte bestimmen zu einem nicht geringen Anteil über die Virulenz, da sie wichtige Mechanismen der angeborenen Immunabwehr des Wirtsorganismus, das Interferon- $\alpha/\beta$ -System, blockieren.

V- und W-Protein verhindern den dsRNA-Signalweg, der von der Immunabwehr bei der

Anwesenheit von doppelsträngiger RNA in der Zelle aktiviert wird, da diese ein Hinweis auf virales oder bakterielles Eindringen ist. Beide blockieren Interferon-Regulatorfaktor 3-responsive Promotoren; V bindet und inaktiviert den MDA5-Rezeptor, W behindert zusätzlich noch den Signalweg über den Toll-like-Rezeptor 3. Auch die STAT-Proteine werden von der Translokation in den Nukleus abgehalten; im Zytoplasma durch V- und P-Proteine, im Kern vom W-Protein. Diese nukleäre Komponente des Unterbindens der Abwehrmechanismen der Zelle ist neu unter Paramyxoviren (Shaw M et al. 2004 und 2005, Eaton B et al. 2005).

### 1.2.7 Replikationszyklus

Wie beschrieben binden die viralen Glykoproteine an die Ephrin- $\beta$ 2-Rezeptoren des Wirts. Im weiteren Verlauf kommt es zur Verschmelzung der Virus- mit der Zellmembran durch das Fusionsprotein. Das virale Nukleokapsid wird ins Zytoplasma befördert und der Polymerasekomplex (P- und L-Protein) veranlasst die Transkription viraler mRNA. Hierfür beginnt die Polymerase an der Promotorregion am 3'-Ende des viralen Genoms und arbeitet sich bis zum Stoppsignal des jeweiligen Gens vor; hier gerät sie ins Stottern und verschafft so der mRNA einen Poly-A-Schwanz. Während der intergenetischen Regionen pausiert das Enzym, um dann beim nächsten Transkriptionsstartsignal erneut anzusetzen. Wie bei Paramyxoviren üblich, fällt die Polymerase bei den Stoppsignalen regelmäßig vom Genom ab; da es nur einen Promotor für den Polymerasekomplex gibt, muss das Enzym immer wieder am 3'-Anfang der genomischen RNA beginnen. So entsteht ein Transkriptionsgradient; das bedeutet, dass Proteine, deren Gene sich näher am 3'-Ende der RNA befinden, in größerer Menge translatiert werden.

Nach einer Weile akkumulieren die viralen Proteine in der Wirtszelle und durch einen unbekanntem Mechanismus initiiert die Polymerase die Replikation des Genoms. Ein weiteres Mal liest sie das Genom vom 3'-Promotor beginnend ab, ohne diesmal jedoch zu pausieren; so entsteht ein vollständiges, positiv-orientiertes Antigenom, von dem wiederum die neue negativ-orientierte RNA synthetisiert wird.

Die viralen Glykoproteine werden im endoplasmatischen Retikulum gebildet und reifen während ihres Weges durch das Golgi-Netzwerk zur Zellmembran. Das Fusionsprotein wird in Endosomen prozessiert.

Das neue Genom wird in den Polymerasekomplex eingebettet. Dann erfolgt das Viruspartikel-Assembly und das Budding, wofür das Matrixprotein hauptverantwortlich ist. Es interagiert mit dem zytoplasmatischen Anteil des Fusionsproteins und der viralen Hülle (Patch J et al. 2007, Lamb R et al. 2007, Lee und Rota 2012, Monaghan P et al. 2014).

### 1.3 Pathogenese

Der vollständige Ablauf der Pathogenese ist nicht geklärt. Nach Ansteckung über den oronasalen/oropharyngealen Weg und einer Inkubationszeit von wenigen Tagen bis zu zwei Wochen erfolgt eine erste Replikation. Hierauf ist von einer hämatogenen Verteilung des Virus im Wirtskörper auszugehen und einer nachfolgenden zweiten Replikation im vaskulären Endothel in nahezu allen Organen, besonders in Gehirn, Lunge, Niere, Lymphknoten und Herz (Wong K et al. 2002, Playford E et al. 2010, Wong K et al. 2011, Marsh G et al. 2011).

Bedingt durch den Rezeptor Ephrin- $\beta$ 2, an den das virale Glykoprotein bindet, erklärt sich das Verteilungsmuster der Schäden, die das Virus im Körper anrichtet. Vordergründig stellt sich die Vaskulopathie der kleineren arteriellen Gefäße dar, bestehend aus Vaskulitis, endothelialen Ulzerationen und Synzytien, sowie intramuralen Nekrosen; hieraus resultieren Ischämie, Mikroinfarkte und Thrombosen und, nach erfolgter Zerstörung der Gefäßwände, der Übertritt der Antigene und Entzündungsstoffe durch perivaskuläre Hämorrhagie ins Parenchym.

Im Zentralen Nervensystem (ZNS) treten mehrkernige Riesenzellen und Synzytien auf; Plaque-ähnliche Läsionen sind sowohl in grauer als auch in weißer Substanz zu beobachten, die sich nekrotisch, ödematös und entzündlich darstellen (Wong K et al. 2009).

In der Lunge entwickeln sich mitunter interstitielle Pneumonie und schwere nekrotisierende Alveolitis; die Alveolen sind häufig gefüllt mit fibrinösem Exsudat (Hooper P et al. 1997).

Bei moribunden Tieren findet die Replikation verstärkt in respiratorischen und urinalem Gewebe statt. Das geht konform mit der Vermutung, dass das Virus via oronasale Sekrete und Urin ausgeschieden wird (Yun T et al. 2015).

Im Gegensatz zur akuten Hendra-Virusinfektion, bei der der gesamte Organismus den Symptomen unterliegt, ist bei der rezidivierenden Enzephalitis die Pathologie ausschließlich auf das ZNS beschränkt. Diese Spätfolge, die bisher bei einem einzigen der sieben bekannten humanen Fälle aufgetreten ist, kann Jahre später noch erfolgen. Man vermutet, dass Henipaviren in der Lage sind, sich nach akuter Infektion in nervales Gewebe zurückzuziehen und zu persistieren. Bei rezidivierender Enzephalitis verursacht durch Nipah-Viren zeigen sich konfluente, geographische Läsionen im Gehirn, wohingegen bei akuter Gehirnentzündung diskretere Veränderungen im MRT zu sehen sind (Tan C et al. 2002, Wong K et al. 2009, Lee und Rota 2012). In einem Fall trat eine durch Nipahinfektion hervorgerufene Enzephalitis erst elf Jahre später auf (Abdullah S et al. 2012).

## 1.4 Flughunde als Wirt



Abbildung 9: *Pteropus conspicillatus*/Brillenflughund (Foto: Markus Nolf)

Über 40 Prozent der vier australischen Pteropid-Flughundarten haben Antikörper gegen das Hendra-Virus (Young P et al. 1996). Bei experimentellen Infektionen der Tiere waren keinerlei klinische Krankheitssymptome provozierbar; jedoch konnte sporadisch Vaskulitis attestiert werden, bei der nur in der Tunica media der Gefäße virales Antigen nachweisbar war, das Endothel blieb unbeansprucht. Diese Auffälligkeit und die Tatsache, dass die Antigenlast deutlich geringer ist als bei anderen Wirten, könnten die Asymptomatik der infizierten Flughunde erklären (Halpin K et al. 2011).

Neuesten Erkenntnissen zufolge sind als Über-/Träger der Viren *Pteropus alecto* und *Pteropus conspicillatus* (Schwarzer und Brillenflughund) identifiziert worden. Auch die anderen beiden *Pteropus*-Spezies (*Pt. poliocephalus* und *Pt. scapulatus*) weisen häufig Serokonversion auf, in den allermeisten Fällen konnte aber kein Virus isoliert werden.

Die Untersuchung des räumlichen Verteilungsmusters der Hendrafälle übergab eine Übereinstimmung mit den Nistplätzen und Einzugsgebieten von *Pt. alecto* und *Pt. conspicillatus*; daher wird inzwischen davon ausgegangen, dass diese beiden Flughundarten hauptverantwortlich für die Übertragung des Virus auf Pferde sind (Field H et al. 2011, Smith C et al. 2014).

Die Gruppe um Lauren Goldspink eruierte, dass besonders in der Milz der Tiere Virus isoliert werden konnte, dafür aber kaum in fetalen Geweben. Der Theorie, dass Hendra-Viren mit Sekreten während des Geburtsvorgangs ausgeschieden werden, widerspricht auch die Tatsache, dass die "Hendrasaison" von Juni bis August stattfindet, die Hauptgeburtsperiode der Flughunde jedoch von September bis November andauert und die Flughundweibchen die Plazenta post partum verspeisen (Goldspink L et al. 2015).

Hendra-Viren wurden im Urin der Tiere nachgewiesen (Field H et al. 2011).

Die Gründe dafür, dass Flughunde derart hochpathogene Viren völlig asymptomatisch in sich tragen können, sind bislang ungeklärt; O'Shea et al. weisen auf den bis zu 16-fach erhöhten Stoffwechsel und die deutlich steigende Körpertemperatur der Tiere während des Fluges hin. Dies könne zum einen bedeuten, dass es für die Flughunde ein Leichtes sei, den Metabolismus für eine Immunantwort zu steigern. Zum anderen konnte nachgewiesen werden, dass der Flug der Pteropodidae einhergeht mit ständiger Reparatur der DNA; dies ist nötig, da durch den sehr hohen Stoffwechsel die DNA regelmäßigen Beschädigungen unterliegt. Eventuell seien die Tiere daher in der Lage, die virale Replikation zu kontrollieren (Baker M et al. 2013, O'Shea T et al. 2014).

Neben Südostasien, wo die Flughunde als Reservoir für Nipah-Viren fungieren, wurden Flughunde der Gattung Eidolon als Träger von Henipa-like-viruses in Ghana und Zentralafrika mit einer Seroprävalenz von 40% identifiziert (Hayman D et al. 2008, Drexler F et al. 2009).

Auch auf Madagaskar und kleineren Inseln im Golf von Guinea wurden serokonvertierte Flughunde entdeckt (Iehlé C et al. 2007, Peel A et al. 2012).

## 1.5 Prävention

Verschiedene Immunisierungsmodelle wurden in den vergangenen zehn Jahren eruiert.

Zum einen wurde von Christopher Broder und seiner Arbeitsgruppe ein monoklonaler humaner Antikörper (m102.4) generiert, der an ein einzelnes Epitop der Rezeptorbindungsdomäne des G-Proteins von Hendra- und Nipah-Viren bindet und so den initialen Kontakt der Viren mit dem Wirtsorganismus unterbindet. Der Antikörper kann bis zu drei Tage nach vermuteter Exposition erfolgreich verabreicht werden und verhindert sowohl Hendra- als auch Nipahinfektion. Dies wurde im Tierversuch sowohl bei Frettchen als auch bei der Äthiopischen Grünen Meerkatze getestet und auch bereits in elf Fällen bei Menschen angewandt, wovon zehn die Infektion überlebten. Seit Anfang des Jahres 2015 läuft in Australien die erste klinische Studie mit freiwilligen Personen, die Ergebnisse werden Anfang 2016 erwartet (Zhu Z et al. 2006 und 2008, Bossart K et al. 2009, Geisbert T et al. 2010, Internetauftritt ABC News und Uniformed Services University 2015).

Es existieren verschiedene Subunit-Vakzinen, die auf löslichen, sezernierten Glykoprotein-Versionen (soluble glycoprotein/sG) von HeV und NiV basieren. Diese löslichen Glykoproteine werden durch rekombinante Vaccinia-Viren produziert und rufen eine starke neutralisierende, kreuzreaktive Antikörper-Immunantwort bei Kaninchen, Katzen, Frettchen und Grünen Meerkatzen hervor (Bossart K et al. 2005, Mungall B et al. 2006, McEachern J et al. 2008, Pallister J et al. 2011, Bossart K et al. 2012, Mire C et al. 2014).

Seit November 2012 ist eine HeV-sG-Subunit-Pferdevakzine von Zoetis auf dem Markt, Equivac HeV. Der Impfstoff wird ausschließlich von Tierärzten an Fohlen ab vier Monaten zweimalig im Abstand von drei Wochen verabreicht und erfordert dann eine halbjährliche Auffrischung (Middleton D et al. 2014, Internetauftritt Australian Veterinary Association).

Weiterhin sind rekombinante Lebenvakzinen basierend auf Vaccinia-Viren und Kanarienvakzinen entwickelt worden, die Nipah-F- und G-Proteine exprimieren. Diese haben sich im Hamster- und Schweinmodell als protektiv erwiesen, wobei die Antikörperantwort gegen das G-Protein deutlich stärker ausfiel (Guillaume V et al. 2004, Weingartl H et al. 2006). Kurup D et al. synthetisierten eine Kombinationsvakzine, bestehend aus rekombinantem Rabiesvirus, das HeV-G exprimiert; in Mäusen stellte sich diese Vakzine hoffnungsvoll dar (Kurup D et al. 2015).

## **2. Das Modifizierte Vacciniavirus Ankara (MVA)**

Generell ist viralen Infektionen nur mit symptomatischer Therapie beizukommen und das häufig unzureichend. Daher empfiehlt sich ein präventives Vorgehen, die Impfung, um den Körper schonend auf den eventuellen Fall einer Viruserkrankung vorzubereiten und das Immunsystem für das Erkennen des Pathogens und das Einleiten von Abwehrmaßnahmen auszubilden.

Die Geschichte der Impfung beginnt mit Edward Jenner im Jahre 1796; er infizierte einen achtjährigen Jungen mit Kuhpocken und sechs Wochen später mit humanen Variolapocken, um festzustellen, dass das Kind Immunität erlangt hatte. Obwohl er nicht der Erste mit dieser Beobachtung und Methode war, so wurde sie doch durch ihn berühmt und erhielt von ihm den Namen Vakzination von lateinisch "vacca" (Kuh) (Riedel S. 2005).

Die Bekämpfung der Pocken, die mehrere Millionen Todesopfer gefordert hatten, verlief schließlich so erfolgreich, sodass die WHO im Jahre 1980 die Krankheit für ausgerottet erklärte. Bis dahin und auch darüber hinaus hatte man sich aber intensiv mit der Viruserkrankung beschäftigt; die Pockenviren können also mit Fug und Recht mit zu den am besten erforschten Krankheitserregern gezählt werden.

Die Familie Poxviridae gehört zu den doppelsträngigen DNA-Viren und unterteilt sich in zwei

Subfamilien, Chordopoxvirinae und Entomopoxvirinae; letztere infizieren Insekten. Die Chordopoxvirinae sehen sich in acht Genera untergliedert, u.a. in das Genus Orthopoxvirus, wozu die Spezies Vaccinia-, Variola-, Cowpox-, Camelpox-, Ectromelia-, Monkeypox-, Raccoonpox-, Skunkpox-, Volepox-, Taterapoxvirus und einige bisher nicht klassifizierte Pockenviren gezählt werden.

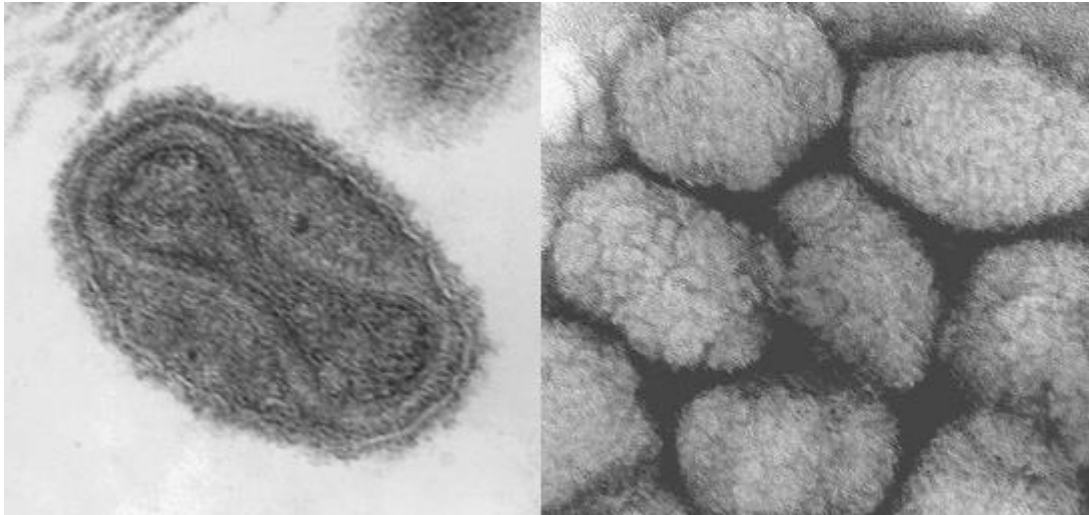


Abbildung 10: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Smallpox-Virionen (CDC/ Dr. Fred Murphy, Sylvia Whitfield; Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (PHIL))

Die Orthopockenvirionen gehören mit zu den größten Viruspartikeln überhaupt; bei einer durchschnittlichen Größe von etwa 250 nm können sie schon im Lichtmikroskop erkannt werden. Ihre Kontur ist fass- oder backsteinförmig; je nach Reifezustand werden sie von einer (IMV, intracellular mature virion) oder zwei Membranen (EEV, extracellular enveloped virion) umgeben; beide Formen sind infektiös. Sie besitzen ein hantelförmiges Core mit zwei Lateralkörpern. Die genetische Information der linearen doppelsträngigen DNA rangiert von 170 bis 240 kbp. Pockenviren replizieren vollständig im Zytoplasma der Wirtszelle und produzieren hierfür ihre eigene DNA-abhängige RNA-Polymerase (Smith G et al. 2002, Moss B. 2007, Internetauftritt NCBI Taxonomy, 2015).

Die Gefahr der Pockenerkrankung ist aber nicht gebannt durch die Tatsache, dass das natürlich vorkommende Variolavirus (smallpox), dessen ausschließlicher Wirt der Mensch ist, als ausgerottet gilt. Zum einen existieren nach wie vor Restbestände des Variolavirus in US-amerikanischen und russischen Laboren und zum anderen besteht die reelle Gefahr von Zoonosen durch Infektionen mit anderen noch weit verbreiteten Orthopockenviren, wie Affenpockenviren (monkeypox) u.a. (Behbehani A. 1983, McCollum A et al. 2015, Medcalf A et al. 2015).

Mit der Fortentwicklung der Pockenschutzimpfung versuchte man das ursprüngliche Vacciniavirus,

dessen Inokulation relativ seltene, aber zum Teil erhebliche Impfkomplicationen (u.a. tödliche Enzephalitiden) hervorrief, als Impfvirus zu optimieren (McCurdy L et al. 2004).

Das Modifizierte Vacciniavirus Ankara (MVA) entstand durch über 570 Passagierungen des Chorioallantois Vacciniavirus Ankara auf Hühnerembryofibroblasten (Cef-Zellen). Durch die vielen hundert Passagen in der aviären Zellkultur entledigte sich das Virus gut 15 Prozent seines ursprünglichen Genoms und verlor sein ehemals breites Wirtsspektrum mit der Fähigkeit zur Replikation in menschlichen bzw von Säugetieren stammenden Zellen (Mayr A et al. 1964, Sutter G et al. 1995, Carroll M et al. 1997, Drexler I et al. 1998, McCurdy L et al. 2004).

Es entstanden sechs große Deletionen im Genom, die sich an beiden terminalen Regionen der viralen DNA befinden, und einige kleinere Nukleotiddeletionen (Meyer H, et al. 1991, Antoine G et al. 1998, Meisinger- Henschel C et al. 2007). Durch diesen 24,7kbp umfassenden Verlust an genomischer DNA gingen dem Virus host range-Gene und Virulenzfaktoren abhanden; es ist beispielweise nicht mehr in der Lage lösliche Rezeptoren für Interferon- $\gamma$ , Interferon- $\alpha/\beta$ , Tumornekrosefaktor  $\alpha$  und CC-Chemokine zu produzieren, welche andere Vacciniaviren nutzen, um die Immunantwort des Wirtsorganismus zu schwächen. Das MVA stimuliert daher eine starke Erstreaktion des Immunsystems (Blanchard T et al. 1998, McCurdy L et al. 2004; Waibler Z JVI 2007, Lehmann JVI 2009).

Die gute Immunogenität, die Unfähigkeit, reife Virionen sogar in immunsupprimierten Patienten zu produzieren, und die Möglichkeit, Fremdsequenzen zu inserieren und deren Proteine zu exprimieren, verlieh MVA den Status eines vielversprechenden Vektorvirus. Dies eröffnete Perspektiven für neue Anwendungen, die weit über das ursprüngliche Vorhaben, eine neue, komplikationslose Pockenimpfung zu generieren, hinausgehen (Stickl H et al. 1974, Sutter G et al. 1992 und 1994, Drexler I et al. 1998, Stittelaar K et al. 2001, Drexler 2003 PNAS, Sutter & Staib 2003 CTD, Drexler I et al. 2004).

Rekombinante MVA-Viren sind auch in nicht-permissiven Säugerzellen in der Lage, frühe, intermediäre und späte Genexpression durchzuführen, sodass die von der inserierten Fremd-DNA transkribierte RNA effizient in das Zielprotein übersetzt werden kann. Das Fremdprotein wird für gewöhnlich in großer Menge exprimiert, unter Erhalt seiner Eigenschaften korrekt gefaltet und dient so zur Anregung sowohl humoraler als auch zellulärer Immunantworten (Sutter G et al. 1992 und 1994, Hebben M et al. 2007, Brewoo J et al. 2010, Chandran D et al. 2010, Song F et al. 2013, Draper S et al. 2013, Green C et al. 2015).

MVA ist grundsätzlich in der Lage bis zu 25kbp an Fremd-DNA aufzunehmen und entsprechend



kodierte Fremdproteine zu produzieren. Das Immunsystem reagiert herausragend auf den viralen Impuls und auch auf das inserierte Fremdprotein, es werden Antikörper gebildet und T- und B-Zellen aktiviert. Daher sind auch Adjuvantien überflüssig (Kreijtz J et al. 2009 a und b, 2014). Aufgrund dieser Eigenschaften scheint das Modified Vacciniavirus Ankara auch anderen Vektorviren überlegen; ein Beispiel hierfür ist, dass durch Kanarienvakzinen hervorgerufene Antikörpertiter nicht lange nachgewiesen werden können (Smith G et al. 1983, Draper S et al. 2013). MVA-Vektorvakzinen werden daher als mögliche, neuartige Impfstoffe gegen unterschiedliche Krankheiten untersucht, so auch gegen Krebs- und Immundefizienzkrankungen (Pillai V et al. 2011, Amato R et al. 2012, Said R et al. 2013, Rosales R et al. 2014, Nilsson C et al. 2015).

### **3. Zielsetzung der Arbeit**

Das Ausmaß der Bedrohung durch das Hendra-Virus und seinen nächsten Verwandten, das Nipah-Virus, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht abzuschätzen. Die Neuentdeckung von Henipa-ähnlichen Viren auf dem afrikanischen Kontinent vermittelt eine neue Brisanz für eine Viruserkrankung, die man ausschließlich auf dem australischen Kontinent und in Südostasien wähte. Bisher hat man keinerlei Kenntnis davon, ob und wie virulent diese afrikanischen Viren sind, geht aber davon aus, dass es bereits Spillover events auf Menschen gegeben haben muss (Pernet O et al. 2014). Auch südamerikanische Fledermäuse wurden positiv auf Antikörper getestet, sodass sich die potentielle Gefahr inzwischen auf vier Kontinente ausweitet (Drexler J et al. 2012).

Um einen Beitrag zur Vorbeugung gegen diese Pathogene und die von ihnen hervorgerufenen Erkrankungen zu leisten, wurden in dieser Arbeit drei unterschiedliche rekombinante MVA-Viren getestet. Diese drei Vektorviren enthalten Gensequenzen der Oberflächenproteine F und G (Fusions- und Glykoprotein) des Hendra-Virus Stammes Brisbane.

## III Material und Methoden

### 1. Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
Aceton	Carl Roth (Karlsruhe)
Acrylamid	Carl Roth (Karlsruhe)
LE Agarose	BMA (Rockland, US)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Gel Red	Biotium (Hayward)
Glycin	AppliChem (Darmstadt)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Magermilchpulver	AppliChem (Barcelona)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumacetat	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Prestained protein ladder, broad range	New England Biolabs (Schwalbach)
Proteaseinhibitor	Roche Diagnostics (Penzberg)
Proteinase K	Merck (Darmstadt)
Roti Free Stripping Buffer 2.0	Carl Roth (Karlsruhe)
Roti-Load 1x Protein-Ladepuffer	Carl Roth (Karlsruhe)
Temed	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tris Ultrapure	AppliChem (Darmstadt)
TrueBlue Peroxidase Reagent	KPL (Gaithersburg, USA)
10% Tween 20 Solution	BioRad (Hercules, CA, USA)
1kbp DNA-Ladder	New England Biolabs (Schwalbach)
100bp DNA-Ladder	New England Biolabs (Schwalbach)

Tabelle 3: Chemikalien, Reagenzien und deren Herkunft

### 2. Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Blockinglösung Western blot	100 ml PBS 5% Magermilchpulver (w/v) 0,05% Tween (v/v)
Blotting-/Transferpuffer (Western blot)	80 ml Towbin-Puffer 200 ml Methanol Ad 1 l mit A. dest. aufgefüllt
PBS	1,5 mM $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 0,8 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 137 mM NaCl 3 mM KCl pH 7,4
PBS-Tween	1 l PBS

	0,05% Tween-20
Proteinase K	1 mg/ml in 1,5 M KCl
SDS-Lysepuffer (1x)	62,5 mM Tris-HCl 0,01% Bromphenolblau (w/v) 2% SDS (w/v) 3,2% $\beta$ -Mercaptoethanol 10% Glycerin (v/v) pH 6,8
SDS-PAGE-Laufpuffer (5x)	72,5 g Glycin 15,2 g Tris 25 ml SDS (20%) Ad 1 l mit A. dest. aufgefüllt
TAE-Puffer (20x)	0,32 M Tris 2,3% Essigsäure (v/v) 25 mM EDTA pH 8,0
Towbin-Puffer	24 g Tris 112,6 g Glycin Ad 1 l mit A. dest. aufgefüllt
Tris	10 mM bis 2 M, diverse pH-Werte

Tabelle 4: Liste der Puffer und Lösungen

### 3. Kommerzielle Kits

Bezeichnung	Herkunft
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen (Hilden)
ReadyMix Taq PCR Reaction Mix	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Tabelle 5: Liste der verwendeten Kits

### 4. Nährmedien und Zusätze

Bezeichnung	Herkunft
FCS (Foetal bovine serum)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
MEM (Minimum Essential Medium) inkl. L-Glutamin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
MEM non essential aminoacids solution 100x	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Tabelle 6: Liste der Nährmedien, Zusätze und deren Hersteller

## 5. Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Nährmedium
CEF/ Chicken embryo fibroblasts	Primäre Hühnerembryo-fibroblasten aus bebrüteten SPF-Hühnereiern	MEM (+ L-Glutamin) 10% FCS Kulturmedium / 2% FCS Infektionsmedium 1% Pen/Strep 1% NEAA
EFB/ Equine fibroblasts	Primäre Pferdefibroblasten aus Cornea	MEM (+ L-Glutamin) 10% FCS Kulturmedium / 2% FCS Infektionsmedium 1% Pen/Strep 1% NEAA
HeLa	Humane Epithelzelllinie	MEM (+ L-Glutamin) 10% FCS Kulturmedium / 2% FCS Infektionsmedium 1% Pen/Strep 1% NEAA

Tabelle 7: Liste der verwendeten Zelllinien und deren Nährmedien

Die HeLa- Zelllinie stammt von dem entarteten Gebärmutterhalsgewebe der Patientin Henrietta Lacks; sie wurde 1951 etabliert und ist als tumoröses Gewebe immortalisiert (Landry J et al. 2013).

## 6. Plasmide

Bezeichnung	Aufbau	Herkunft
pIIIH5redK1L	Ausgangsvektor mit dem Selektionsmarker mCherry zwischen MVA-DelIII-Flank1 und Flank1-repeat	Gerd Sutter LMU
pIIIH5red_HeVF	Ausgangsvektor mit der Gensequenz des Hendra-Virus F-Proteins zwischen MVA-DelIII-Flank2 und -Flank1-repeat	Gerd Sutter LMU
pLW-73	Ausgangsvektor	Bernard Moss, NIH, USA
pLW-73_HeVG	Ausgangsvektor mit der Gensequenz des Hendra-Virus G-Proteins in der Insertionsstelle I8R-G1L	Gerd Sutter LMU
P-73_HeVsG	Ausgangsvektor mit der Gensequenz des Hendra-Virus sG-Proteins in der Insertionsstelle I8R-G1L	Gerd Sutter LMU

Tabelle 8: Liste der Plasmide, deren Konstruktion und Herkunft

## 7. Enzyme

Enzym	Herkunft
Trypsin-EDTA solution	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Taq-Polymerase (ReadyMix Taq PCR Reaction Mix)	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Tabelle 9: Liste der verwendeten Enzyme und deren Bezugsquelle

## 8. Viren

Bezeichnung	Konstruktion	Herkunft
MVA_F6	Wildtypisolat F6	Gerd Sutter LMU
MVA_HeV-F	Rekombinantes MVA_F6-Virus mit der Sequenz des Hendra-Virus F-Proteins im Bereich der Deletionsstelle III reguliert durch den Promotor PmH5	Gerd Sutter LMU
MVA_HeV-G	Rekombinantes MVA_F6-Virus mit der Sequenz des Hendra-Virus G-Proteins im Bereich der Insertionsstelle I8R-G1L reguliert durch den Promotor PmH5	Gerd Sutter LMU
MVA_HeV-sG	Rekombinantes MVA_F6-Virus mit der Sequenz des Hendra-Virus sG-Proteins im Bereich der Insertionsstelle I8R-G1L reguliert durch den Promotor PmH5	Gerd Sutter LMU

Tabelle 10: Liste der verwendeten Viren, deren Konstruktionsweise und Herkunft

## 9. Antikörper

### 9.1 Nicht-konjugierte Antikörper

Bezeichnung	Spezifität	Herkunft	Arbeitsverdünnung	Bezugsquelle
Anti-Actin	$\beta$ -Actin Maus	Kaninchen monoklonal	1:2000	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Anti-HeVF	Hendra-Virus-	Kaninchen	1:10000	Christopher

	Fusionsprotein	polyklonal		CBroder, USUHS, USA
Anti-HeVG	Hendra-Virus Attachment- protein	Kaninchen polyklonal	1:10000	Christopher C Broder, USUHS, USA
Anti-VacV Lister	VacV-Virionen	Kaninchen polyklonal	1:2000	Acris Antibodies GmbH (Herford)

## 9.2 Konjugierte Antikörper

Anti-Rabbit	Rabbit IgG, HRP-linked Antibody		1:5000	Cell signaling technologies, (Cambridge, UK)
Peroxidase conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit	IgG Kaninchen	Ziege polyklonal	1:5000	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (West Grove, US)
Polyclonal goat Anti-Mouse Antibody	IgG Maus	Ziege polyklonal	1:2000	Dako Denmark A/S (Glostrup, DK)

Tabelle 11: Liste der verwendeten nicht-/konjugierten Antikörper

## 10. Synthetische Oligonukleotide (Primer)

Bezeichnung	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Verwendung
C7L-for C7L-rev	CATGGACTCATAATCTCTATAC ATGGGTATACAGCACGAATTC	PCR des C7L-Gens von MVA
PmH5 forward 73 spec reverse	ATTCTCGCTGAGGAGTTGG GTCGTGTCTACAAAAGGAG	PCR der Insertionsstelle zwischen den Genen I8R-G1L
HeVF-Insert forward HeVF-Insert reverse	ACTACCAATTCTCTCGGACAC ATGACTATCCAAGCGATTTCTC	Insert-PCR des Hendra-Virus F- Proteins
HeVsG 2 forward HeVsG 2 reverse	GACAAGCTGGAGGAGATCG CACACGTTGGTCATGAACATG	Insert- PCR des Hendra-Virus sG- Proteins
MVA_DelI-F MVA_DelI-R	CTTTCGCAGCATAAGTAGTATG TC CATTACCGCTTCATTCTTATATT C	PCR der Deletionstelle I von MVA
MVA_DelIII-F	GGGTAAAATTGTAGCATCATAT	PCR der Deletionstelle

MVA_DelIII-R	ACC AAAGCTTTCTCTCTAGCAAAGA TG	II von MVA
MVA_DelIII-F MVA_DelIII-R	GTACCGGCATCTCTAGCAGT TGACGAGCTTCCGAGTTCC	Flank- PCR der Del III in MVA
MVA_DelIV-F MVA_DelIV-R	AGATAGTGGAAGATACTGT TACG TCTCTATCGGTGAGATACAAAT ACC	PCR der Deletionstelle IV von MVA
MVA_DelIV-F MVA_DelIV-R	CGTGTATAACATCTTTGATAGA ATCAG AACATAGCGGTGTACTAATTGA TTT	PCR der Deletionstelle V von MVA
MVA_DelVI-F MVA_DelVI-R	CGTCATCGATAACTGTAGTCTT G TACCCTTCGAATAAATAAAGAC G	PCR der Deletionstelle VI von MVA

Tabelle 12: Liste der verwendeten Primer. Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) nach Auftrag synthetisiert und geliefert.

## 12. Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
Einmal-Handschuhe	HenrySchein (Gillingham, UK)
Entsorgungsbeutel	Sarstedt (Nümbrecht)
Falcon-Behälter (15ml, 50ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Filterpapier	GE HealthCare Life Sciences (Buckinghamshire, UK)
Filterspitzen (10µl, 20µl, 200µl, 1000µl)	Sarstedt (Nümbrecht)
Flächendesinfektionsmittel SafeSept	HenrySchein (Gillingham, UK)
Wischfix (Haushaltstücher)	Fripa (Miltenberg)
PCR-Reaktionsgefäße (thin-walled 8 tube strips)	Thermo Scientific Fisher (Waltham, MA)
Reaktionsgefäße Eppendorf (1,5ml)	Eppendorf (Hamburg)
Serologische Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Whatman-Membran	GE HealthCare Life Sciences (Buckinghamshire, UK)
Zellkulturplatten (6- und 24-Well-Tissue culture-Platten)	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturflaschen (T25, T75, T175)	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellschaber (Großer Zellschaber)	VWR (Darmstadt)
Zellstofftücher	HenrySchein (Gillingham, UK)

Tabelle 13: Auflistung der verwendeten Verbrauchsgegenstände sowie deren Bezugsquellen

### 13. Software

Bezeichnung	Anbieter
Adobe Reader XI	Adobe Systems (San Jose, USA)
DNASTAR Lasergene 7	DNASTAR Inc. (Madison, USA)
GraphPad Prism 5	GraphPad Software (La Jolla, USA)
Microsoft Office 2010	Microsoft Corp. (Redmond, USA)

Tabelle 14: Auflistung der verwendeten Software und deren Anbieter

### 14. Geräteliste

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
Blotting-Kammern (PowerPac Basic)	Bio-Rad (München)
Brutschränke (New Brunswick Galaxy 170S)	Eppendorf (Hamburg)
Chemilumineszenzimager (MicroChemi)	DNR Bio-Imaging Systems (Jerusalem, Israel)
Trockeneis (Migel KKS)	Senago (Mailand, ITA)
Gefriertruhe -20°C (Bosch economic froster)	Bosch (München)
Gefriertruhe -80°C (Nalge Nunc International)	Thermo Scientific Fisher (Waltham, MA)
Geldokumentationseinheit (ChemiDoc MP)	Bio-Rad (München)
Gelkammern (Mupid-One Advance)	Nippon Genetics Europe (Düren)
Kühlschrank 4°C (Economic)	Bosch (München)
Mikropipetten 10µl, 100µl, 1000µl (Research Plus)	Eppendorf (Hamburg)
Mikroskop (MBL 2300)	A.Krüss Optronik (Hamburg)
Mikrowelle (800W)	Panasonic (Japan)
PCR-Cycler (PepStar Thermocycler)	peqlab (Erlangen)
Pipettierhilfe (integra Pipetboy)	Integra Biosciences (Zizers, CH)
Schüttler (Rocker platform)	Belco Glass Inc. (Vineland, NJ)
Spectrophotometer (NanoDrop ND-1000)	peqlab (Erlangen)
Sterilbank (HeraSafe)	Heraeus (Geroldshausen)
Thermoschüttler (comfort)	Eppendorf (Hamburg)
Ultraschallgerät (Sonopuls HD 2200)	Bandelin (Berlin)
Vortexgerät (Paramix II)	Julabo (Lahr/Schwarzwald)
Waage (Sartorius)	M-Prove (Göttingen)
Western blot- Netzgerät (PowerPac Basic)	Bio-Rad (Hercules, CA)
Zellzählkammer (Neubauer improved)	Assistent (Sondheim/Röhn)
Zentrifuge (Sigma 1-14; PMC-060 Capsulefuge)	Sigma (Osterode am Harz) Poly Labo (Straßburg, FRA)

Tabelle 15: Liste der verwendeten Geräte und deren Hersteller



## 15. Zellkultur

### 15.1 Auftauen von Zellen

Die bei  $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Stickstofftank gelagerten Zellen wurden bei Raumtemperatur und unter vorsichtiger, tropfenweiser Zugabe von Kulturmedium langsam erwärmt. Anschließend erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 1200rpm. Das hierbei entstandene Zellpellet wurde in eine T25-Zellkulturflasche mit 10ml MEM-Medium mit 10% FCS-Anteil überführt.

### 15.2 Kultivierung und Passagierung permanenter Zelllinien

Die Zellkulturflaschen wurden im Inkubator bei  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  -Atmosphäre und ca. 90% Luftfeuchtigkeit gelagert.

Zum Teilen/Passagieren der Zellen wurde bei entsprechender Zelldichte zunächst das verbrauchte Medium steril abgehoben und die Kultur mit der entsprechenden Menge PBS-Puffer gewaschen; bei T175-Zellkulturflaschen wurden 5ml des Puffers in das Gefäß gegeben, die Flasche kurz geschwenkt, um die Flüssigkeit daraufhin wieder abzuheben. Anschließend wurden 5ml Trypsin auf die Kultur gegeben und die Flasche zurück in den Inkubator verbracht; das Enzym Trypsin wird durch die erhöhte Temperatur ( $37^{\circ}\text{C}$ ) aktiviert. Im weiteren Verlauf kommt es zur Ablösung der Zellen vom Plastikboden der Zellkulturflasche; der Vorgang dauert je nach Zelllinie zehn bis zwanzig Minuten. Nach ausreichender Resuspension wurde die gewünschte Menge (meist 1ml) in der Flasche belassen, diese hierauf mit 30ml frischem MEM-Medium sowie individuell erforderter FCS-Konzentration aufgefüllt und zur Lagerung zurück in den Brutschrank verbracht. Je nach Zelllinie und zugefügter FCS-Menge erfolgte der Vorgang etwa alle drei bis vier Tage.

### 15.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mittels der Neubauer- improved- Zählkammer bestimmt; es wurden vier große Quadrate ausgezählt. Die Berechnung erfolgt aus dieser Formel:

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

## 16. Molekular- und mikrobiologische Methoden

### 16.1 Präparation viraler DNA

Zum Zwecke der Gewinnung viraler DNA wurden zunächst Cef-Zell-Monolayer in 6-Well-Platten ausgelegt und diese bei 80-90%-dichtem Zellrasen mit den entsprechenden Viren infiziert.

Nach 48h im Brutschrank wurde mit Zellschabern der Zellrasen gemeinsam mit dem Kulturmedium steril abgehoben und in 2ml Eppendorfgefäße (Eppis) überführt.

Nach Zentrifugation bei 13000rpm für eine Minute wurde das Gesamtvolumen auf 200µl reduziert und hieraus dann gemäß dem Protokoll des kommerziell erwerbbaaren QIAamp DNA Mini Kit die DNA aufgereinigt. Nach Ermittlung der Konzentration der Desoxyribonukleinsäure via Nanodrop-Gerät wurden die DNA-Proben bei -20°C bis zur weiteren Verwertung eingefroren.

### 16.2 PCR (Polymerasekettenreaktion)

Zur Kontrolle der erfolgten Zielgeninsertion und der Intaktheit sowohl der Zielgensequenzen als auch des restlichen Virusgenoms wurden verschiedenen PCR-Protokolle anhand der aufgereinigten DNA-Proben durchgeführt. Pro Probe wurde ein Gesamtvolumen von 25µl verwendet, basierend auf dem ReadyMix Taq PCR Reaction Mix-Kit von Sigma-Aldrich.

Protokolle:

## 1. C7L

<b>Step1 1x</b>	Polymeraseaktivierung	5 min	94°C
<b>Step2 35x</b>	a) Denaturierung	30 sec	94°C
	b) Annealing	20 sec	45°C
	c) Extension	30 sec	72°C
<b>Step3</b>	Extension	5 min	72°C

## 2. Del I-VI

<b>Step1 1x</b>	Polymeraseaktivierung	5 min	95°C
<b>Step2 35x</b>	a) Denaturierung	30 sec	95°C
	b) Annealing	1 min	47°C
	c) Extension	1 min	68°C
<b>Step3</b>	Extension	5 min	72°C

## 3. I8R-G1L

<b>Step1 1x</b>	Polymeraseaktivierung	5 min	98°C
<b>Step2 35x</b>	a) Denaturierung	30 sec	98°C
	b) Annealing	30 sec	51°C
	c) Extension	2 min	72°C
<b>Step3</b>	Extension	5 min	72°C

## 4. F-Insert

<b>Step1 1x</b>	Polymeraseaktivierung	5 min	94°C
<b>Step2 35x</b>	a) Denaturierung	30 sec	94°C
	b) Annealing	30 sec	43°C
	c) Extension	2 min	72°C
<b>Step3</b>	Extension	5 min	72°C

5. sG-Insert

<b>Step1</b> <b>1x</b>	Polymeraseaktivierung	5 min	94°C
<b>Step2</b> <b>35x</b>	a) Denaturierung	1 min	94°C
	b) Annealing	30 sec	49°C
	c) Extension	2 min	72°C
<b>Step3</b>	Extension	5 min	72°C

Grundsätzlich folgte auf den letzten der 35 Zyklen ein weiterer finaler Elongationsschritt bei 72°C für 5min; daraufhin wurden die Proben bis zur Entnahme aus dem PCR-Cycler (PeqStar Thermocycler) auf 4°C gekühlt. Bei Entnahme wurde den Proben 6x-Probenpuffer in der Verdünnung 1:6 (also jeweils 5 µl) beigefügt und diese danach gelelektrophoretisch aufgetrennt.

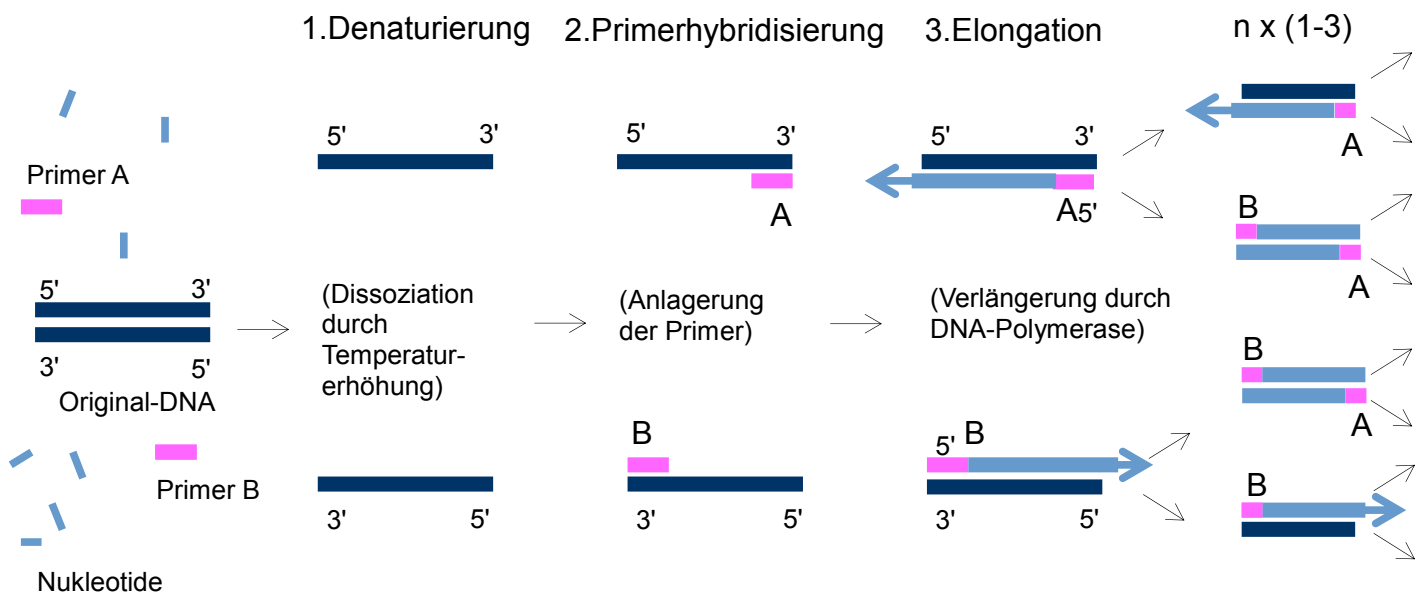


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Prinzips der Polymerasekettenreaktion

### 16.3 Auftrennung von DNA-Fragmenten via Gelelektrophorese

In dieser Arbeit wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 1-1,8% verwendet. Die benötigte Agarose-Menge wurde in 100ml 1xTAE-Puffer bis zur vollständigen Verflüssigung in der Mikrowelle aufgekocht und mit 2,5µl GelRed versetzt. Nachdem die Gele gegossen worden und abgekühlt waren, wurden sie in die Gelelektrophorese-Kammer verbracht und diese mit 1xTAE-Puffer befüllt. Die DNA-Konzentration der PCR-Ergebnisse wurde via Nanodrop-Spectrophotometer gemessen und eine etwa 50ng DNA entsprechende Menge in die jeweiligen Geltaschen eingegeben. Für den späteren Größenvergleich wurde auch ein Marker in eine der Kavitäten eingefüllt (DNA-Ladder). Nach einer Laufzeit von etwa 45 Minuten bei 75V wurde das Gel in der ChemiDoc MP-Geldokumentationseinheit entwickelt und die Ergebnisse dokumentiert.

## 17. Virologische Methoden

### 17.1 Infektion von Zellen

Die zu infizierenden Zellen wurden am Vortag unter Verwendung von MEM-Medium mit 10%-FCS ausgelegt, sodass sie am Tag der Infektion etwa 90% Konfluenz aufwiesen.

Die Viren wurden dreimal aufgetaut und wieder eingefroren, einer dreimaligen Ultraschallbehandlung von jeweils einer Minute und dazwischen einer kräftigen Durchmischung unter Zuhilfenahme des Vortex- Geräts unterzogen, um das restliche Zellgewebe aufzubrechen und Virus-Cluster zu vermeiden.

Nach Anfertigung der individuell erforderlichen Verdünnungsstufen in MEM-Medium mit 2%-FCS-Gehalt, wurde das verbrauchte Medium von den Zellen entfernt und die jeweilige Menge an Virusverdünnung aufgetragen (bei 6-Well-Platten pro Kavität 1ml, bei 24-Well-Platten 0,5ml).

Je nach Vorhaben wurde das infektiöse Medium in den Wells belassen und nach zwei Stunden um die gleiche Menge mit Medium (2% FCS) aufgefüllt oder nach zweistündiger Inkubationszeit bei 37°C im Brutschrank abgehoben, die Kavität einmal mit PBS-Puffer gewaschen und frisches Medium mit 2%-FCS-Gehalt aufgetragen.

Bei der Cold-Start-Methode wurde die frisch infizierte Platte für 30 Minuten im Kühlschrank aufbewahrt, hierauf das Medium entfernt, mit PBS-Puffer gewaschen und das zu verbleibende Medium (2%-FCS) hinzugefügt. Anschließend wurde die Platte in den Brutschrank verbracht.

### 17.2 Bestimmung des Virustiters

Zunächst wurde die erforderliche Anzahl an 6-Well-Platten am Vortag so ausgelegt, dass die Zellen am darauffolgenden Tag ca. 90% Konfluenz aufwiesen.

Die zu bestimmenden Proben wurden dreimal aufgetaut und wieder eingefroren, sowie der Sonifikation unterzogen. Dann wurden serielle 10log-Verdünnungen der Virussuspension angelegt, in der Regel von  $10^{-1}$  bis  $10^{-9}$ . Nach der Entfernung des verbrauchten Mediums von den Platten wurden die verschiedenen Verdünnungsstufen auf die Zellen verbracht; dies geschah im Doppelansatz, sodass pro Platte drei Verdünnungsstufen aufgetragen werden konnten.

Für eine Inkubationszeit von zwei Stunden wurden die Platten in den Brutschrank gegeben, danach das infektiöse Medium abgehoben, die Kavitäten mit PBS-Puffer gewaschen, mit 2ml frischem Medium (2% FCS) pro Well befüllt und für 48 Stunden in den Brutschrank zurückgestellt.

Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Medium steril abgehoben und der Zellmonolayer mit etwa 0,5ml eiskaltem Methanol-Aceton-Gemisch (1:1) pro Kavität fixiert. Das Gemisch wurde fünf Minuten auf dem Zellrasen belassen, dann abgehoben und die Platten luftgetrocknet. Es folgte eine Stunde Inkubation mit PBS-Puffer versetzt mit 3%-FCS, um unspezifischer Avidität der Antikörper in den nachfolgenden Schritten vorzubeugen.

Die Pufferlösung wurde entfernt und statt ihrer der erste Antikörper VacV-Lister aufgetragen. Dies geschah in einer Verdünnung von 1:2000 in PBS-3%FCS-Pufferlösung, pro Well wurde 1ml verwendet. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler „Rocker platform“ wurde das Antikörper-PBS-Gemisch verworfen und die Kavitäten dreimal mit PBS-3%FCS-Puffer gewaschen. Der zweite Antikörper (anti-rabbit), an den das Enzym Peroxidase gekoppelt ist, wurde in der entsprechenden Menge PBS-3%FCS-Puffer 1:5000 verdünnt und auf die Wells gegeben; wiederum wurden die Platten für eine Stunde auf dem Schüttler belassen.

Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die dreimalige Waschung mit PBS-3%FCS-Puffer. Hierauf wurden pro Kavität 0,5ml TrueBlue Peroxidase Reagent aufgetragen, die Platten bis zum Farbumschlag zurück auf den Schüttler gestellt und danach ausgewertet. Dafür wurde die Verdünnungsstufe ausgewählt, die unter 100 zählbare Plaques aufwies, diese in beiden Wells des Doppelansatzes mit bloßem Auge ausgezählt, der Mittelwert gebildet und mit der jeweiligen Verdünnungsstufe verrechnet. Die Titerangabe erfolgte in pfu/ml (plaque forming units per milliliter).

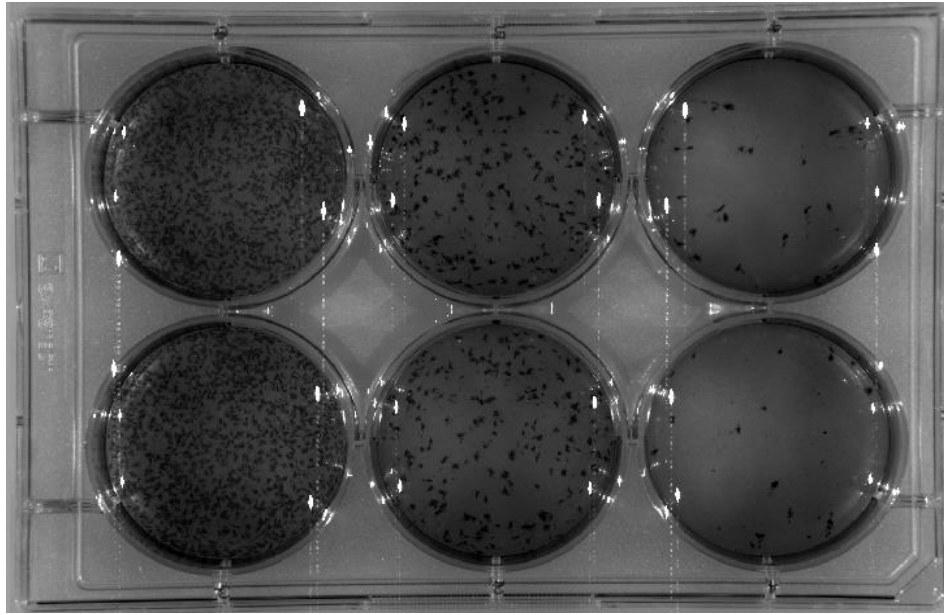


Abbildung 12: Beispiel einer Virustiterbestimmung via Titration.

Nach erfolgter Probengewinnung und Erstellung entsprechender Verdünnungsstufen Auftrag auf bereitgestellte Cef-Zell-6-Well-Platten. Nach 48-stündiger Inkubation Fixation der Zellen und Färbung der Virusplaques mittels Antikörper (Anti-VacV Lister, polyklonal, Kaninchen und Anti-rabbit, Peroxidase-gekoppelt) und TrueBlue Peroxidase Reagent. Anschließend Auszählung der Plaques und Titerbestimmung. (Im Beispiel der Abbildung  $2,8 \times 10^4$ )

### 17.3 Wachstumskinetik – Mehrstufenwachstumsanalyse

Zur Untersuchung der Replikationsfähigkeit der rekombinanten Viren wurden pro Virus fünf 6-Well-Platten mit Cef-Zellen vorbereitet. Bei einer Konfluenz von etwa 90% wurde das verbrauchte Medium entfernt und pro Kavität 1ml frisches Medium (2% FCS), das mit einem MOI von 0,01 des jeweiligen Virus infiziert worden war, auf die Zellrasen aufgetragen. Die Viren waren zuvor dreimal aufgetaut und eingefroren, sowie sonifiziert und vortexbehandelt worden.

Nach einer halben Stunde im Kühlschrank (cold-start-Methode) wurde das infektiöse Medium steril abgehoben, die Platten mit PBS-Puffer gewaschen und mit frischem Medium (2% FCS) befüllt.

Hierauf wurden umgehend die ersten Proben entnommen, in die Gefriertruhe ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) verbracht und stellten somit den ersten Zeitpunkt der Untersuchung (0h) dar.

Weitere Exemplare wurden zu den Zeitpunkten 4h, 12h, 24h und 48h weggefroren.

Dazu wurden unter der Sterilbank die Zellrasen mit Zellschabern sorgfältig vom Plastikboden der Platten abgelöst und nach gründlicher Resuspendierung im Medium in Eppendorfgefäße überführt.



Die Virustiterbestimmung der verschiedenen Zeitpunkte wurde nach dem Verfahren der Titration (siehe 17.2) auf Cef-Zellen bestimmt.

Nach Eruiierung der Titer zu den einzelnen Zeitpunkten wurden die Daten in das Softwareprogramm GraphPad Prism eingetragen, um die entsprechenden Kurven zu generieren.

Die Mehrstufenwachstumsanalyse untersucht die Fähigkeit des Virus, sich über einen Zeitraum von Zelle zu Zelle auszubreiten; so werden Infektiosität und die Dauer, die das Virus benötigt, um den gesamten Zellrasen zu durchseuchen, untersucht.

## 18. Proteinbiochemische Methoden

### 18.1 Gewinnung von Proteinlysaten aus infizierten Zellen

Zur Herstellung von Proteinextraktionen wurde zunächst ein konfluenten Monolayer einer 6-Well-Platte der zu untersuchenden Zelllinie infiziert. Das infektiöse Medium wurde eine Stunde bei 8°C auf den Zellen belassen, daraufhin entfernt, die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen, und mit 2ml frischem Medium (2% FCS) pro Well aufgefüllt. Sofort wurde die erste Probe genommen (0h-Zeitpunkt); zur Probennahme wurde grundsätzlich das Medium wieder entfernt und 500µl kalter PBS-Puffer in das jeweilige Well gefüllt. Der Zellrasen wurde mit Zellschabern abgelöst und mit dem Puffer in ein Eppendorfgefäß überführt. Hierauf folgte ein Zentrifugationsschritt bei 13000rpm für 20 Sekunden, um anschließend den PBS-Überständen abheben zu können und das Pellet in 40µl Lysispuffer zu lösen. Das Pellet-Lysispuffer-Gemisch wurde 20 Minuten auf Eis inkubiert.

Erneut wurde bei 13000rpm für 15 Minuten bei 8°C zentrifugiert, der so entstandene Überstand abgehoben und in ein neues, eiskaltes Reaktionsgefäß überführt, um dann bei -80°C gelagert zu werden.

Weitere Proben wurden auf die gleiche Art und Weise zu den Zeitpunkten 6h, 12h, 24h und 48h genommen.

### 18.2 Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine via SDS-Page

Um die Proteine nach ihrer Molekülmasse zu ordnen, wurden sie im Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Verfahren (SDS-Page) im elektrischen Feld aufgetrennt.

### 18.2.1 Erstellung von SDS-Page-Gelen

In der hier beschriebenen Arbeit wurde ein zweiphasiges Gel bestehend aus einem Trenn- und einem Sammelgel verwendet. Dabei besitzt das Sammelgel einen niedrigeren pH-Wert und eine geringere Acrylamid-Konzentration als das Trenngel. Im ersten Schritt wurde die Reinigung der Glas- und Keramikplatten des Western-blot-Systems mit alkoholischem Flächendesinfektionsmittel vorgenommen und die Apparatur zusammengesetzt. Daraufhin wurde das Trenngel nach den Angaben in der Tabelle 15 hergestellt und in die dafür vorgesehenen Kavitäten eingefüllt. Die Gele wurden mit jeweils etwa 200µl Isopropanol abgedeckt und mindestens eine Stunde luftgetrocknet.

Anschließend wurde der restliche Isopropanol abgegossen, das flüssige Sammelgel auf das getrocknete Trenngel gegeben, die Kämme gesteckt und wieder eine Stunde luftgetrocknet. Bis zur Verwendung wurden die fertigen Gele mit einem feuchten Wischfix-Haushaltstuch abgedeckt, in eine Plastiktüte verbracht und im Kühlschrank aufbewahrt.

	<b>Trenngel</b>	<b>Sammelgel</b>
<b>Ingrediens</b>	Menge für 10%	Menge für 5%
Acrylamid	9,9ml	2,6ml
Tris- HCl	7,5ml (1,5M, pH8,8)	1,25ml (0,5M, pH6,8)
H <sub>2</sub> O	12ml	15,7ml
SDS 20%	150µl	400µl
APS 10%	150µl	100µl
TEMED	15µl	20µl

Tabelle 16: Darstellung der Rezeptur für die SDS-Page-Gele

### 18.2.2 Durchführung des SDS-Page

Zunächst wurden die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Western blot-Proben mit  $8\mu\text{l}$  Roti-Load-Blaupuffer versetzt und fünf Minuten bei  $95^{\circ}\text{C}$  im Thermoschüttler zur Denaturierung aufgeköcht. Das zu verwendende Gel wurde in die Laufkammer eingespannt, der Gelkamm entfernt, mit Laufpuffer aufgefüllt und  $20\mu\text{l}$  der Proben sowie der Marker (Prestained protein ladder,  $3\mu\text{l}$ ) zur späteren Größenidentifizierung in die Geltaschen eingefüllt. Die Laufkammer wurde an das Netzgerät angeschlossen und bei  $100\text{V}$  und maximal  $400\text{mA}$  für 80 Minuten angestellt.

### 18.3 Western blot (Tank-Blot-Verfahren)

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden im Tank-Blot-Verfahren auf eine PVDF- (Polyvinylidenfluorid)-Membran übertragen, um so später mittels Immundetektion nachgewiesen werden zu können.

#### 18.3.1 Proteintransfer

Nach erfolgtem Auftrennen der Proteine im SDS-Page-Gel wurde das Gel der Laufkammer entnommen. Die Blotkammer wurde mit  $1\times$ Blotpuffer (Transferpuffer nach Towbin) aufgefüllt und die verschiedenen Schichten der Blotkassette (Schwämme und Filterpapiere, siehe Abbildung 3), sowie die PVDF-Membran (Whatman) mit dem Blotpuffer befeuchtet. Das Gel wurde von der Keramikplatte gelöst und auf die der Kathode zugewandten Seite der Kassette (schwarz) auf das Filterpapier gelegt und die Whatman-Membran auf das Gel verbracht. Luftblasen zwischen Membran und Gel wurden ausgestrichen, die Kassette geschlossen und in die Blotkammer gesteckt. Nach dem Einlegen einer Eiskassette in die Kammer, um die Temperatur während des Vorgangs herunterzukühlen, wurde die Apparatur bei  $100\text{V}$  und maximal  $400\text{mA}$  für 60 Minuten an das Netzgerät angeschlossen.

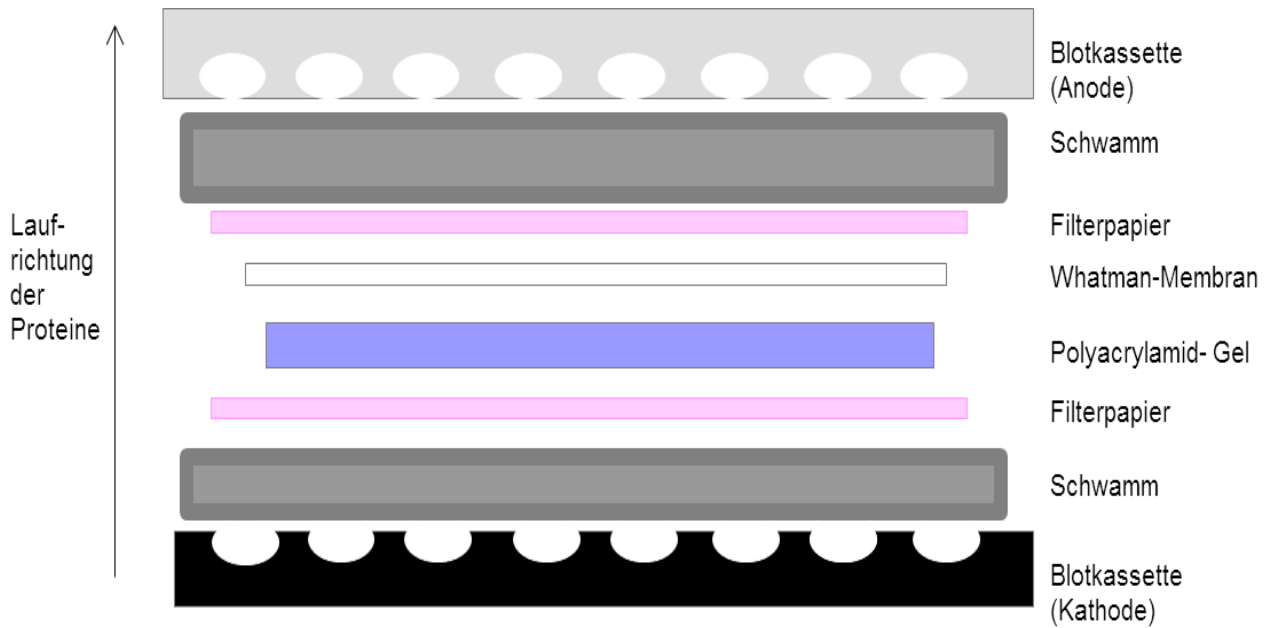


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Aufbaus der Blotkassette für den Membrantransfer

### 18.3.2 Proteinnachweis

Die Immundetektion wurde unter Zuhilfenahme von Antikörpern durchgeführt. Um unspezifische Bindung zu vermeiden, wurde die Whatman-Membran nach dem erfolgten Proteintransfer für eine Stunde auf dem Schüttler in 5%-Milch (Magermilchpulver gelöst in PBS mit 0,05% Tween) eingelegt.

Der erste Antikörper wurde ebenfalls in 10ml 5%-Milch in einem 50ml Falcongefäß 1:10000 verdünnt (je nach Virus  $\alpha$ HeV-G oder  $\alpha$ HeV-F, polyklonal, Kaninchen) und über Nacht bei 8°C auf dem Roller belassen.

Am nächsten Tag wurde die Membran dem Falcon entnommen und etwa viermal für jeweils zehn Minuten in PBS versetzt mit 0,05% Tween gewaschen. Der Anti-Rabbit-Antikörper wurde in einem Gesamtvolumen von 10ml 1:5000 verdünnt und auf die Membran gegeben; die Inkubationszeit hierfür betrug eine Stunde, worauf wiederum viermal mit PBS (0,05% Tween) gewaschen wurde.

Zu guter Letzt wurde die Membran in durchsichtige Plastikfolie gelegt, das Substrat SuperSignal West Dura Chemiluminescent Substrate 1:1 gemischt und im Gesamtvolumen von 1ml auf die Membran aufgetragen. Die Ergebnisse wurden dann im Chemilumineszenzimager (MicroChemi) entwickelt.

#### 18.4 Strippen

Um nach erfolgter Detektion der gesuchten Proteine beispielsweise einen  $\beta$ -Actin-Nachweis anzutreten, wurde nach der Dokumentation im Imager ein sogenannter Strip-Vorgang durchgeführt, um die spezifischen Antikörper der ersten Reaktion von der Membran zu lösen.

Zu diesem Zweck wurden 10ml des Stripping-Puffers auf den Blot aufgetragen und eine halbe Stunde auf dem Rüttler belassen. Hierauf wurde die Membran eine Stunde sorgfältig mit PBS- Puffer (0,05% Tween) wiederholt gewaschen.

Anschließend erfolgte ein Blockvorgang in Milch für eine Stunde, um dann den ersten Antikörper auftragen zu können (siehe 18.3.2).

## IV Ergebnisse

### 1. Aufbau der Konstrukte

#### 1.1 MVA\_HeV-F

In dieser Arbeit wurden drei MVA-Impfstoffkandidaten gegen das Hendra-Virus untersucht: MVA\_HeV-G, MVA\_HeV-F und MVA\_HeV-sG.

Das rekombinante Virus MVA\_HeV-F basiert auf dem Vektorplasmid p3\_PmH5-HeV-F. Dieses Vektorplasmid ermöglicht die gleichzeitige Insertion des Markergens für das rot-fluoreszierende Protein mCherry und der Zielgenesequenz PmH5-HeV-F durch homologe Rekombination in den Bereich der Deletion III des MVA-Genoms.

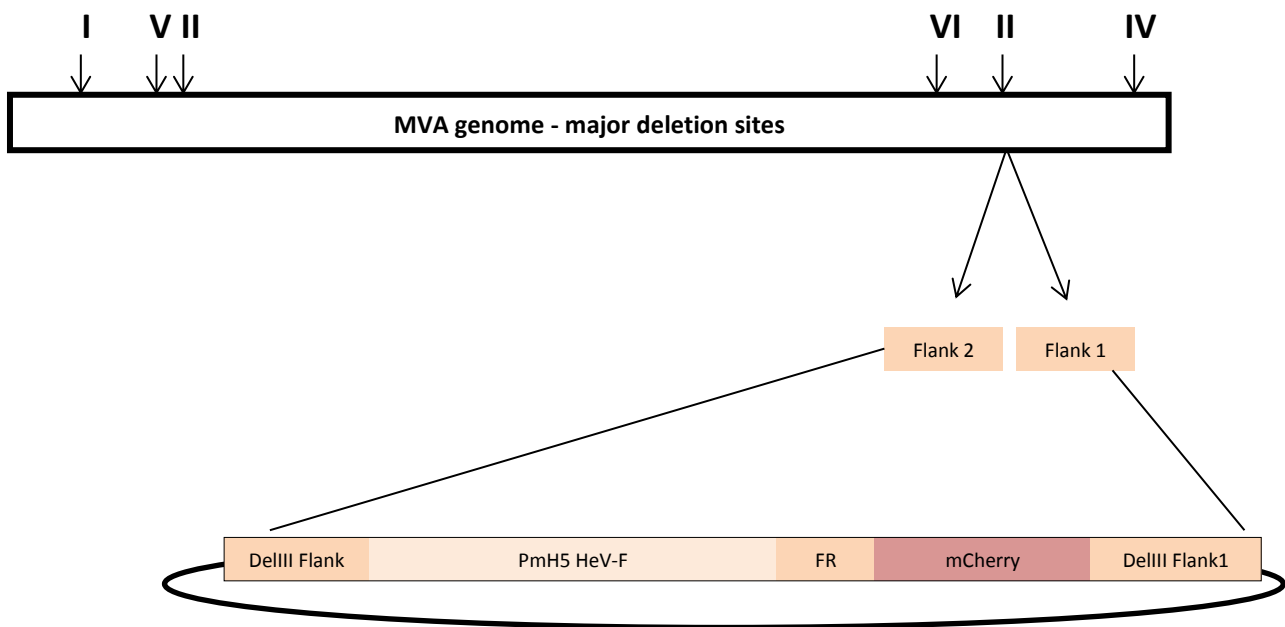


Abbildung 14: **Konstrukt MVA\_HeV-F.** Schematische Darstellung der Konstruktion des rekombinanten Virus MVA\_HeV-F. Die Lage der großen Deletionsstellen (I-VI) im MVA-Genom ist durch Pfeile markiert. Die Fremdgenesequenz PmH5\_HeV-F ist an der Deletionsstelle III im Genom eingebaut. Die Insertion erfolgte durch homologe DNA-Rekombination zwischen klonierten MVA-Gensequenzen (Del III Flank 1, 2) im Vektorplasmid pIII-HeV-F und den identischen MVA-Genomsequenzen angrenzend an die Deletionsstelle III.

mCherry: rot-fluoreszierendes Markerprotein

FR: repetitive Sequenz aus der Flank 1

Promotor: PmH5

#### 1.2 MVA\_HeV-G

Das rekombinante Virus MVA\_HeV-G basiert auf dem Einbringen des Zielgens PmH5-HeV-G mittels des Plasmids plw73-GFP via homologer Rekombination in den Zwischengenenbereich der

Vacciniavirus-Leserahmen I8R und G1L. Diese beiden essentiellen Gene liegen direkt nebeneinander in der hochkonservierten, mittleren Region des Genoms und werden in gegensätzlicher Richtung von der viralen RNA-Polymerase abgelesen (Wyatt L et al. 2009).

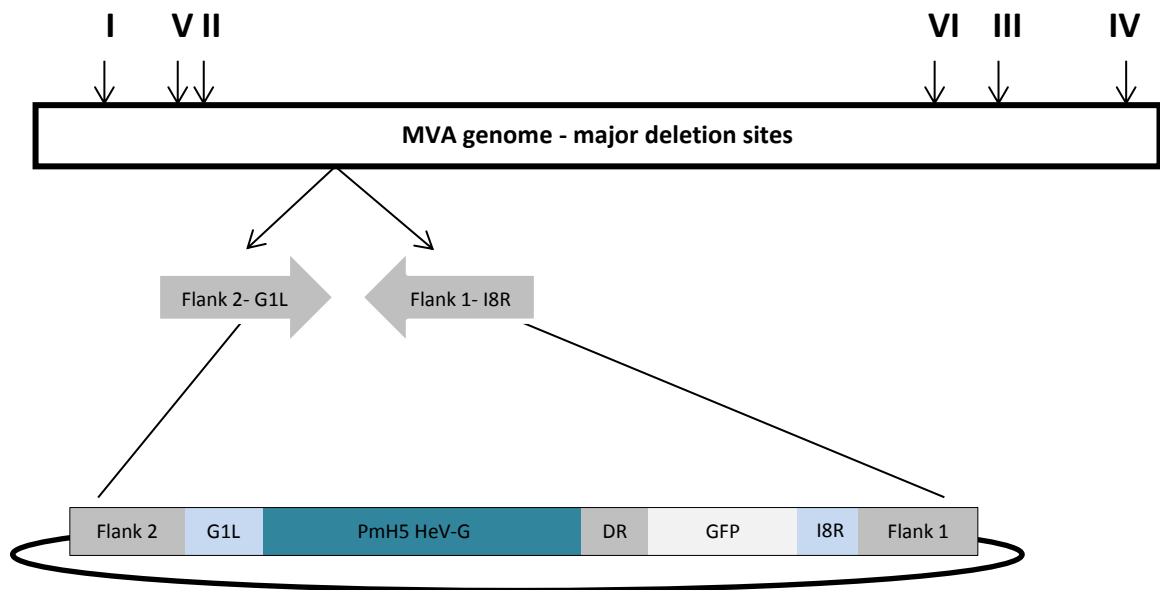


Abbildung 15: **Konstrukt MVA\_HeV-G.** Schematische Darstellung der Konstruktion des rekombinanten Virus MVA\_HeV-G. Die Lage der großen Deletionsstellen (I-VI) im MVA-Genom ist durch Pfeile markiert. Die Fremdgensequenz PmH5\_HeV-G ist an der Insertionsstelle I8R-G1L im Genom eingebaut. Die Insertion erfolgte durch homologe DNA-Rekombination zwischen klonierten MVA-Genomsequenzen (I8R-G1L, Flank 1, 2) im Vektorplasmid plw73-HeV-G und den identischen MVA-Genomsequenzen angrenzend an die Insertionsstelle I8R-G1L.  
 GFP: grün-fluoreszierendes Markerprotein  
 DR: repetitive Sequenz aus der Flank 1  
 Promotor: PmH5

### 1.3 MVA\_HeV-sG

Dieses rekombinante Virus produziert eine lösliche Variante des HeV-Attachmentproteins G. Hierfür wurde die Fremdgensequenz synthetisch modifiziert, indem die für Transmembrandomäne und zytoplasmatischen Anteil des Glykoproteins kodierenden Gensequenzen entfernt wurden. Auch die Expressionskassette für das modifizierte sG-Glykoprotein ist in den I8R-G1L-Zwischengenbereich eingefügt.

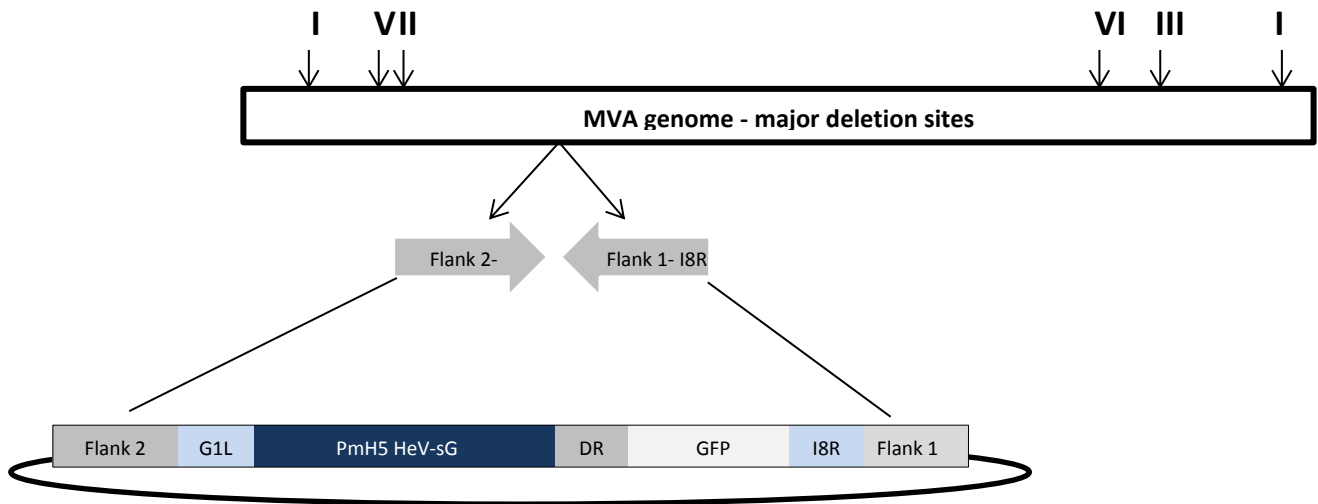


Abbildung 16: **Konstrukt MVA\_HeV-sG**. Schematische Darstellung der Konstruktion des rekombinanten Virus MVA\_HeV-sG. Die Lage der großen Deletionsstellen (I-VI) im MVA-Genom ist durch Pfeile markiert. Die Fremdgenesequenz PmH5\_HeV-sG ist an der Insertionsstelle I8R-G1L im Genom eingebaut. Die Insertion erfolgte durch homologe DNA-Rekombination zwischen klonierten MVA-Genesequenzen (I8R-G1L, Flank 1, 2) im Vektorplasmid plw73-HeV-sG und den identischen MVA-Genomsequenzen angrenzend an die Insertionsstelle I8R-G1L.

GFP: grün-fluoreszierendes Markerprotein

DR: repetitive Sequenz aus der Flank 1

Promotor: PmH5

## 2. Molekularbiologische Charakterisierung der rekombinanten Viren

Um das Genom der rekombinanten Viren hinsichtlich ihrer genetischen Stabilität, Klonalität und Identität sowie der korrekten Größe und Lokalisation der Fremdgenesequenzen zu untersuchen, wurden verschiedene PCR-Ansätze verfolgt.

Die Kontrolle der stabilen Insertion der Hendra-Virus-spezifischen Genesequenzen erfolgte mittels Oligonukleotid-Primern, die spezifisch an Nukleotidsequenzen der Deletionsstelle III respektive der Insertionsstelle I8R-G1L des MVA-Genoms binden.

Die Applikation speziell angefertigter Insertprimer bot den Vorteil, zum einen durch das bloße Entstehen einer Bande die Präsenz der inserierten Gene zu beweisen und somit den Erfolg der homologen Rekombination zu belegen, und zum anderen über den Abgleich der Größe der DNA-Bande mit dem zu erwartenden Wert eine Aussage über die Vollständigkeit des Inserts treffen zu können.

Eine andere PCR-Reaktion erlaubt neben der Überprüfung der Fremdgeninsertion auch den Nachweis von genomischer DNA nicht rekombinanter Viren. Hierfür war die Verwendung von Oligonukleotiden geeignet, deren Anlagerung im flankierenden Bereich der Insertionsstelle erfolgte. Das hierauf folgende Ermessen der Bandengröße bei der Auswertung der Ergebnisse ermöglichte einen soliden Rückschluss auf das Vorhandensein und die Vollständigkeit des DNA-Inserts.



Weitere PCR-Reaktionen dienten zur Amplifikation von spezifischen DNA-Banden für die Bereiche der sechs Deletionsstellen im MVA-Genom und erlaubten eine Aussage hinsichtlich der Stabilität des gesamten Genoms der rekombinanten Viren.

Die Überprüfung der C7L-Gene erfolgte als zusätzliche Kontroll-PCR; dieses Gen kodiert für ein regulatorisches Protein des Vacciniavirus, das bei der Aufrechterhaltung der viralen Genexpression in Säugetierzellen eine entscheidende Rolle spielt (Najera J et al. 2006 und 2010, Backes S et al. 2010).

Auch die Insertionsstelle, die intergenetische Region zwischen den essentiellen Genen I8R und G1L, wurde auf das Vorhandensein des Inserts überprüft.

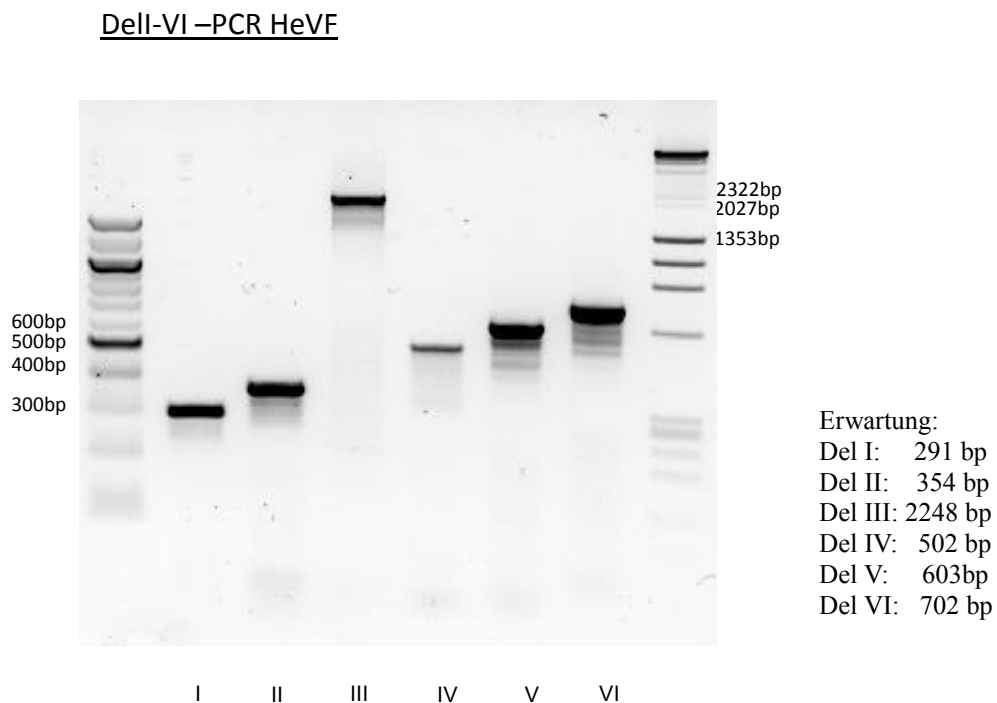


Abbildung 17: **PCR-Analyse nach DNA-Gewinnung von mit MVA\_HeV-F-infizierten Cef-Zellen.** Kontrolle der Intaktheit und Stabilität des MVA-Virusgenoms sowie der erfolgreichen Insertion des Zielgens in die Deletion III mittels der spezifischen Oligonukleotide I-5'/I-3' bis VI-5'/VI-3'. Del III leer: 447bp, Insert HeV-F: 1801bp. 1,8%-Agarose-Gel.

Die Ergebnisse der Sechs-Deletionen-PCR-Analyse des rekombinanten Virus MVA\_HeV-F in Abbildung 17 legten dar, dass die Deletionsstellen I, II, IV, V und VI die jeweils zu erwartenden Bandengrößenaufwiesen

In Deletion III zeigte sich eine 2248 bp große Bande; diese setzt sich aus der zu erwartenden Größe der PmH5-HeV-F-Zielgensequenz von 1801 bp und den die Deletionsstelle III flankierenden Gensequenzen von insgesamt 447 bp zusammen.

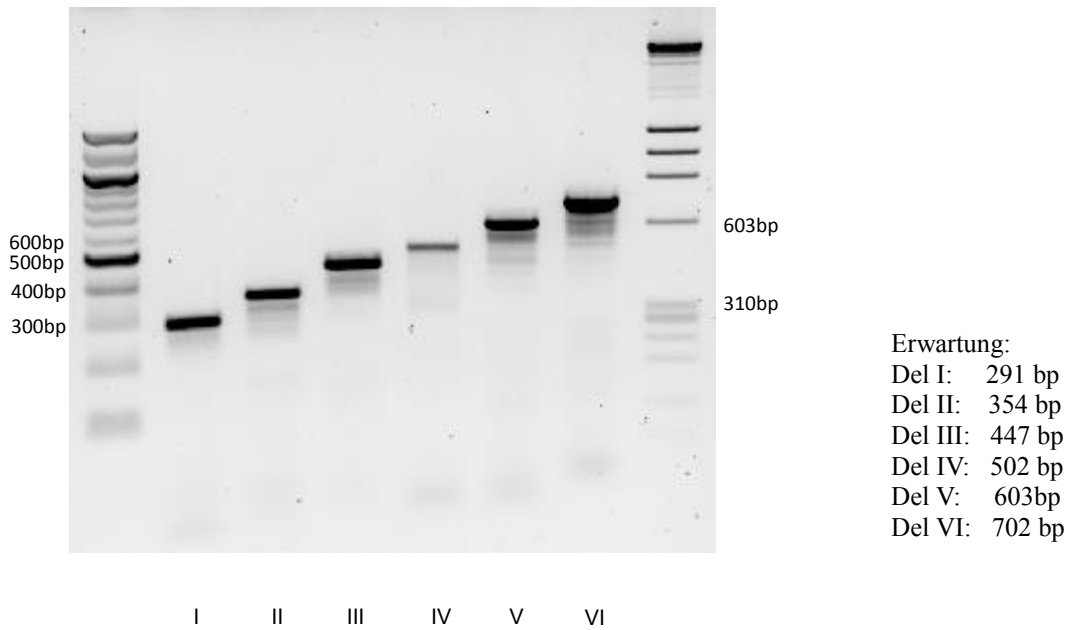


Abbildung 18: **PCR-Analyse nach DNA-Gewinnung von mit MVA\_HeV-G-infizierten Cef-Zellen.** Kontrolle der Intaktheit und Stabilität des MVA-Virusgenoms mittels der spezifischen Oligonukleotide I-5'/I-3' bis VI-5'/VI-3'. 1,8%-Agarose-Gel.

DelI-VI-PCR HeVsG

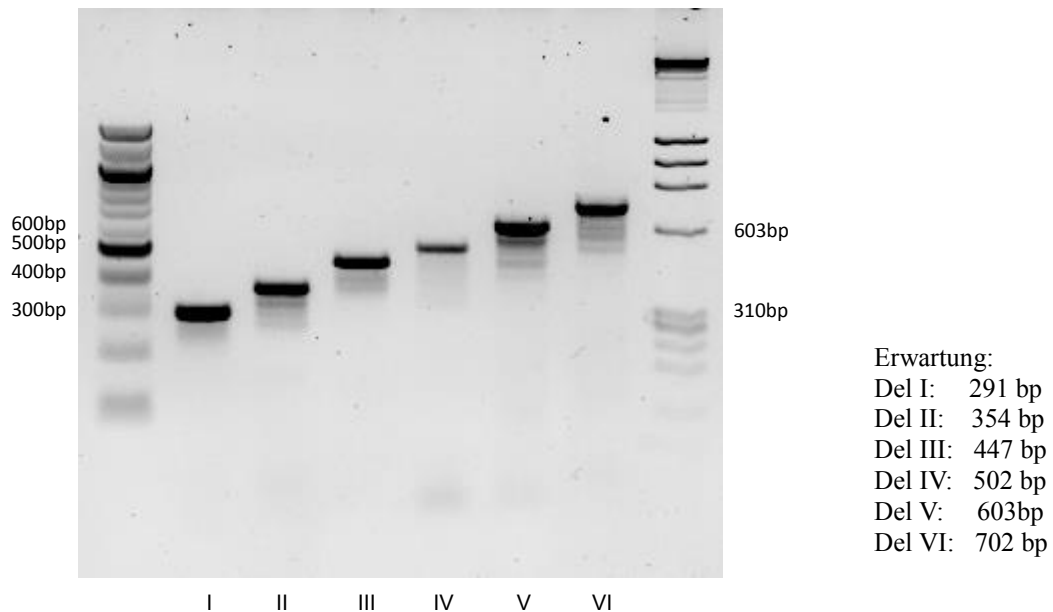


Abbildung 19: **PCR-Analyse nach DNA-Gewinnung von mit MVA\_HeV-sG-infizierten Cef-Zellen.** Kontrolle der Intaktheit und Stabilität des MVA-Virusgenoms mittels der spezifischen Oligonukleotide I-5'/I-3' bis VI-5'/VI-3'. 1,8%-Agarose-Gel.

In den Abbildungen 19 und 20 ist ersichtlich, dass die PCR-Produkte aller sechs Deletionsstellen der Konstrukte MVA\_HeV-G und MVA\_HeV-sG die korrekten Bandengrößen aufwiesen.

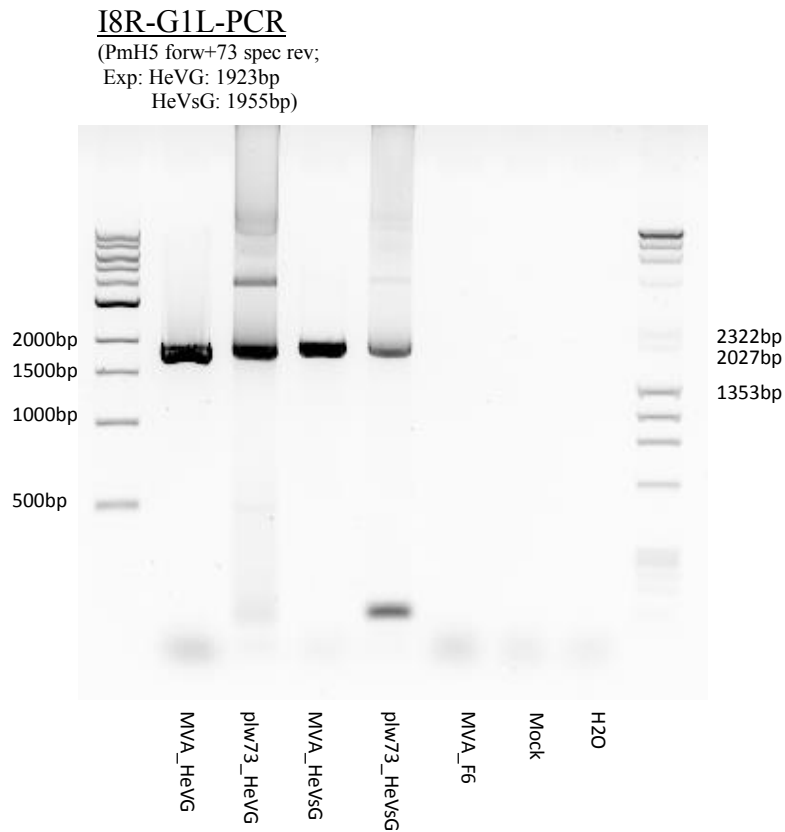


Abbildung 20: **PCR-Analyse nach DNA-Gewinnung von Cef-Zellen infiziert mit den rekombinanten Viren MVA\_HeV-G und MVA\_HeV-sG sowie dem Wildtypvirus MVA\_F6.** Insertkontrolle des Zielgens mittels der spezifischen Oligonukleotide PmH5 forward/73 spec reverse der rekombinanten Viren, deren Vektorplasmide plw73\_HeV-G und plw73\_HeV-sG und des Wildtypvirus MVA\_F6. Erwartete Bandengrößen: MVA\_HeV-G: 1923bp, MVA\_HeV-sG: 1955bp. 1%-Agarose-Gel.

Die Überprüfung der korrekten Lokalisation und der Stabilität der Fremdgeninsertion in der Insertionsstelle I8R-G1L für die Konstrukte MVA\_HeV-G und MVA\_HeV-sG ergab die erwarteten Bandengrößen 1923bp und 1955bp.

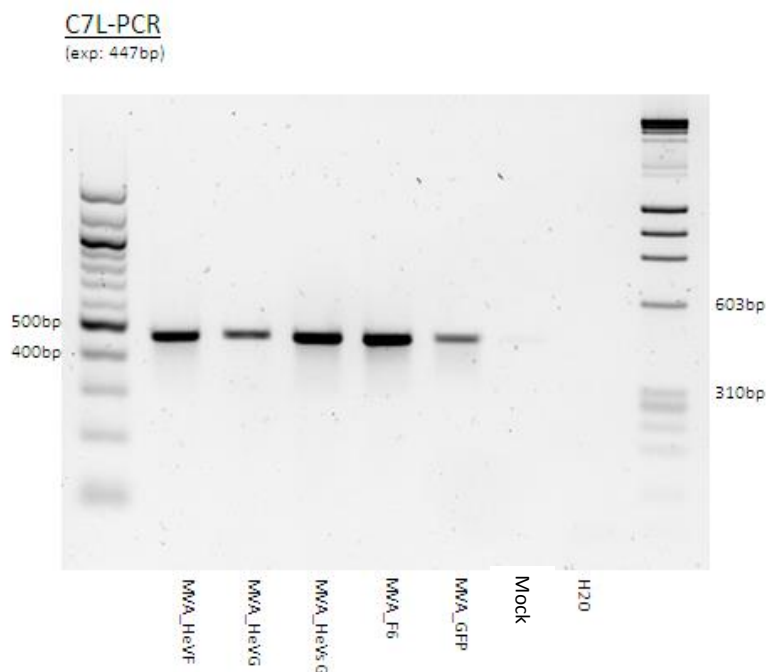


Abbildung 21: PCR-Analyse nach DNA-Gewinnung von Cef-Zellen infiziert mit den rekombinanten MVA-Viren, MVA\_F6 und MVA\_GFP. Kontrolle der Intaktheit und Stabilität des MVA-Virusgenoms mittels der spezifischen Oligonukleotide C7L-for/C7L-rev. Erwartete Bandengröße: 447bp. 1,8%-Agarose-Gel.

Der Nachweis der Genomintaktheit in Bezug auf das C7L-Gen wurde für alle drei Konstrukte erbracht, die DNA-Bande erschien auf der zu erwartenden Höhe von 447bp.

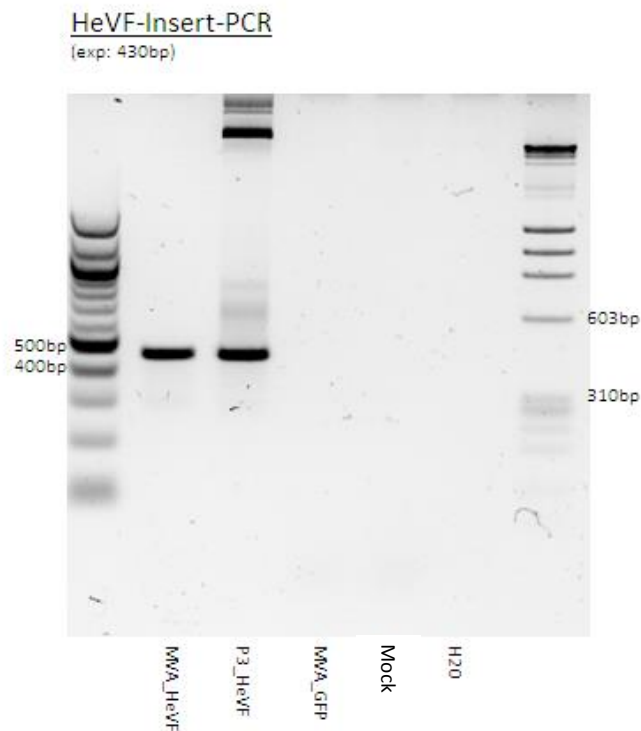


Abbildung 22: PCR-Analyse nach DNA-Gewinnung von mit MVA\_HeV-F infizierten Cef-Zellen. Insertkontrolle des Zielgens mittels der spezifischen Oligonukleotide HeV-F-Insert for/HeV-F-Insert rev des rekombinanten Virus, des Vektorplasmids p3\_HeV-F und des Wildtypvirus MVA\_GFP. Erwartete Bandengröße: 430bp. 1,8%-Agarose-Gel.

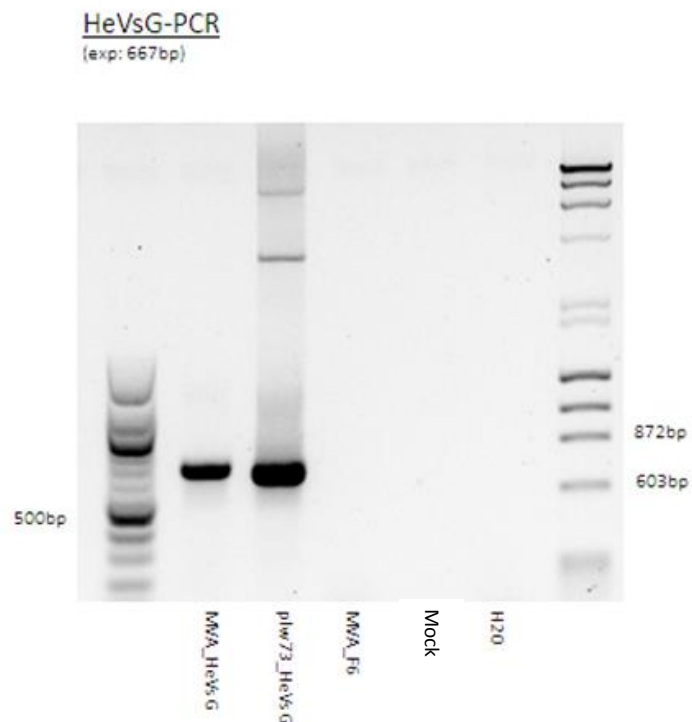


Abbildung 23: **PCR-Analyse nach DNA-Gewinnung von mit MVA\_HeV-sG infizierten Cef-Zellen.** Insertkontrolle des Zielgens mittels der spezifischen Oligonukleotide HeV-sG-2 for/HeV-sG-2 rev des rekombinanten Virus, des Vektorplasmids plw73\_HeV-sG und des Wildtypvirus MVA\_F6. Erwartete Bandengröße: 667bp. 1,8%-Agarose-Gel.

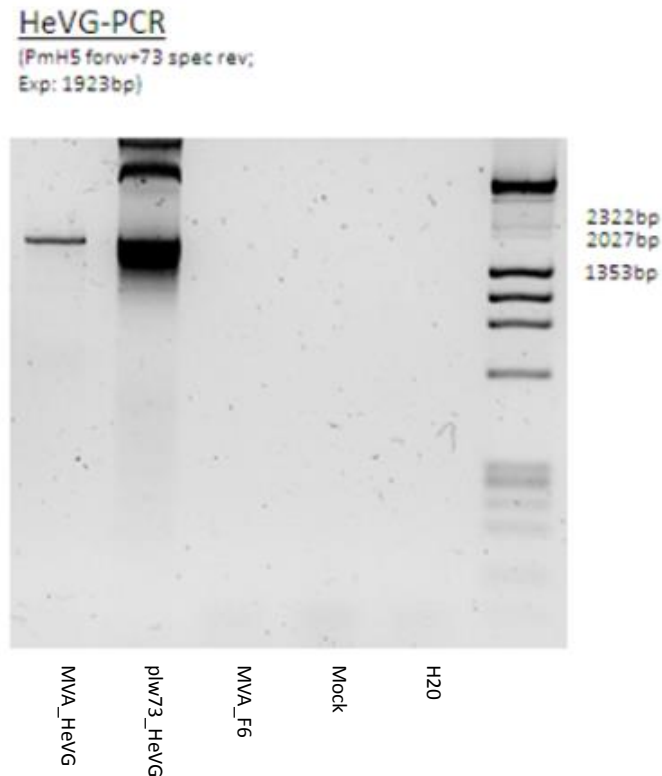


Abbildung 24: **PCR-Analyse nach DNA-Gewinnung von mit MVA\_HeV-G infizierten Cef-Zellen.** Insertkontrolle des Zielgens mittels der spezifischen Oligonukleotide PmH5 forward/73 spec reverse des rekombinanten Virus, des Vektorplasmids plw73\_HeV-G und des Wildtypvirus MVA\_F6. Erwartete Bandengröße: 1923bp. 1%-Agarose-Gel.

In den Abbildungen 23, 24 und 25 sind die Ergebnisse der Untersuchungen auf die Anwesenheit der inserierten Zielgene zu sehen. Für die Konstrukte MVA\_HeV-F und MVA\_HeV-sG wurden spezifische Insertprimer generiert, die ausschließlich an die spezifische Hendra-DNA binden; bei beiden stellten sich die erwarteten Banden bei der jeweiligen Größe ein (430 und 667bp). Die PCR-Analyse viraler DNA des rekombinanten Virus MVA\_HeV-G diente ebenso zur Kontrolle der Fremdgeninsertion im MVA-Genom. Die Verwendung von spezifischen Oligonukleotid-Primern für die I8R-G1L-Insertionsstelle erlaubte die Amplifikation von 1923bp großen DNA-Fragmenten. Die Größe dieser Bande entspricht dem erwarteten Molekulargewicht der inserierten Fremdgenesequenz.

### 3. Wachstumsanalysen auf verschiedenen Zelllinien

Die Entnahme von Proben zu den Zeitpunkten 0h, 4h, 12h, 24h und 48h ermöglichte den Nachweis einer produktiven Virusvermehrung über Rücktitration der Menge an infektiösen Viren. Die Durchführung von Infektionen mit einer MOI von 0,05 diente der Kontrolle des Wachstums der Viren über mehrere Vermehrungszyklen hinweg. In dieser sogenannten „Mehrstufen-Wachstumsanalyse“ fungierten Cef-Zellen wegen ihrer Eigenschaft als eine der wenigen, für die Replikation des MVA-Virus noch permissiven Zelllinien als wichtiges Instrument für den Beleg des unveränderten Wachstumsverhaltens der rekombinanten Viren und deren Vermehrungskapazität im Vergleich zu nicht-rekombinanten MVA.

Um die im Gegensatz dazu grundsätzlich abortiv verlaufende Replikation in Säugerzelllinien des Modified Vacciniavirus Ankara auch für die konstruierten Vakzinekandidaten nachzuweisen, empfahl es sich, das Wachstumsverhalten auf vermeintlich nicht-permissiven Zellen zu untersuchen; hierfür wurden je eine equine und eine humane Zelllinie als Kontrollsysteme ausgewählt.

Auf permissiven Hühnerembryofibroblasten (Abbildung 25) lassen sich das Wachstum der beiden Konstrukte MVA\_HeV-F und MVA\_HeV-sG mit dem des Wildtyps MVA\_F6 sehr gut vergleichen, beginnend mit einem Ausgangstiter von  $10^3$  pfu/ml steigerte sich die Virusmenge über einen Zeitraum von 48h zu einem Titer von  $10^7$  pfu/ml (Steigerung um vier Zehnerpotenzen). MVA\_HeV-G dagegen wies einen Ausgangstiter von  $10^3$  pfu/ml auf, vermehrte sich über den gleichen Zeitraum nur mit einem Anstieg auf  $10^4$  pfu/ml und zeigte somit eine deutlich reduzierte Wachstumskapazität (Anstieg des Titers nur um eine Zehnerpotenz).

Auf Efb- und HeLa-Zellen konnte weder bei den drei rekombinanten Viren noch bei dem Wildtyp MVA\_F6 eine Steigerung der Virustiter beobachtet werden. Die zum Zeitpunkt der Inkubation geernteten Proben enthielten einen Infektionstiter von  $10^3$ -  $10^4$  pfu/ml Virus. Die Virusmenge persistierte über den gesamten Untersuchungszeitraum bei der initialen Infektionsdosis. Ein Unterschied im Wachstumsverhalten zwischen den vier untersuchten Viren konnte nicht festgestellt werden.

Bei allen Zelllinien ist zum Zeitpunkt 4h für alle rekombinanten Viren und auch den Wildtyp ein deutlicher Titerabfall zu verzeichnen.

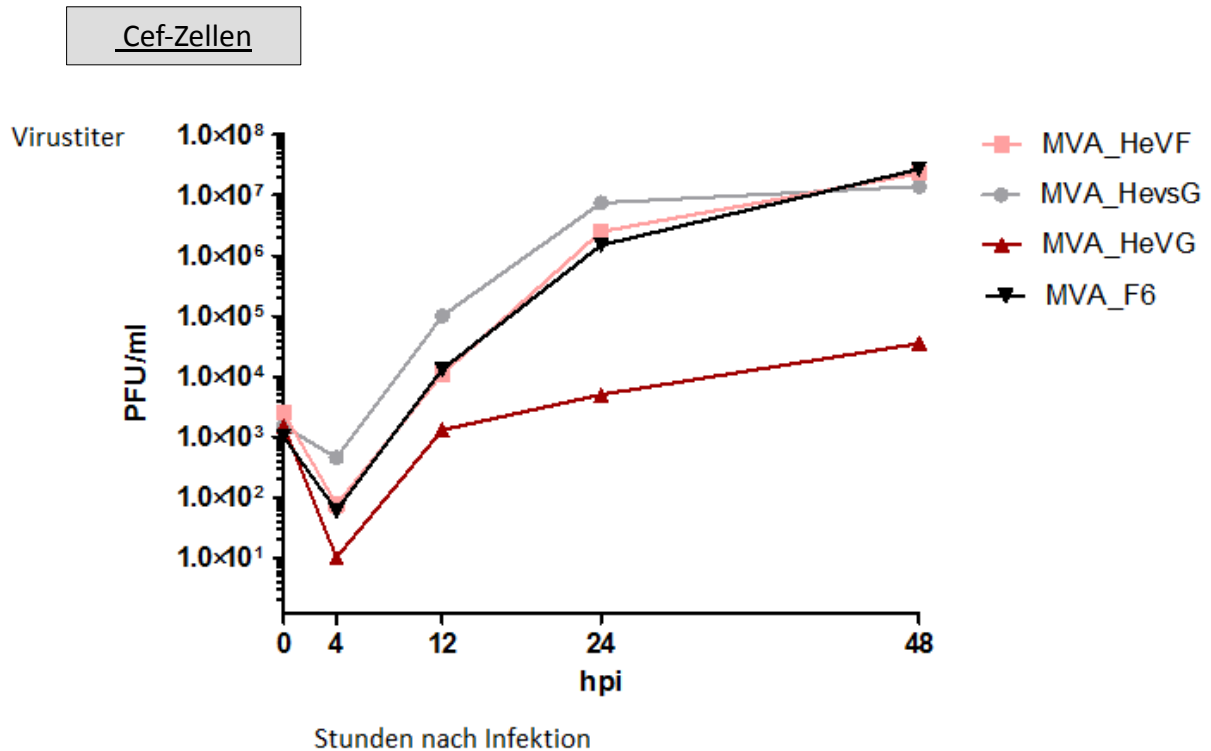


Abbildung 25: Mehrstufen-Wachstumsanalyse der drei rekombinanten Viren MVA\_HeV-F, MVA\_HeV-G und MVA\_HeV-sG sowie des Wildtyps MVA\_F6 auf der Zelllinie Cef. (Moi 0,05. Zeitpunkte 0, 4, 12, 24, 48 Stunden nach der Infektion. PFU: plaque forming unit)

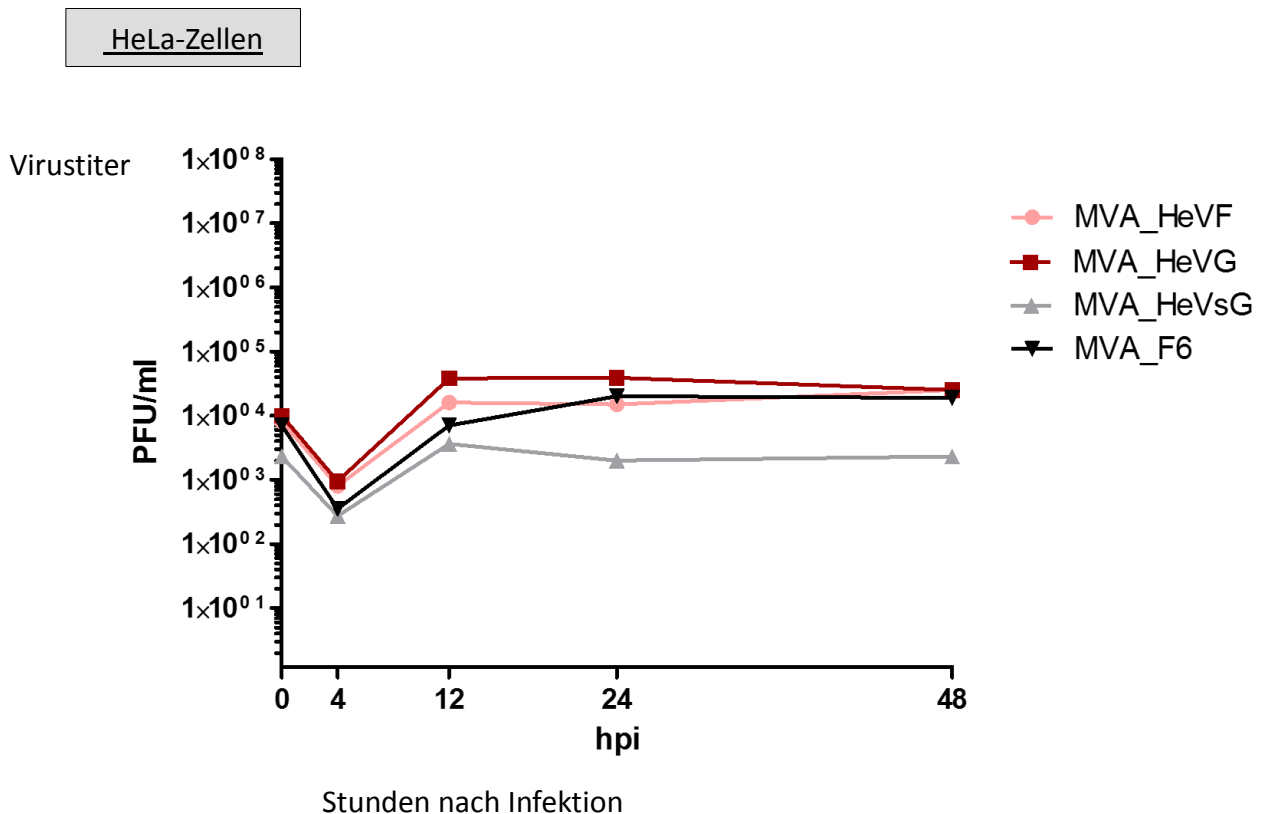


Abbildung 26: Mehrstufen-Wachstumsanalyse der drei rekombinanten Viren MVA\_HeV-F, MVA\_HeV-G und MVA\_HeV-sG sowie des Wildtyps MVA\_F6 auf der Zelllinie HeLa. (Moi 0,05. Zeitpunkte 0, 4, 12, 24, 48 Stunden nach der Infektion. PFU: plaque forming unit)

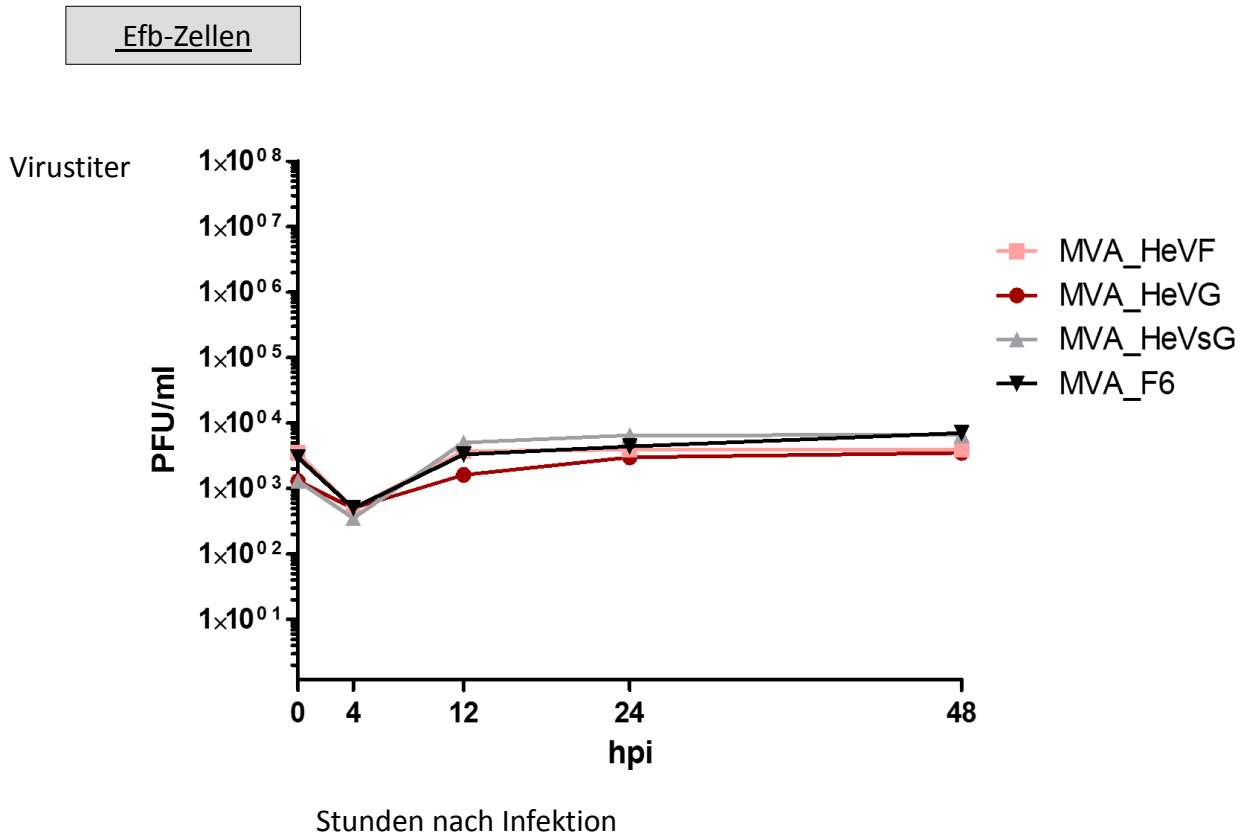


Abbildung 27: Mehrstufen-Wachstumsanalyse der drei rekombinanten Viren MVA\_HeV-F, MVA\_HeV-G und MVA\_HeV-sG sowie des Wildtyps MVA\_F6 auf der Zelllinie Equine Fibroblasten. (Moi 0,05. Zeitpunkte 0, 4, 12, 24, 48 Stunden nach der Infektion. PFU: plaque forming unit)

#### 4. Analyse der rekombinanten Proteine

Die Untersuchung der Fähigkeit der rekombinanten Viren, die Proteine der inserierten Gene im MVA-Lebenszyklus zu synthetisieren, erfolgte im Western blot-Verfahren unter Verwendung spezifischer, polyklonaler HeV-Antikörper ( $\alpha$ HeV-F und  $\alpha$ HeV-G). Die Gewinnung von Zelllysaten aus Cef-, Efb- und HeLa-Zellen erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion (0h, 6h, 12h, 24h, 48h). Diese Methode bot die Möglichkeit, zum einen Schlussfolgerungen über die generelle Expression Hendra-spezifischer Proteine zu treffen und zum anderen das Vermögen der rekombinanten Viren zu untersuchen, die Fremdproteine in ihrer Quantität über den Zeitraum des Experiments hinweg zu steigern.

Zum Nachweis äquivalenter Proteinmengen der Einzelproben im Western blot-Verfahren wurden beta-Actin-Kontrollen durchgeführt; hierbei handelt es sich um ein Strukturprotein, das bei jeder eukaryotischen Zelle vorliegt.



## 4.1 Cef-Zellen

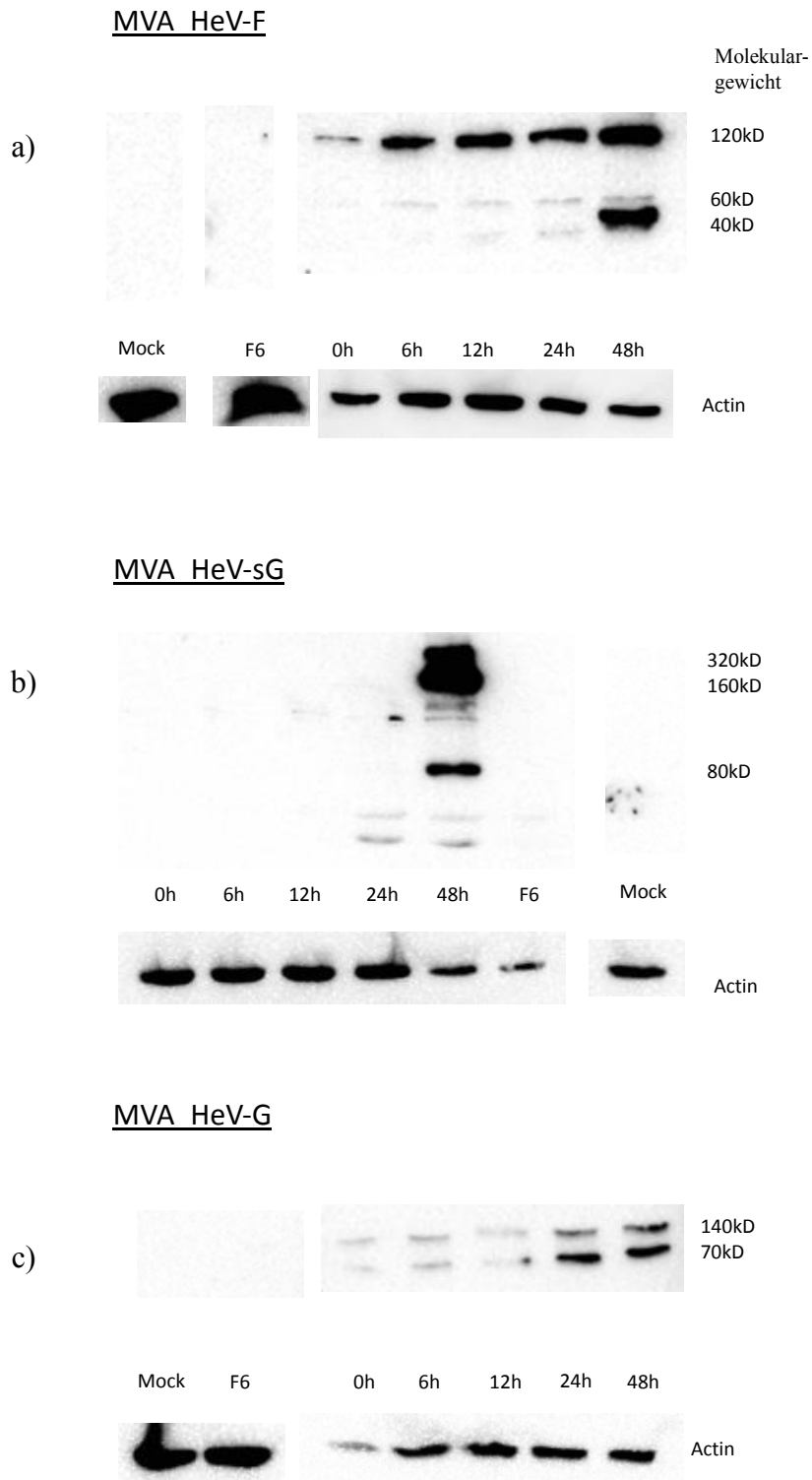


Abbildung 28: **Western blot-Untersuchung von rekombinanten HeV-Proteinen.**

Zelllysate von Cef infiziert mit rekombinanten MVA\_HeV-F (a), -sG (b), -G (c) wurden im 10% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt, geblottet und mit polyklonalen Kaninchen-Antikörpern beprobt. Lysate aus nicht-infizierten Zellen (Mock) und Cef infiziert mit nicht rekombinatem MVA (F6) dienten als Kontrolle.

Die Abbildung 28 zeigt die Proteinexpression der verschiedenen Konstrukte auf Cef-Zellen über einen Zeitraum von 48h.

Die mit dem rekombinanten Virus MVA\_HeV-F infizierten Cef-Zellen produzierten erstmals nach 6h mit spezifischen  $\alpha$ HeV-F-Antikörpern nachweisbares Protein (Abb. 28a). Auf der Nitrozellulose-Membran konnten spezifische Banden der Größen 40, 60 und 120kDa detektiert werden. Während die Intensität der 60kDa- Proteinbande gleich blieb, verzeichneten sie bei den 40kDa- und 120kDa-großen Polypeptidbanden einen deutlichen Zuwachs bis zum Zeitpunkt 48h nach der Infektion.

Der spezifische Proteinnachweis des Hendra-G-Proteins bei mit MVA\_HeV-sG infizierten Zellsätzen gelang ab 12h nach der Infektion und bis zum Zeitpunkt 48h konnte eine substantielle Steigerung der Proteinmenge festgestellt werden. Banden mit den Molekulargewichten 80, 160 und 320kDa waren deutlich nachweisbar (Abb. 28b).

Nach Infektion mit dem rekombinanten Virus MVA\_HeV-G konnte die Synthese des Hendra-spezifischen Glykoproteins ab dem 24h-Zeitpunkt im Western blot nachgewiesen werden; die Größe der immungefärbten Proteinbanden entsprach einem Molekulargewicht von 70 und 140kDa (Abb. 28c).

## 4.2 HeLa-Zellen

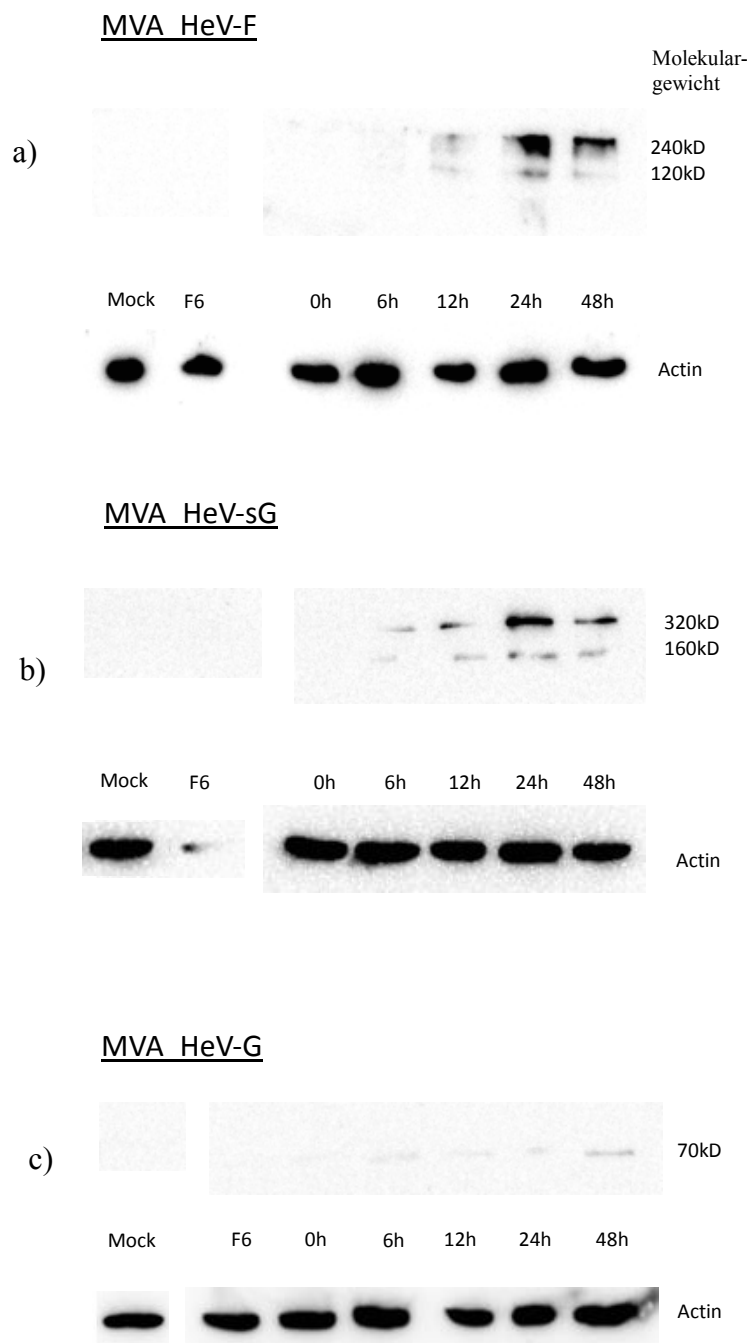


Abbildung 29: **Western blot-Untersuchung von rekombinanten HeV-Proteinen.**

Zelllysate von HeLa infiziert mit rekombinanten MVA\_HeV-F (a), -sG (b), -G (c) wurden im 10% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt, geblottet und mit polyklonalen Kaninchen-Antikörpern beprobt. Lysate aus nicht-infizierten Zellen (Mock) und HeLa infiziert mit nicht rekombinatem MVA (F6) dienen als Kontrolle.

In Abbildung 29 wurde die spezifische Hendra-Virus-Proteinexpression in infizierten HeLa-Zellen nachgewiesen.

In Abbildung 29 a) waren die Zellen mit dem rekombinanten Virus MVA\_HeV-F versetzt worden; nach erfolgter Probennahme und Prozessierung der Zelllysate konnte im Western blot ab dem 12h-Zeitpunkt spezifisches Hendra-F-Protein mit einem Molekulargewicht von 120 und 240kDa nachgewiesen werden. Eine deutliche Intensitätssteigerung der 240kDa großen Polypeptidbande war ab 24h nach Infektion zu erkennen.

Das sG-Protein (Abb. 29b) konnte ab dem 6h-Zeitpunkt unter Zuhilfenahme des spezifischen  $\alpha$ HeV-G-Antikörpers detektiert werden. Es zeigten sich G-spezifische Proteinbanden eines Molekulargewichts von 160 und 320kDa, wobei nach 24h eine Steigerung der Proteinmenge auf Höhe der 320kDa- Bande sichtbar wurde.

Bei mit MVA\_HeV-G infizierten HeLa-Zellen war im Zelllysate, das 6h nach der Infektion entnommen wurde, und von diesem Zeitpunkt an weiterhin eine schwache Hendra-G-spezifische Bande (70kDa) zu sehen (Abb. 29c).

## 4.3 Equine Fibroblasten

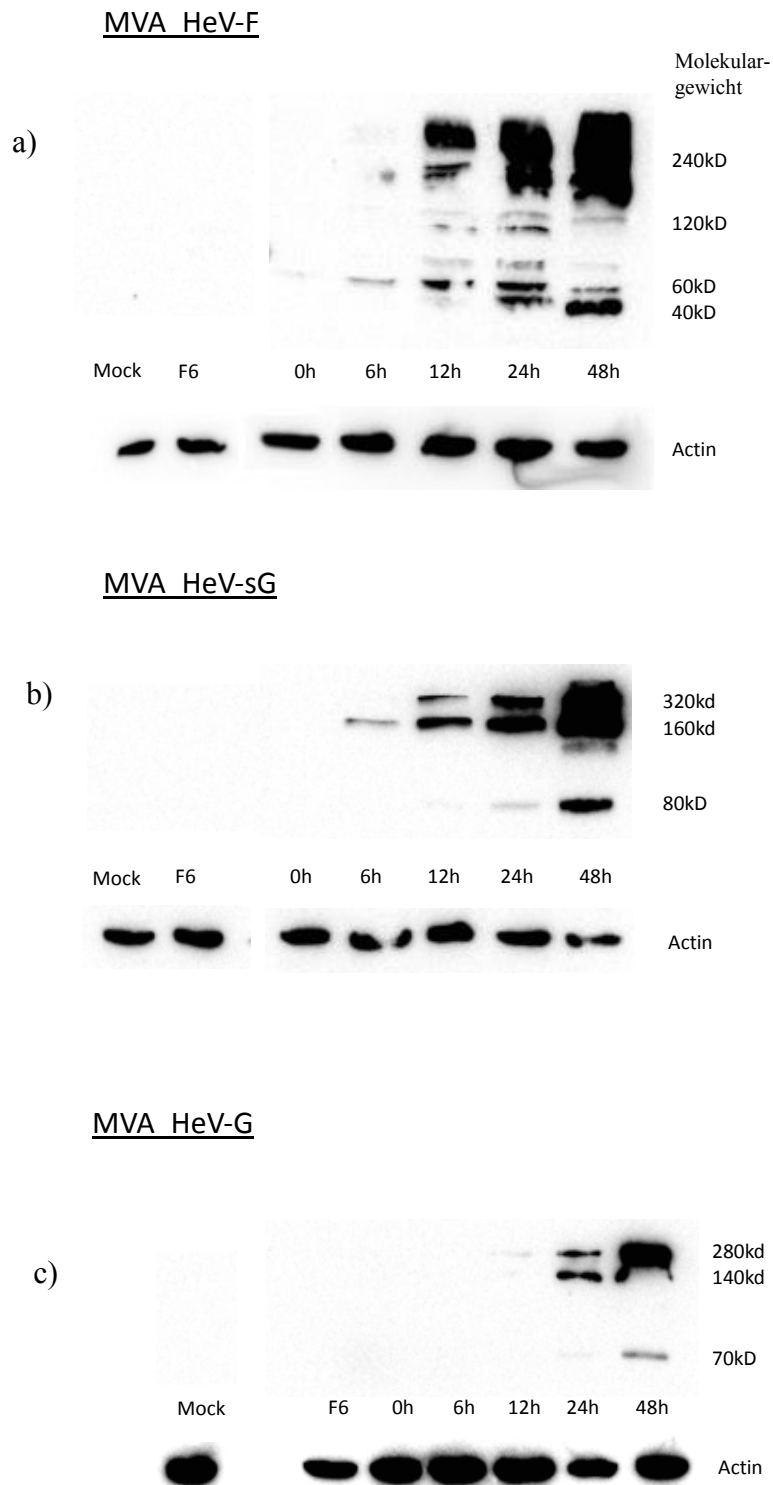


Abbildung 30: **Western blot-Untersuchung von rekombinanten HeV-Proteinen.**

Zelllysate von Efb infiziert mit rekombinanten MVA\_HeV-F (a), -sG (b), -G (c) wurden im 10% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt, geblottet und mit polyklonalen Kaninchen-Antikörpern beprobt. Lysate aus nicht-infizierten Zellen (Mock) und Efb infiziert mit nicht rekombinatem MVA (F6) dienten als Kontrolle.

Die Abbildung 30 zeigt die Proteinexpression auf Efb-Zellen.

Die Synthese des Hendra-F-Proteins durch die Efb-Zellen konnte erstmals ab 6h bei einem Molekulargewicht von 60kDa, ab 12h zusätzlich auch bei 120 und 240kDa durch die immungefärbten Proteinbanden nachgewiesen werden. Ab 24h zeigte sich eine weitere Bande bei 40kDa und ab 48h wurde eine wesentliche Zunahme der spezifischen Proteinbanden bei 40 und bei 240kDa deutlich (Abb. 30a).

Die mit MVA\_HeV-sG infizierten Zellen produzierten nachweislich spezifisches Protein einer Größe von 160kDa ab 6h. Ab dem 12h-Zeitpunkt konnten durch die spezifischen  $\alpha$ HeV-G-Antikörper auf der Membran eine weitere, sehr dünne Polypeptidbande von 80kDa-Größe und eine 320kDa große Proteinbande detektiert werden; die 160kDa große Bande zeichnete sich noch deutlicher ab im Vergleich zu Proben früherer Zeitpunkte.

Nach 24h hatte sich die Intensität der 160 und 320kDa starken Banden gesteigert und erreichte ihr Maximum nach 48h. Zu diesem Zeitpunkt verzeichnete auch die 80kDa große Bande einen deutlichen Zuwachs (Abb. 30b).

Das G-Protein von MVA\_HeV-G war ab dem 12h-Zeitpunkt bei einem Molekulargewicht von 280kDa durch den  $\alpha$ HeV-G-Antikörper schwach nachweisbar. Nach 24h wurde eine weitere 140kDa große Bande sichtbar, insgesamt zeigte sich das Signal beider Banden verstärkt.

Zum Zeitpunkt 48h nach Infektion war ein Proteinnachweis bei 70kDa sichtbar, die 280kDa-Bande verzeichnete eine Intensitätssteigerung (Abb. 30c).

# V Diskussion

## 1. Generierung der Vakzinekonstrukte

Impfungen sind unerlässlich. Um weite Teile der Bevölkerung oder des Tierbestands insbesondere gegen Viruserkrankungen zu schützen, gibt es keine adäquate Alternative. Unbestrittene Vorteile der Vakzination sind die Versorgung einer breiten Masse an Personen oder Tieren und ihr präventiver Charakter.

Gegen einen Einsatz von Impfstoffen kann das mögliche Entstehen von Impfkomplicationen vorgebracht werden. Impfstoffe oder deren Adjuvantien sind, wie jedes Medikament, grundsätzlich nicht frei von Begleiterscheinungen; es gibt eine Reihe von Vakzinen, die zum Teil schwere oder sogar lebensbedrohliche Nebenwirkungen hervorgerufen haben. Beispiele hierfür sind die Schluckimpfung gegen Kinderlähmung (Impfpoliomyelitis), die FSME-Vakzine TicoVac (Fieberkrämpfe), der BVD-Impfstoff PregSure (Bovine Neonatale Panzytopenie), die Influenza-Vakzine Pandemrix (Narcolepsie) und die ursprüngliche Pockenimpfung durch das Vaccinia-Virus (v.a. Enzephalitis) (Marth E et al. 2004, Gilbert S et al. 2013, Dunn G et al. 2015, Bell C et al. 2015, Saariaho A et al. 2015).

MVA erweist sich hier in vielerlei Hinsicht als idealer Kandidat für die Entwicklung einer Vektorvakzine; die Immunogenität des Virus ist erhalten und bis heute sind bei der Anwendung bei Mensch und Tier keine schwerwiegenden Nebenwirkungen aufgetreten (Meyer H et al. 1991, Bender B et al. 1996, Mayr A. 2003, Gherardi M et al. 2004, Amara R et al. 2005, Gasteiger G et al. 2007, Goepfert P et al. 2011, de Barra E et al. 2014, Kreijtz J et al. 2014, Hayton E et al. 2014).

In dieser Arbeit wurden drei rekombinante MVA\_HeV-Konstrukte virologisch und molekularbiologisch auf ihre Eignung als Vakzinekandidaten für Mensch und Tier geprüft.

Zur Generierung der rekombinanten Vakzinekandidaten sind grundsätzliche Überlegungen nötig; zunächst muss eine Auswahl der in das MVA-Genom zu inserierenden Antigene getroffen werden. Hierbei empfiehlt es sich bei Paramyxoviren die Sequenzen des Fusions- und Attachmentproteins zu verwenden, da diese als Oberflächenproteine in der Regel das Ziel neutralisierender Antikörper sind.

In der Pathogenese entsteht der erste Kontakt zwischen Wirt und Virus im Zusammenspiel dieser beiden Proteine, die durch Binden an den Rezeptor der Zelle (Attachment- oder G-Protein) und Fusion der Virus- mit der Zellmembran (Fusionsprotein) den initialen Schritt der Infektion darstellen (Bossart K et al. 2005 und 2012, Lamb R et al. 2007, Hashiguchi T et al. 2011, Broder C et al. 2013).

Die Entscheidung, ein weiteres Konstrukt mit einer löslichen HeV-G-Antigenvariante zu erstellen, begründet sich auf den Erfahrungen der Arbeitsgruppe um Christopher C. Broder, die diese HeV-sG-Form (soluble G) herstellte, um den Mechanismus der Bindung an die Wirtszelle zu charakterisieren und den dafür verantwortlichen Rezeptor ausfindig zu machen. Hierfür wurden der zytoplasmatische Anteil und die Transmembrandomäne des Proteins entfernt. Das sG-Protein band weiterhin an den Wirtszellrezeptor, führte jedoch nicht zur Synzytienbildung und rief eine polyklonale Antikörperantwort hervor. Es kam zu einer potenten Virusneutralisierung (Bossart K et al. 2005). In mehreren klinischen Versuchen und auch in serologischen Tests bei natürlich infizierten Tieren wurde diese Antigenvariante erprobt und erwies sich als äußerst effizient (Mungall B et al. 2006, McEachern J et al. 2008, Pallister J et al. 2011, Bossart K et al. 2007 und 2012, Mire C et al. 2014).

Weiterhin gibt es die Möglichkeit, die Menge der zu exprimierenden Proteine zu regulieren. Vaccinia-Viren führen strangaufwärts der codierenden Genabschnitte Sequenzen, die den Zeitpunkt der Transkription (früh, intermediär, spät; Sutter G et al. 1992, Broyles S. 2003) und so auch die Menge der zu produzierenden Proteine bestimmen, sogenannte Promotoren. Sie werden ausschließlich vom viruseigenen Transkriptasekomplex erkannt. Früh exprimierte Proteine erregen hauptsächlich T-Zell-Immunantwort, wohingegen für die Antikörperreaktion lang andauernde Antigenproduktion einer soliden Immunantwort förderlich ist und somit Promotoren gewählt werden, die die jeweilige mRNA-Translation über den gesamten molekularen Lebenszyklus des Virus gewährleisten (Mackett M et al. 1984, Cochran M et al. 1985, Davison A et al. 1989, Bronte V et al. 1997, Moss B et al. 2002).

Bei unseren MVA\_HeV-Konstrukten wurde für die HeV-Genexpression der Promotor PmH5 gewählt, ein synthetisch erstelltes Äquivalent zur Grundlage des originären Promotors des VacV-ORF H5R, der eine starke frühe und auch moderate späte Transkriptionsaktivität aufweist (Wyatt L et al. 1996 und 2008, Chakrabarti S et al. 1997, Wang Z et al. 2010).

Die Herstellung der rekombinanten Viren erfolgt durch homologe Rekombination; bei diesem Prozess findet ein Austausch der DNA zwischen einem Vektorplasmid und dem viralen Genom statt. Dieser Transfer verläuft zielgerichtet anhand von flankierenden Sequenzen im Plasmid, die identisch mit denen in der Insertions- bzw Deletionsstelle im MVA-Virus sind. Zwischen diesen flankierenden MVA-DNA-Sequenzen im Vektorplasmid liegt die zu inserierende Fremd-DNA. Für das rekombinante MVA\_HeV-F-Konstrukt wurde der Vektor pIIIH5redK1L verwendet, der eine homologe Rekombination mit der Deletionsstelle III ermöglicht (Kremer M et al. 2012).

Die DNA-Sequenzen für die Proteine HeV-G und HeV-sG wurden über das Plasmid pLW73 in die Insertionsstelle I8R-G1L transferiert. Es handelt sich hierbei um zwei essentielle Gene, die in gegensätzlicher Richtung abgelesen werden und ohne deren vollständige und korrekte Transkription und Translation das Virus nicht vermehrungsfähig ist. So wird das Risiko der Amplifizierung eines



Klons, der ein fehlerhaftes Insert beinhaltet, minimiert, da korrekte und exakte Arbeit der DNA-Polymerase an dieser hochkonservierten Stelle des Genoms Voraussetzung für die Existenz der Viren ist (Wyatt L et al. 2009).

Die unterschiedlichen Insertionslokalisationen der rekombinanten Viren mit der G-Zielsequenz und des MVA\_HeV-F-Virus erlauben bei guter Funktionalität der Vakzinekandidaten später auf einfache Art und Weise einen MVA-Vektorimpfstoff herstellen zu können, der beide Antigene gleichzeitig produziert, einen sogenannten Kombinationsimpfstoff.

## **2. Bewertung der Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen**

### **2.1 Intaktheit des Genoms**

Zunächst wurden alle drei Vakzinekandidaten auf molekularbiologischer Ebene untersucht. Durch Polymerase-Kettenreaktion-Versuche wurde die DNA der inserierten Gene auf Anwesenheit, Vollständigkeit und Intaktheit geprüft. Hier konnte für alle drei Konstrukte das Gelingen der stabilen Insertion der Hendra-Virus-spezifischen Gensequenzen bestätigt werden. Bei allen Konstrukten entsprach die produzierte Bande dem Amplifikat des Vektorplasmids, von dem die jeweilige Gensequenz stammte (MVA\_HeV-F: 430bp, MVA\_HeV-sG: 667bp, MVA\_HeV-G: 1923bp).

Um sicherzustellen, dass die grundsätzliche Beschaffenheit der rekombinanten Viren und deren Eigenschaften erhalten sind, wurden auch mittels PCR-Technologie die Deletionsstellen, die Insertionsstelle I8R-G1L und das host-range-Gen C7L überprüft. C7L eignet sich als Indikator für genomische Rearrangements; das sind Ereignisse, bei denen das Genom Veränderungen wie Deletionen, Duplikationen, Insertionen, Inversionen oder Translokationen im Zuge der homologen Rekombination und der Viruspassagierungen danach unterliegen kann (Chen J. 2011). Um derartige Vorgänge auszuschließen, wird eine C7L-PCR durchgeführt, da es durch seine Position in den terminalen Sequenzwiederholungen des Genoms für Rearrangements prädestiniert liegt. Das C7L-Gen ist ein host range-gene, das die Apoptose der Zellen unterbindet, und zudem essentiell für die späte Proteinexpression (Najera J et al. 2006, Backes S et al. 2010).

Für alle drei Vektorviren konnte in jeder PCR einwandfrei nachgewiesen werden, dass die Insertionen an den jeweils dafür gewählten Stellen im Genom korrekt erfolgt waren. Zusätzlich kann von einer genomischen Stabilität und Intaktheit der rekombinanten Viren ausgegangen werden, da bei Überprüfung der Deletions- und Insertionsstellen und des C7L-Genorts im MVA-Genom nur die erwarteten genetischen Veränderungen festgestellt werden konnten.

## 2.2 Vermehrungsfähigkeit der rekombinanten Viren

Weiterhin wurde die Replikationsfähigkeit der rekombinanten Viren untersucht. Diese Eigenschaft ist für die Produktionsfähigkeit und Sicherheit eines zukünftigen Impfstoffes von großer Bedeutung. Das Wildtyp-MVA hat durch die vielen Passagierungen auf Hühnerembryofibroblasten sein Vermögen zur Replikation in Säugetierzellen verloren, einer der bedeutendsten Vorteile dieser Vektorvakzine (Mayr A et al. 1964, Mayr A et al. 1975, Drexler I et al. 1998, Blanchard T et al. 1998, Jacobs B et al. 2009).

Das Replikationsverhalten der rekombinanten Viren MVA\_HeV-F, -sG und -G wurde in Cef-Zellen, equinen Fibroblasten und humanen HeLa-Zellen im zeitlichen Verlauf über 48 Stunden in der sogenannten Mehrstufen-Wachstumsanalyse eruiert und dokumentiert, um einerseits zu zeigen, dass die rekombinanten Viren in ihren Wachstumseigenschaften mit denen des Wildtyps vergleichbar sind und zum Anderen nachweisen zu können, dass die Vermehrungsdefizienz auf Säugetierzelllinien erhalten geblieben und so von einer sicheren Anwendung in diesen Spezies ausgegangen werden kann (Staib C et al. 2004).

Equine und humane Zelllinien erschienen besonders geeignet, da diese die Zielspezies für den späteren Impfstoff repräsentieren. Cef-Zellen sind die wichtigste Zellkultur für die Produktion des Vakzinevirus MVA, da sich das Virus in dieser Zelllinie am besten vermehrt und so die für die Generierung eines Impfstoffes nötigen Virustiter erreicht werden können. Die Überprüfung der Wachstumskapazität der rekombinanten Viren in dieser Zellkultur ist daher unerlässlich.

Im Folgenden wird das Wachstumsverhalten der Viren einzeln besprochen.

Das Konstrukt MVA\_HeV-F verhielt sich auf der Hühnerzelllinie nahezu identisch zum Wildtyp MVA\_F6; es erfolgte ein Titeranstieg um vier Zehnerpotenzen, die Verlaufskurven der Titer der beiden Viren lassen sich nahezu übereinanderlegen.

Auch auf der humanen Zelllinie verhielt sich das rekombinante HeV-F-Virus dem Wildtypen sehr ähnlich; da es sich hierbei um Säugetierzellen und damit um nicht-permissives Gewebe für die MVA-Replikation handelt, erklärt sich das sich einstellende Titerplateau bei der initialen Infektionsdosis  $10^4$ .

Dasselbe Bild zeichnete sich auf der Pferdezelllinie Efb ab. Der Titer blieb bei MVA\_HeV-F und MVA\_F6 über die Dauer des Versuchs unverändert.

Für dieses Konstrukt konnte also das gewünschte abortive Replikationsverhalten in humanen und equinen Zellen bestätigt werden. Gleichzeitig war es wichtig nachweisen zu können, dass die Insertion der Zielgenesequenz das Replikationsvermögen des rekombinanten Virus auf Cef-Zellen nicht beeinträchtigt hatte.

Das Konstrukt MVA\_HeV-sG replizierte auf den Cef-Zellen in nämlicher Weise, eine Titersteigerung von vier Zehnerpotenzen war über die Versuchsdauer zu verzeichnen. Der Titeranstieg erfolgte sogar noch etwas rascher als bei MVA\_F6, die Titer beider Viren glichen sich jedoch gegen Ende des Versuchs an.

Sowohl auf humaner als auch auf equiner Zelle erfolgte keine feststellbare Replikation, die Titer blieben über die Dauer von 48 Stunden gleich.

Auch das Konstrukt mit der löslichen Hendra-G-Komponente stellte sich also sowohl dahingehend mit den gewünschten Eigenschaften dar, als auch in Bezug auf die Replikationsfähigkeit auf Cef-Zellen, ergo dessen Produktionsfähigkeit.

Das Konstrukt MVA\_HeV-G fiel dagegen deutlich gegenüber den in Cef-Zellen erreichten Titern des Wildtyps und der beiden anderen Vektorviren ab. Hier war nur ein Titeranstieg von einer Zehnerpotenz zu verzeichnen.

Das Verhalten auf equinen Fibroblasten war wie erwartet, es erfolgte keinerlei Titeranderung. Auf der humanen Zelllinie HeLa war ein geringfügiger Anstieg des Virustiters zu beobachten; das ist kein außergewöhnlicher Befund speziell in dieser Zelllinie, solche Ergebnisse wurden schon früher beobachtet (Meyer H et al. 1991, Carroll M et al. 1997, Drexler I et al. 1998, Wyatt L et al. 1998). Bei diesem Konstrukt zeigt sich also ein deutlicher Abfall der Vermehrungsfähigkeit auf der permissiven Zelllinie im Vergleich zum Wildtyp, vermutlich verursacht durch die Insertion der Fremdgensequenz. Man weiß, dass es Unverträglichkeiten zwischen inserierter DNA und Vektorvirus geben kann, gerade bei Oberflächenproteinen wie dem Glykoprotein, und so möglicherweise keine Vermehrung der rekombinanten Viren in ausreichendem Maße stattfindet. Das G-Protein stellt ein solches, potentiell schädliches Antigen dar, da es als Fremdglykoprotein mit der Funktion MVA-eigener Glykoproteine interferieren könnte.

Einige Faktoren sind bekannt, die die rekombinanten Viren dem Selektionsdruck gegenüber den Wildtypviren nicht standhalten lassen. Unter anderem steigen die Chancen, ein stabiles rekombinantes Virus zu erhalten, wenn man die Sequenzen für Transmembrandomäne und den zytoplasmatischen Anteil eines Oberflachenproteingens entfernt; auch das Expressionslevel des löslich-gewordenen Proteins ist für gewöhnlich höher. (Earl P et al. 1990, Wyatt L et al. 1996, 2008 und 2009, Cottingham M et al. 2013).

Diese Erkenntnisse bestätigen sich bei den Konstrukten MVA\_HeV-G und MVA\_HeV-sG. Durch die genetische Verkürzung um die entscheidenden Sequenzteile ist ein rekombinantes Konstrukt entstanden, das in seinem Wachstum dem des Wildtypen in Nichts nachsteht, wohingegen die vollständige Sequenz des Hendra-Glykoproteins das MVA-Virus offensichtlich in der Replikation

behindert.

Da so nicht davon auszugehen ist, dass ein ausreichend hoher Titer bei der Herstellung eines Virusstocks und so grundsätzlich die benötigte Virusmenge für einen Impfstoff generiert werden kann, ist auch fraglich, ob so jemals genügend Protein für eine zelluläre und humorale Immunantwort exprimiert werden wird.

Der bei allen Zelllinien zu beobachtende leichte Abfall der Virusmenge zum Zeitpunkt 4h erklärt sich über das Uncoating der MVA-Viren; zu dieser Zeit ist weniger oder kaum Virus nachweisbar (Joklik W. 1964, Woodson B. 1967, McDonald W et al. 1992).

### 2.3 Produktion rekombinanter HeV-Proteine

Schlussendlich wurden die drei rekombinanten Viren auf ihre Fähigkeit hin, die Fremd-Antigene in Proteine zu synthetisieren, untersucht. Auch dies wurde im Verlauf der Infektion überprüft, indem zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 6, 12, 24, 48 Stunden) Proben genommen wurden. Nur wenn das Antigen dem Immunsystem in ausreichender Menge und über einen längeren Zeitpunkt präsentiert wird, kann eine effektive Immunantwort entstehen (Wyatt L et al. 2008). MVA kann humorale und zelluläre Immunantwort erregen; die Aktivierung von CD8<sup>+</sup>-Zellen findet fast ausschließlich durch Proteine statt, die zu frühen Zeitpunkten der Replikation translatiert werden, wohingegen für eine Antikörper-Reaktion eine Antigenanwesenheit über einen längeren Zeitpunkt nötig ist (Mackett M et al. 1984, Cochran M et al. 1985, Davison A et al. 1989, Sutter G et al. 1994, Bronte V et al. 1997, Moss B et al. 2002, Jacobs B et al. 2009, Draper S et al. 2013).

Die Proteinproduktion vermittelt durch die drei Vakzinekandidaten wurde nach Infektion der Zellkulturen Cef, Efb und HeLa untersucht.

Das Hendra-Virus-Fusionsprotein wurde auf allen drei Zelllinien vom rekombinanten MVA\_HeV-F produziert und war mittels der polyklonalen  $\alpha$ HeV-F-Antikörper sehr gut zu detektieren. Mit Zunahme der Infektionszeit war ein deutlicher Anstieg der Proteinmenge mit steigender Tendenz zur Polymerbildung zu erkennen, ein zu erwartender Befund, da es sich bei dem Hendra-F-Protein um ein Typ I Membranprotein handelt. Die Transmembrandomänen verschiedener Paramyxovirus-F-Proteine assoziieren zu Trimeren (Bossart K et al. 2005).

Auf HeLa- und Efb-Zellen waren Proteine mit einem Molekulargewicht, das auf Hexamerbildung schließen lässt, zu sehen; es ist bekannt, dass sich die Fusionspeptide in lipidhaltiger Umgebung zu Hexameren zusammenlagern (Chang A et al. 2012).

Weiterhin sprechen die Befunde der Western blot-Untersuchung für eine Spaltung des F-Proteins in

die aktive, fusogene Form (Abb. 28a, 30a). Diese proteolytische Prozessierung geschieht nach der Faltung im Endoplasmatischen Retikulum in sekretorischen Vesikeln des trans-Golgi-Netzwerks;  $F_0$ , die inaktive Form, liegt bei 60kDa, wohingegen  $F_1$  bei 40kDa rangiert und  $F_2$  bei 20kDa (Bossart K et al. 2002 und 2005, Pager C et al. 2005 und 2006, Eaton B et al. 2006, Whitman S et al. 2007).

Auch nach Expression durch das Konstrukt MVA\_HeV-sG war ein lösliches Hendra-Glykoprotein gut detektierbar. Das jeweilige Molekulargewicht spricht wiederum für die Bildung von Dimeren und Tetrameren (160 und 320kDa), wie es dem natürlichen Verhalten der Typ II Membranproteine entspricht, und es konnte gezeigt werden, dass die Proteinmenge über die Zeit anwuchs (Plempner R et al. 2000, Takimoto T et al. 2002, Bossart K et al. 2005, Eaton B et al. 2006, Bowden T et al. 2010, Lee B et al. 2011, Broder C et al. 2012).

Im direkten Vergleich dazu steht das MVA\_HeV-G-Konstrukt, das deutlich weniger Protein und auch erst zu späteren Zeitpunkten produzierte. Nach Infektion von HeLa-Zellen mit MVA\_HeV-G konnten nur geringe Mengen an rekombinantem Protein festgestellt werden. Dies kann nicht einer möglichen Diskrepanz mit dem Antikörper zugeschrieben werden, da zwar keine Positivkontrolle zur Verfügung stand (Hendra-Viren sind BSL-4), jedoch über das MVA\_HeV-sG-Konstrukt nachgewiesen werden konnte, dass der Antikörper sehr wohl das Hendra-Glykoprotein erkennt. Auch hier konnte über das Molekulargewicht auf Dimerbildung bei 140kDa geschlossen werden. Das Hendra-G-Protein weist einen deutlich langsameren Prozessierungsweg durch die Zelle auf im Vergleich zu anderen Paramyxovirus-Attachmentproteinen, es benötigt mehr als zwei Stunden, um durch das Endoplasmatische Retikulum und in den Golgi-Apparat zu gelangen; das Hendra-F-Protein hingegen vollbringt diesen Weg in etwa 30 Minuten. Das Fusionsprotein ist auch länger stabil (ca 24h) als das Attachmentprotein, dessen Großteil bereits nach sechs Stunden degradiert und nach zwölf Stunden nahezu vollständig abgebaut ist (Whitman S et al. 2007).

Außerdem wurde nachgewiesen, dass die Fusionsavidität von der Menge der exprimierten Glykoproteine abhängt, ein für die Zelle schädlicher Prozess. Man weiß, dass Proteine, die einen schädigenden Effekt haben, einen selektiven Vorteil für MVA-Viren darstellen, die diese toxische Zielgenesequenz nicht aufgenommen oder durch zufällige Mutationen inaktiviert haben (Wyatt L et al. 2009).

Dies alles sind Gründe dafür, dass das ursprüngliche Hendra-G-Protein nur in geringer Menge hergestellt wird und/oder nicht deutlicher dargestellt werden kann, da es einem zu raschen Abbau unterliegt.

## 2.4 Bewertung der Gesamtheit der Ergebnisse

Die beiden Konstrukte MVA\_HeV-F und MVA\_HeV-sG haben sich in den bisherigen Tests als geeignete Vakzinekandidaten für Immunisierungen gegen das Hendra-Virus erwiesen. Das Wachstum gleicht dem des nicht-rekombinanten Virus, wurde also nicht vermindert durch die Manipulation und das Inserieren zusätzlicher genetischer Fremdinformation; zudem können so Virustiter produziert werden, die eine Impfstoffproduktion ermöglichen und ausreichende Antigen-Produktion gewährleisten.

Die Proteinexpression ist gegeben. Sowohl das Fusionsprotein als auch das lösliche Attachmentprotein kumulieren über die Zeit und verhalten sich in erwarteter Weise, was die Polymerbildung (F und G) und die Spaltung in die aktive Form (F) angeht (Bossart K et al. 2005, Pager C et al. 2005).

Das rekombinante MVA\_HeV-G-Virus verhält sich nicht den Anforderungen einer Vektorvakzine entsprechend.

Das Wachstum ist deutlich eingeschränkt auf aviärer Zelllinie, sodass es schwer ist, ausreichende Titer bei der Produktion eines Virusstocks zu erreichen.

Ähnlich problematisch stellt sich die Proteinproduktion dar. Hier zeichnet sich ein signifikanter Abfall an Quantität ab, auch im Vergleich zu den beiden anderen Konstrukten. Es ist jedoch bekannt, dass die Immunantwort direkt proportional zur Höhe des Expressionslevels der Antigene erfolgt (Wyatt L et al. 2008).

Die Arbeitsgruppe um Bernard Moss konnte zeigen, dass es zu genetischer Instabilität des MVA führen kann, wenn das inserierte Zielgen für Proteine codiert, die mit den Virus-eigenen Proteinen interferieren. So erhöht sich der Selektionsdruck gegenüber dem Wildtypen bzw gegenüber Viren, die einer Mutation unterliegen, die eben dieses Gen inaktivieren, das den Ablauf von Transkription und Translation des Virus perturbieren. Durch bestimmte Maßnahmen kann das Risiko des Wachstumsnachteils derartiger rekombinanter Viren, die ein interferierendes Fremdprotein funktionell exprimieren, minimiert werden; man weiß, dass die DNA-abhängige RNA-Polymerase bei dem Signal TTTTNT die Transkription abbricht (early stop signal) und ebenso, dass sogenannte G- oder C-runs (mehr als vier aufeinanderfolgende Guanin- oder Cytosinreste) zu spontanen Punktmutationen führen. Dies kann durch stille Mutationen bei der Konstruktion der zu inserierenden Sequenz umgangen werden.

Weiterhin empfiehlt es sich, die Zielgensequenz zwischen zwei essentielle Gene zu integrieren, so zum Beispiel zwischen I8R und G1L; bei einer Deletion des Zielgens durch das rMVA wäre so höchstwahrscheinlich auch ein essentielles Gen betroffen und würde so Lebensfähigkeit für das Virus ausschließen.

Linda Wyatt und ihre Kollegen fanden außerdem heraus, dass das Zerstören der für die Transmembranregion des Proteins kodierenden Sequenzen einen weiteren Vorteil bei der Generierung rekombinanter MVA-Viren darstellt (Wyatt L et al. 2008, 2009, Cottingham M et al. 2013).

Ihre Forschungsgruppe charakterisierte zwar ein MVA-Vektorvirus zur Produktion des HIV-Glykoproteins SP120, jedoch konnten ihre Erkenntnisse in dieser Arbeit über eine Vakzine gegen das Hendra-Virus bestätigt werden. Durch die Deletion der Transmembrandomäne und des zytoplasmatischen Anteiles des G-Proteins konnte ein rMVA-Konstrukt erstellt werden, das den Anforderungen einer Vakzine bis dato in jeder Hinsicht entspricht, wohingegen die unveränderte Attachmentprotein-Sequenz für offensichtliche Behinderung des Virus in Wachstum und Proteinexpression verantwortlich zeichnet.

### 3. Weitergehende Arbeiten

Die in vitro-Untersuchungen zeichnen in ihrer Gesamtheit ein positives Bild für die beiden Vakzinekandidaten MVA\_HeV-F und MVA\_HeV-sG. Diese beiden rekombinanten Impfstoffe müssen weitergehenden Tests unterzogen werden.

In vivo-Experimente sind der nächste, logische Schritt. Hierfür bietet sich zunächst die Maus als Modell an. Durch ihre Größe ist die Praktikabilität im Labor gegeben und die Handhabung ein Leichtes. Mit transgenen Mäusen, die einem oder mehreren genetischen Knock-outs unterliegen, kann man gezielt Reaktionen des Körpers untersuchen. Zudem gelten sie gerade in Bezug auf das Hendra-Virus als geeignetes Tiermodell (Dhondt K et al. 2013 (a) und (b)).

Empfehlenswert sind Experimente, die die im lebenden Tier erfolgende Immunantwort nachvollziehen lassen, wie beispielweise ELISA für die humoralen Reaktionen oder ELISpot-Analysen, die die CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antwort verdeutlichen.

Weitere empfehlenswerte, in vivo-Versuche schließen weitere Tiermodelle wie selbstverständlich das Pferd mit ein. Hier gibt es zwar bereits eine Vakzine in Australien, die am 05.08.2015 die endgültige Zulassung erlangt hat; die Subunit-Vakzine der Firma Zoetis erfordert jedoch halbjährlich eine Auffrischung und benötigt zudem ein Adjuvans. MVA-Vakzinen schützen bereits nach ein bis maximal zwei Verabreichungen und wirken zudem als intrinsisches Adjuvans, sodass weitere, den Körper belastende Wirkstoffe unnötig sind (Earl P et al. 2004, Wyatt L et al. 2004, Kreijtz J et al. 2009 (b) und 2013).

Da unsere MVA-Vakzinekandidaten auch für einen Humanimpfstoff in Betracht kommen, ist die grüne Meerkatze als non-human primate-Modell ein weiterer, empfehlenswerter Schritt. Diese Affenart ist momentan das beste Tiermodell, um den Ablauf der Hendra-Infektion beim Menschen

nachvollziehen zu können und das Erproben einer potenziellen, humanen Vakzine in diesem Modell gilt bei der U.S. Food and Drug Administration (FDA) als Kriterium für die Zulassung (Geisbert T et al. 2012, Bossart K et al. 2012).

Am Ende einer Impfstoffzulassung müssten die Phasen I-IV der klinischen Prüfphasen im Menschen erfolgen (Pfleiderer und Wichmann. 2014).

Die Entwicklung dieses Impfstoffes würde im Hinblick auf die attestierte Kreuzprotektivität gegen Nipah-Viren eine große Möglichkeit eröffnen, einer weiteren, noch größere Opferzahlen fordernden Krankheit Einhalt zu gebieten (Wang L et al. 2013, Chua K et al. 1999 und 2000, Bossart K et al. 2005 und 2007, Hayman D et al. 2011, Broder C et al. 2012).

Die bisherigen Ergebnisse bestätigen hoffnungsvolle Vakzinekandidaten gegen das Hendra-Virus und möglicherweise noch gegen weitere Mitglieder des Henipavirus-Genus.



## VI Zusammenfassung

Das Hendra-Virus hat seit seiner Entdeckung vier Menschen und über 80 Pferde das Leben gekostet. Aufgrund seiner behäbigen Transmissionstendenz liegen die Opferzahlen bislang nicht höher bei einer vergleichsweise hohen Letalität von 75%. Nach wie vor ist nicht abschließend geklärt, unter welchen Umständen die Übertragung von Flughunden auf Pferde erfolgt; ein Umstand, der eine Einschätzung der tatsächlichen Gefahr, die von diesem tödlichen Paramyxovirus ausgeht, erschwert.

Henipaviren haben inzwischen auf vier Kontinenten ihre Spuren hinterlassen; Antikörper oder die Viren selbst konnten in Asien, Australien, Afrika und Südamerika in Flughunden, Schweinen, Pferden, Hunden und Katzen nachgewiesen werden. Ihr Wirtsspektrum umfasst sechs Säugetierordnungen.

Seit Anfang August 2015 ist in Australien eine Subunit- Vakzine für Pferde zugelassen. Diese Impfung erfordert halbjährliche Booster und muss von Tierärzten kostenpflichtig verabreicht werden; aufgrund heftigen Widerstands seitens der Reiter und Pferdehalter konnte sich die Reitervereinigung Equestrian Australia bis dato nicht damit durchsetzen, die Impfung zur Bedingung für die Turnierteilnahme in NSW und QLD zu machen. Die Vakzine wird nicht allorts gut angenommen, Olympiateilnehmer Heath Ryan und Mary Hanna beispielweise sprechen sich gegen die Immunisierung aus. Unabhängig davon, ob die Nebenwirkungen sich außerhalb des Rahmens bewegen oder nicht, ist entscheidend, ob die Pferdebesitzer die Vakzine akzeptieren und es schlussendlich zur Anwendung kommt.

Die hier entwickelten und untersuchten potenziellen MVA-Hendra-Impfstoffe sind vielversprechend. Die Wachstumskapazität der rekombinanten Viren MVA\_HeV-F und MVA\_HeV-sG und deren Fähigkeit, die Fremdproteine in ausreichender Menge zu produzieren, wurden in dieser Arbeit nachgewiesen. Eine Eignung der beiden Vakzinekandidaten für Mensch und Tier ist daher nicht nur denkbar, sondern aussichtsreich und die Gefahr für Nebenwirkungen verschwindend gering. Zum einen, weil nachgewiesen wurde, dass sogar immunsupprimierte Patienten komplikationslos die Verabreichung von MVA vertragen, zum anderen, weil keinerlei Adjuvantien als Zugabe nötig sind; MVA vermag es, eine ausreichende Immunantwort zu provozieren. Aufgrund der nahen Verwandtschaft zum Nipah-Virus und der daraus resultierenden Kreuzprotektivität, besteht realistischer Anlass zur Hoffnung, dass mit einer Vakzine zwei tödlichen Viren Einhalt geboten werden kann.

Im Hinblick auf die bisherigen Ergebnisse, die in dieser Arbeit dargelegt wurden, empfiehlt es sich, die beiden rekombinanten Vakzinen MVA\_HeV-F und MVA\_HeV-sG im Tierversuch zu erproben. Denn das Problem Hendra-Virus ist bisher nicht gelöst.

## VII Summary

Hendra-Virus caused death in four humans and more than 80 horses since its first outbreak. Despite a case fatality of approximately 75% due to its slow transmission tendency there's been no greater number of casualties. Still it's not certainly known under which conditions the spillover occurs from bats to horses, so that the hazard cannot be calculated realistically to date.

Henipavirus presence has been verified in Australia, Asia, Africa and South America. Antibodies or the virus itself had been detected in bats, horses, pigs, dogs and cats. Spanning six mammalian orders Henipaviruses do have the broadest species tropism known for paramyxoviruses.

Since August 5th 2015 the subunit vaccine EquiVac HeV has received registration for horses in Australia. Equestrian Australia still fight for mandatory vaccination in competing horses in New South Wales and Queensland, but there's a lot of resistance. Reasons are that boosters are required every six months and must be given by vets so that a lot of money must be spent. Furthermore, people like Olympic riders Heath Ryan and Mary Hanna do not recommend the vaccination because of its alleged severe side effects.

In fact, the best vaccine will not protect if it's not given.

Investigation here of our recombinant MVA-Hendra-vaccines is promising. Both MVA\_HeV-F and MVA\_HeV-sG demonstrated their ability to grow and raise their titers as well as to express the Hendra-Virus-proteins. So they seem appropriate for animal and human use, not least because there's low risk for adverse reactions. There's proofed evidence for the vaccine safety of MVA even in immunosuppressed patients and no potentially harmful adjuvants will be needed due to the fact that MVA itself induces strong immunogenicity.

For the existing cross protectivity between Hendra- and Nipah-Viruses there's high chance that one vaccine could prevent from both deadly pathogens.

With regard to our results both recombinant MVA-vaccine candidates work out so far and should be further tested, since the "Hendra-Virus-problem" remains unsolved.

## VIII. Literaturverzeichnis

1. Abdullah S, Chang LY, Rahmat K, Jin Goh K, Tin Tan C.  
Late-onset Nipah virus encephalitis 11 years after the initial outbreak: A case report.  
*Neurology Asia; Mar 2012, Vol. 17 Issue 1, p71*
2. Aguilar H, Ataman Z, Aspericueta V, Fang A, Stroud M, Negrete O, Kammerer R, Lee B.  
A novel receptor-induced activation site in the Nipah virus attachment glycoprotein (G) involved in triggering the fusion glycoprotein (F).  
*J Biol Chem. 2009 Jan 16; 284(3): 1628–1635.*
3. Amara R, Ibegbu C, Villinger F, Montefiori D, Sharma S, Nigam P, Xu Y, McClure H, Robinson H.  
Studies using a viral challenge and CD8 T cell depletions on the roles of cellular and humoral immunity in the control of an SHIV-89.6P challenge in DNA/MVA-vaccinated macaques.  
*Virology. 2005 Dec 20;343(2):246-55.*
4. Amato R, Stepankiw M.  
Evaluation of MVA-5T4 as a novel immunotherapeutic vaccine in colorectal, renal and prostate cancer.  
*Future Oncol. 2012 Mar;8(3):231-7.*
5. Anonymous.  
Another human case of Equine Morbillivirus disease in Australia.  
*Emerg. Infect. Dis. 2:71-72.*
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 May 10;244(2):365-96.*
7. Australian Veterinary Association, Hendra Virus.  
<http://www.ava.com.au/hendra-virus>
8. Backes S, Sperling K, Zwilling J, Gasteiger G, Ludwig H, Kremmer E, Schwantes A, Staib C, Sutter G.  
Viral host-range factor C7 or K1 is essential for modified vaccinia virus Ankara late gene expression in human and murine cells, irrespective of their capacity to inhibit protein kinase R-mediated phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2alpha.  
*J Gen Virol. 2010 Feb;91(Pt 2):470-82.*
9. Baker M, Schountz T, Wang L.

- Antiviral immune responses of bats: a review.  
*Zoonoses Public Health*. 2013;60:104–16.
10. Behbehani A.  
The smallpox story: life and death of an old disease.  
*Microbiol Rev*. 1983 Dec;47(4):455-509.
11. Bell C, MacHugh N, Connelley T, Degnan K, Morrison W.  
Haematopoietic depletion in vaccine-induced neonatal pancytopenia depends on both the titre and specificity of alloantibody and levels of MHC I expression.  
*Vaccine*. 2015 Jul 9;33(30):3488-96.
12. Bender B, Rowe C, Taylor S, Wyatt L, Moss B, Small P Jr.  
Oral immunization with a replication-deficient recombinant vaccinia virus protects mice against influenza.  
*J Virol*. 1996 Sep;70(9):6418-24.
13. Blanchard T, Alcamí A, Andrea P, Smith G.  
Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine.  
*J Gen Virol*. 1998 May;79 (Pt 5):1159-67.
14. Bonaparte M, Dimitrov A, Bossart K, Crameri G, Mungall B, Bishop K, Choudhry V, Dimitrov D, Wang L, Eaton B, Broder C.  
Ephrin-B2 ligand is a functional receptor for Hendra virus and Nipah virus.  
*Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jul 26;102(30):10652-7.
15. Bossart K, Crameri G, Dimitrov A, Mungall B, Feng Y, Patch J, Choudhary A, Wang L, Eaton B, Broder C.  
Receptor binding, fusion inhibition, and induction of cross- reactive neutralizing antibodies by a soluble G glycoprotein of Hendra virus.  
*J Virol*. 2005 Jun; 79(11): 6690–6702.
16. Bossart K, McEachern J, Hickey A, Choudhry V, Dimitrov D, Eaton B, Wang L.  
Neutralization assays for differential henipavirus serology using bio-plex protein array systems.  
*J Virol Methods*. 2007;142(1–2):29–40.
17. Bossart K, Rockx B, Feldmann F, Brining D, Scott D, LaCasse R, Geisbert J, Feng Y, Chan Y, Hickey A, Broder C, Feldmann H, Geisbert T.  
A Hendra virus G glycoprotein subunit vaccine protects African green monkeys from Nipah virus challenge.  
*Sci transl Med*. 2012 Aug 8;4(146):146ra107.
18. Bossart K, Wang L, Eaton B, Broder C.

- Functional expression and membrane fusion tropism of the envelope glycoproteins of Hendra virus.  
*Virology*. 2001 Nov 10;290(1):121-35.
19. Bossart K, Wang L, Flora M, Chua K, Lam S, Eaton B, Broder C.  
Membrane Fusion Tropism and Heterotypic Functional Activities of the Nipah Virus and Hendra Virus Envelope Glycoproteins.  
*J Virol*. 2002 Nov;76(22):11186-98.
20. Brewoo J, Powell T, Stinchcomb D, Osorio J.  
Efficacy and safety of a modified vaccinia Ankara (MVA) vectored plague vaccine in mice.  
*Vaccine*. 2010 Aug 16;28(36):5891-9.
21. Broder C, Geisbert T, Xu K, Nikolov D, Wang L, Middleton D, Pallister J, Bossart K.  
Immunization strategies against Henipaviruses.  
*Curr Top Microbiol Immunol*. 2012; 359: 197-223.
22. Broder C, Xu K, Nikolov D, Zhu Z, Dimitrov D, Middleton D, Pallister J, Geisbert T, Bossart K, Wang L.  
A treatment for and vaccine against the deadly Hendra and Nipah viruses.  
*Antiviral Res*. 2013 October; 100(1): 8–13.
23. Bowden T, Crispin M, Harvey D, Jones E, Stuart D.  
Dimeric architecture of the Hendra virus attachment glycoprotein: evidence for a conserved mode of assembly.  
*J Virol*. 2010 Jun;84(12):6208-17.
24. Bronte V, Carroll M, Goletz T, Wang M, Overwijk W, Marincola F, Rosenberg S, Moss B, Restifo N.  
Antigen expression by dendritic cells correlates with the therapeutic effectiveness of a model recombinant poxvirus tumor vaccine.  
*Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 1;94(7):3183-8.
25. Broyles S.  
Vaccinia virus transcription.  
*J Gen Virol*. 2003 Sep;84(Pt 9):2293-303.
26. Calain P, Roux L.  
The Rule of Six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA.  
*J Virol*. 1993 Aug; 67(8): 4822–4830.
27. 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 Nov 24;238(2):198-211.
28. Chakrabarti S, Sisler J, Moss B.  
Compact, synthetic, vaccinia virus early/late promoter for protein expression.  
*Biotechniques*. 1997 Dec;23(6):1094-7.
29. Chandran D, Reddy K, Vijayan S, Sugumar P, Rani G, Kumar P, Rajendra L, Srinivasan V.  
MVA recombinants expressing the fusion and hemagglutinin genes of PPRV protects goats against virulent challenge.  
*Indian J Microbiol*. 2010 Sep;50(3):266-74.
30. Chang A, Dutch R.  
Paramyxovirus fusion and entry: multiple paths to a common end.  
*Viruses*. 2012 Apr; 4(4): 613-636.
31. Chen J.  
Genomic rearrangements: mutational mechanisms.  
eLS. *Published Online: 15 FEB 2011, 2001 John Wiley & Sons, Ltd.*
32. Chua K, Bellini W, Rota P, Harcourt B, Tamin A, Lam S, Ksiazek T, Rollin P, Zaki S, Shieh W, Goldsmith C, Gubler D, Roehrig J, Eaton B, Gould A, Olson J, Field H, Daniels P, Ling A, Peters C, Anderson L, Mahy B.  
Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus.  
*Science*. 2000 May 26;288(5470):1432-5.
33. Chua K, Goh K, Wonk K, Kamarulzaman A, Tan P, Ksiazek T, Zaki S, Paul G, Lam S, Tan C.  
Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig-farmers in Malaysia.  
*Lancet*. 1999 Oct 9;354(9186):1257-9.
34. Cochran M, Puckett C, Moss B.  
In vitro mutagenesis of the promoter region for a vaccinia virus gene: evidence for tandem early and late regulatory signals.  
*J Virol*. 1985 Apr;54(1):30-7.
35. Cottingham M, Carroll M.  
Recombinant MVA vaccines: dispelling the myths.  
*Vaccine*. 2013 Sep 6;31(39):4247-51.
36. Davison A, Moss B.  
Structure of vaccinia virus early promoters.  
*J Mol Biol*. 1989 Dec 20;210(4):749-69.
37. de Barra E, Hodgson S, Ewer K, Bliss C, Hennigan K, Collins A, Berrie E, Lawrie A, Gilbert S, Nicosia A, McConkey S, Hill A.  
A phase Ia study to assess the safety and immunogenicity of new malaria vaccine candidates

- ChAd63 CS administered alone and with MVA CS.  
*PLoS One*. 2014 Dec 18;9(12):e115161.
38. Dhondt K, Horvat B.  
Henipavirus infections: lessons from animal models.  
*Pathogens*. 2013 Jun; 2(2): 264–287. (a)
39. Dhondt K, Mathieu C, Chalons M, Reynaud J, Vallve A, Raoul H, Horvat B.  
Type I interferon signaling protects mice from lethal henipavirus infection.  
*J Infect Dis*. 2013 Jan 1; 207(1):142-51. (b)
40. Draper S, Cottingham M, Gilbert S.  
Utilizing poxviral vectored vaccines for antibody induction-progress and prospects.  
*Vaccine*. 2013 Sep 6;31(39):4223-30.
41. 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.  
*J Gen Virol*. 1998 Feb;79 (Pt 2):347-52.
42. Drexler I, Staib C, Sutter G.  
Modified vaccinia virus Ankara as antigen delivery system: how can we best use its potential?  
*Curr Opin Biotechnol*. 2004 Dec;15(6):506-12.
43. Drexler J, Corman V, Gloza- Rausch F, Seebens A, Annan A, Ipsen A, Kruppa T, Müller M, Kalko E, Adu-Sarkodie Y, Oppong S, Drosten C.  
Henipavirus RNA in African bats.  
*PLoS One*. 2009 Jul 28;4(7):e6367
44. Drexler J, Corman V, Müller M, Maganga G, Vallo P, Binger T, Gloza-Rausch F, Cottontail V, Rasche A, Yordanov S, Seebens A, Körschild M, Oppong S, Adu Sarkodie Y, Pongombo C, Lukashev A, Schmidt-Chanasit J, Stöcker A, Carneiro A, Erbar S, Maisner A, Fronhoffs F, Buettner R, Kalko E, Kruppa T, Franke C, Kallies R, Yandoko E, Herrler G, Reusken C, Hassanin A, Krüger D, Matthee S, Ulrich R, Leroy E, Drosten C.  
Bats host major mammalian paramyxoviruses.  
*Nat Commun*. 2012 Apr 24;3:796
45. Dunn G, Klapsa D, Wilton T, Stone L, Minor P, Martin J.  
Twenty-eight years of Poliovirus replication in an immunodeficient individual: impact on the Global Polio Eradication Initiative.  
*PLoS Pathog*. 2015 Aug 27;11(8):e1005114.
46. Earl P, Americo J, Wyatt L, Eller L, Whitbeck J, Cohen G, Eisenberg R, Hartmann C, Jackson D, Kulesh D, Martinez M, Miller D, Mucker E, Shamblin J, Zwiers S, Huggins J,



- Jahrling P, Moss B.  
Immunogenicity of a highly attenuated MVA smallpox vaccine and protection against monkeypox.  
*Nature*. 2004 Mar 11;428(6979):182-5.
47. Earl P, Hugin A, 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.  
*J Virol*. 1990 May; 64(5): 2448–2451.
48. Eaton B, Broder C, Middleton D, Wang L.  
Hendra and Nipah viruses: different and dangerous.  
*Nature Reviews Microbiology* 4, 23-35 (January 2006)
49. Edwards C, Mundy G.  
Eph receptors and Ephrin signaling pathways: a role in bone homeostasis.  
*Int J Med Sci*. 2008 Sep 3;5(5):263-72.
50. Field H, Crameri G, Kung N, Field H, Gravel J, Kelly M, Mackenzie J.  
Ecological aspects of Hendra virus.  
*Curr Top Microbiol Immunol*. 2012;359:11-23.
51. Field H, de Jong C, Melville D, Smith C, Smith I, Broos A, Kung Y, McLaughlin A, Zeddeman A.  
Hendra virus infection dynamics in Australian fruit bats.  
*PLoS One*. 2011; 6(12): e28678.
52. Field H, Young P, Yob J, Mills J, Hall L, Mackenzie J.  
The natural history of Hendra and Nipah viruses.  
*Microbes Infect*. 2001 Apr;3(4):307-14.
53. Fogarty R, Halpin K, Hyatt A, Daszak P, Mungall B.  
Henipavirus susceptibility to environmental variables.  
*Virus Res*. 2008 March; 132(1-2): 140–144.
54. Garten W, Hallenberger S, Ortmann D, Schäfer W, Vey M, Angliker H, Shaw E, Klenk H.  
Processing of viral glycoproteins by the subtilisin-like endoprotease furin and its inhibition by specific peptidylchloroalkylketones.  
*Biochimie*. 1994;76(3-4):217-25.
55. Gasteiger G, Kastenmuller W, Ljapoci R, Sutter G, Drexler I.  
Cross-priming of cytotoxic T cells dictates antigen requisites for modified vaccinia virus Ankara vector vaccines.  
*J Virol*. 2007 Nov;81(21):11925-36.

56. Geisbert T, Daddario-DiCaprio K, Hickey A, Smith M, Chan Y, Wang L, Mattapallil J, Geisbert J, Bossart K, Broder C.  
Development of an acute and highly pathogenic nonhuman primate model of Nipah virus infection.  
*PLoS One*. 2010 May 18;5(5):e10690.
57. Geisbert T, Feldmann H, Broder C.  
Animal challenge models of Henipavirus infection and pathogenesis.  
*Curr top Microbiol Immunol*.2012;359:153-77. doi: 10.1007/82\_2012\_208.
58. Gherardi M, Perez-Jimenez E, Najera J, Esteban M.  
Induction of HIV immunity in the genital tract after intranasal delivery of a MVA vector: enhanced immunogenicity after DNA prime-modified vaccinia virus Ankara boost immunization schedule.  
*J Immunol*. 2004 May 15;172(10):6209-20.
59. Gilbert S.  
Clinical development of Modified Vaccinia virus Ankara vaccines.  
*Vaccine*. 2013 Sep 6;31(39):4241-6.
60. Goepfert P, Elizaga M, Sato A, Qin L, Cardinali M, Hay C, Hural J, DeRosa S, DeFawe O, Tomaras D, Montefiori D, Xu Y, Lai L, Kalams S, Baden L, Frey S, Blattner W, Wyatt L, Moss B, Robinson H.  
National Institute of Allergy and Infectious Diseases HIV Vaccine Trials Network. Phase 1 safety and immunogenicity testing of DNA and recombinant modified vaccinia Ankara vaccines expressing HIV-1 virus-like particles.  
*J Infect Dis*. 2011 Mar 1;203(5):610-9.
61. Green C, Scarselli E, Sande C, Thompson A, de Lara C, Taylor K, Haworth K, Del Sorbo M, Angus B, Siani L, Di Marco S, Traboni C, Folgari A, Colloca S, Capone S, Vitelli A, Cortese R, Klenerman P, Nicosia A, Pollard A.  
Chimpanzee adenovirus- and MVA-vectored respiratory syncytial virus vaccine is safe and immunogenic in adults.  
*Sci Transl Med*. 2015 Aug 12;7(300):300ra126.
62. Guillaume V, Contamin H, Loth O, Georges-Courbot M, Lefevre A, Marianneau P, Chua K, Lam S, Buckland R, Deubel V, Wild T.  
Nipah virus: vaccination and passive protection studies in a hamster model.  
*J Virol*. 2004 Jan;78(2):834-40
63. Halpin K, Hyatt A, Fogarty R, Middleton D, Bingham J, Epstein J, Rahman S, Hughes T, Smith C, Field H, Daszak P.  
Henipavirus Ecology Research Group. Pteropid bats are confirmed as the reservoir hosts of

- henipaviruses: a comprehensive experimental study of virus transmission.  
*Am J Trop Med Hyg.* 2011 Nov;85(5):946-51.
64. Halpin K, Young P, Field H, Mackenzie J.  
Isolation of Hendra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus.  
*J Gen Virol* 81:1927-1932 2000 Aug
65. Hashiguchi T, Maenaka K, Yanagi Y.  
Measles virus hemagglutinin: structural insights into cell entry and measles vaccine.  
*Front Microbiol.* 2011 Dec 16;2:247.
66. Hayman D, Suu- Ire R, Breed A, McEachern J, Wang L, Wood J, Cunningham A.  
Evidence of Henipavirus infection in West African fruit bats.  
*PLoS One.* 2008 Jul 23;3(7):e2739
67. Hayman D, Wang L, Barr J, Baker K, Suu-Ire R, Broder C, Cunningham A, Wood J.  
Antibodies to henipavirus or henipa-like viruses in domestic pigs in Ghana, West Africa.  
*PLoS One.* 2011;6(9):e25256.
68. Hayton E, Rose A, Ibrahimsa U, Del Sorbo M, Capone S, Crook A, Black A, Dorrell L, Hanke T.  
Safety and tolerability of conserved region vaccines vectored by plasmid DNA, simian adenovirus and modified vaccinia virus ankara administered to human immunodeficiency virus type 1-uninfected adults in a randomized, single-blind phase I trial.  
*PLoS One.* 2014 Jul 9;9(7):e101591.
69. 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 Expr Purif.* 2007 Dec;56(2):269-78.
70. Hooper P, Ketterer P, Hyatt A, Russel G.  
Lesions of experimental equine morbillivirus pneumonia in horses.  
*Vet Pathol.* 1997 Jul;34(4):312-22.
71. Iehlé C, Razafitrimo G, Razainirina J, Andriaholinirina N, Goodman S, Faure C, Georges-Courbot M, Rousset D, Reynes J.  
Henipavirus and Tioman virus antibodies in Pteropodid bats, Madagascar.  
*Emerg Infect Dis.* 2007 Jan; 13(1): 159–161.
72. Internetauftritt ABC- News.  
<http://www.abc.net.au/news/2015-04-01/hendra-virus-volunteers-being-recruited-to-trial-treatment/6365572>
73. Internetauftritt Australian Veterinary Association.

- [https://www.ava.com.au/sites/default/files/AVA\\_website/pdfs/Equivac%20HeV%20fact%20sheet\\_about%20Equivac%20HeV%20vaccine%20for%20horses%5B1%5D.pdf](https://www.ava.com.au/sites/default/files/AVA_website/pdfs/Equivac%20HeV%20fact%20sheet_about%20Equivac%20HeV%20vaccine%20for%20horses%5B1%5D.pdf)
74. Internetauftritt der Universität Harvard.  
<https://eph-nomenclature.med.harvard.edu/>
75. Internetauftritt NCBI Taxonomy.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=10242>
76. Internetauftritt Uniformed Services University Naval Support Activity Bethesda.  
<https://www.usuhs.edu/content/human-clinical-trials-begin-deadly-hendra-virus-therapy>
77. Jacobs B, Langland J, Kibler K, Denzler K, White S, Holechek S, Wong S, Huynh T, Baskin C.  
Vaccinia virus vaccines: past, present and future.  
*Antiviral Res.* 2009 Oct;84(1):1-13.
78. Joklik W.  
The intracellular uncoating of poxvirus DNA: II. The molecular basis of the uncoating process.  
*J Mol Biol.* 1964 Feb;8:277-88
79. Kastenmuller W, Gasteiger G, Stross L, Busch D, Drexler I.  
Cutting edge: mucosal application of a lyophilized viral vector vaccine confers systemic and protective immunity toward intracellular pathogens.  
*J Immunol.* 2009 Mar 1;182(5):2573-7.
80. Kreijtz J, Goeijenbier M, Moesker F, van den Dries L, Goeijenbier S, De Gruyter H, Lehmann M, Mutsert G, van de Vijver D, Fouchier R, van Gorp E, Rimmelzwaan G, Sutter G, Osterhaus A.  
Safety and immunogenicity of a modified-vaccinia-virus-Ankara-based influenza A H5N1 vaccine: a randomised, double-blind phase 1/2a clinical trial.
81. Kreijtz J, Suezer Y, de Mutsert G, van Amerongen G, Schwantes A, van den Brand J, Fouchier R, Löwer J, Osterhaus A, Sutter G, Rimmelzwaan G.  
MVA-based H5N1 vaccine affords cross-clade protection in mice against Influenza A/H5N1 viruses at low doses and after single immunization.  
*PLoS One.* 2009; 4(11): e7790. (a)
82. Kreijtz J, Suezer Y, de Mutsert G, van den Brand J, van Amerongen G, Schnierle B, Kuiken T, Fouchier R, Löwer J, Osterhaus A, Sutter G, Rimmelzwaan G.  
Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing the hemagglutinin gene confers protection against homologous and heterologous H5N1 influenza virus infections in macaques.  
*J Infect Dis.* 2009 Feb 1;199(3):405-13. (b)

83. Kremer M, Kreijtz J, Fux R, Lehmann M, Sutter G.  
Easy and efficient protocols for working with recombinant vaccinia virus MVA.  
*Methods Mol Biol.* 2012;890:59-92.
84. Kurup D, Wirblich C, Feldmann H, Marzi A, Schnell M.  
Rhabdovirus-Based Vaccine Platforms against Henipaviruses.
85. R, Collins P, Kolakofsky D, et al.  
Virus taxonomy: 8th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.  
*San Diego: Elsevier Academic Press; 2005:655-668*
86. Lamb R, Parks G.  
Paramyxoviridae: The viruses and their replication.  
*Fields Virology, 5th ed.; Knipe, D.M., Howley, P.M., Eds.; Lippincott Williams & Wilkins 2007*
87. Landry J, Pyl P, Rausch T, Zichner T, Tekkedil M, Stütz A, Jauch A, Aiyar R, Pau G, Delhomme N, Gagneur J, Korbel J, Huber W, Steinmetz L.  
The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line.  
*G3 (Bethesda).* 2013 Aug; 3(8): 1213–1224.
88. Lee B, Ataman Z.  
Modes of paramyxovirus fusion: a Henipavirus perspective.  
*Trends Microbiol.* 2011 Aug;19(8):389-99.
89. Lee B, Rota P.  
Henipavirus ecology, molecular virology and pathogenesis.  
*Springer 2012*
90. Lehmann M, Kastenmuller W, Kandemir J, Brandt F, Suezer Y, Sutter G.  
Modified vaccinia virus Ankara triggers chemotaxis of monocytes and early respiratory immigration of leukocytes by induction of CCL2 expression.  
*J Virol.* 2009 Mar;83(6):2540-52.
91. Mackett M, Smith G, Moss B.  
General method for production and selection of infectious vaccinia virus recombinants expressing foreign genes.  
*J Virol.* 1984 Mar;49(3):857-64.
92. Mackett M, Smith G, Moss B.  
Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. 1982.  
*Biotechnology.* 1992;24:495-9.
93. Marsh G, de Jong C, Barr J, Tachedjian M, Smith C, Middleton D, Yu M, Todd S, Foord A, Haring V, Payne J, Robinson R, Broz I, Cramer G, Field H, Wang L.  
Cedar virus: a novel Henipavirus isolated from Australian bats.

- PLoS Pathog.* 2012;8(8):e1002836
94. Marsh G, Haining J, Hancock T, Robinson R, Foord A, Barr J, Riddell S, Heine H, White J, Cramer G, Field H, Wang L, Middleton D.  
Experimental infection of horses with Hendra virus/Australia/horse/2008/Redlands.  
*Emerg Infect Dis.* 2011 Dec;17(12):2232-8.
95. Marth E, Kleinhappl B, Jelovcan S.  
Stimulation of the immune system by different TBE-virus vaccines.  
*Int J Med Microbiol.* 2004 Apr;293 Suppl 37:139-44.
96. Mathieu C, Dhondt K, Chalons M, Mely S, Raoul H, Negre D, Cosset F, Gerlier D, Vives R, Horvat B.  
Heparan sulfate-dependent enhancement of henipavirus infection.  
*MBio.* 2015 Mar 10;6(2):e02427.
97. Mayr A, Hochstein-Mintzel V, Stickl H.  
Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes MVA.  
*Infection.* March 1975, Volume 3, Issue 1, pp 6-14.
98. Mayr A, Munz E.  
Veränderung von Vaccinevirus durch Dauerpassagen in Hühnerembryofibroblasten-Kulturen.  
*Zentralbl Bakteriolog Orig A (1964);* 195:24-35.
99. Mayr A, Stickl H, Müller K, Danner K, Singer H.  
The Smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defence mechanism.  
*Zentralbl Bakteriolog B.* 1978 Dec;167(5-6):375-90.
100. Mayr A.  
Smallpox vaccination and bioterrorism with pox viruses.  
*Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2003 Oct;26(5-6):423-30.
101. McCollum A, Nakazawa Y, Ndongala G, Pukuta E, Karhemere S, Lushima R, Ilunga B, Kabamba J, Wilkins K, Gao J, Li Y, Emerson G, Damon I, Carroll D, Reynolds M, Malekani J, Tamfum J.  
Human Monkeypox in the Kivus, a conflict region of the Democratic Republic of the Congo.  
*Am J Trop Med Hyg.* 2015 Aug 17. pii: 15-0095.
102. McCurdy L, Larkin B, Martin J, Graham B.  
Modified vaccinia Ankara: potential as an alternative smallpox vaccine.  
*Clin Infect Dis.* 2004 Jun 15;38(12):1749-53.
103. McDonald W, Crozel-Goudot V, Traktman P.

- Transient expression of the vaccinia virus DNA polymerase is an intrinsic feature of the early phase of infection and is unlinked to DNA replication and late gene expression.  
*J Virol.* 1992 Jan; 66(1): 534–547.
104. McEachern J, Bingham J, Cramer G, Green D, Hancock T, Middleton D, Feng Y, Broder C, Wang L, Bossart K.  
A recombinant subunit vaccine formulation protects against lethal Nipah virus challenge in cats.  
*Vaccine.* 2008 Jul 23;26(31):3842-52.
105. McFarlane R, Becker N, Field H.  
Investigation of the climatic and environmental context of Hendra virus spillover events 1994–2010.  
*PLoS One.* 2011; 6(12): e28374.
106. Medcalf S, Bilek L, Hartman T, Iwen P, Leuschen P, Miller H, O'Keefe A, Sayles H, Smith P.  
Smallpox vaccination of laboratory workers at US Variola testing sites.  
*Emerg Infect Dis.* 2015 Aug; 21(8): 1437–1439.
107. 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.  
*J Gen Virol.* 2007 Dec;88(Pt 12):3249-59.
108. Meyer H, Sutter G, Mayr A.  
Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence.  
*J Gen Virol.* 1991 May;72 ( Pt 5):1031-8.
109. Middleton D, Pallister J, Klein R, Feng Y, Haining J, Arkinstall R, Frazer L, Huang J, Edwards N, Wareing M, Elhay M, Hashmi Z, Bingham J, Yamada M, Johnson D, White J, Foord A, Heine H, Marsh G, Broder C, Wang L.  
Hendra virus vaccine, a one health approach to protecting horse, human, and environmental health.  
*Emerg Infect Dis.* 2014 Mar;20(3):372-9.
110. Miller P, Boyle D, Eaton B, Wang L.  
Full-length genome sequence of Mossman virus, a novel paramyxovirus isolated from rodents in Australia.  
*Virology.* 2003 Dec 20;317(2):330-44.
111. Mire C, Geisbert J, Agans K, Feng Y, Fenton K, Bossart K, Yan L, Chan Y, Broder C,

- Geisbert T.  
A recombinant Hendra virus G glycoprotein subunit vaccine protects nonhuman primates against Hendra virus challenge.  
*J Virol.* 2014 May;88(9):4624-31
112. Monaghan P, Green D, Pallister J, Klein R, White J, Williams C, McMillan P, Tilley L, Lampe M, Hawes P, Wang L.  
Detailed morphological characterisation of Hendra virus infection of different cell types using super-resolution and conventional imaging.  
*Virol J.* 2014 Nov 27;11:200.
113. Moss B, Earl P.  
Overview of the vaccinia virus expression system.  
*Curr Protoc Mol Biol.* 2002 Nov;Chapter 16:Unit16.15.
114. Moss B.  
Poxviridae: the viruses and their replication.  
*Fields Virology, 5th ed.; Knipe, D.M., Howley, P.M., Eds.; Lippincott Williams & Wilkins* 2007
115. Mungall B, Middleton D, Crameri G, Bingham J, Halpin K, Russell G, Green D, McEachern J, Pritchard L, Eaton B, Wang L, Bossart K, Broder C.  
Feline model of acute nipah virus infection and protection with a soluble glycoprotein-based subunit vaccine.  
*J Virol.* 2006 Dec;80(24):12293-302.
116. Murray K, Eaton B, Hooper P, et al.  
Flying foxes, horses, and humans: a zoonosis caused by a new member of Paramyxoviridae.  
*Emerging Infections – I, 1998*
117. Murray K, Rogers R, Selvey L, Selleck P, Hyatt A, Gould A, Gleeson L, Hooper P, Westbury H.  
A novel Morbillivirus pneumonia of horses and its transmission to humans.  
*Emerg Infect Dis.* 1995 Jan-Mar;1(1):31-3.
118. Murray K, Selleck P, Hooper P, Hyatt A, Gould A, Gleeson L, Westbury H, Hiley L, Selvey L, Rodwell B, et al.  
A morbillivirus that caused fatal disease in horses and humans.  
*Science* 1995 Apr 7;268(5207):94-7.
119. Najera J, Gomez C, Domingo-Gil E, Gherardi M, Esteban M.  
Cellular and biochemical differences between two attenuated Poxvirus vaccine candidates (MVA and NYVAC) and role of the C7L gene.  
*J Virol.* 2006 Jun; 80(12): 6033–6047.



120. Najera J, Gomez C, Garcia-Arriaza J, Sorzano C, Esteban M.  
Insertion of Vaccinia virus C7L host range gene into NYVAC-B genome potentiates immune responses against HIV-1 antigens.  
*PLoS One*. 2010; 5(6): e11406.
121. Negrete O, Levroney E, Aguilar H, Bertolotti-Ciarlet A, Nazarian R, Tajyar S, Lee B.  
EphrinB2 is the entry receptor for Nipah virus, an emergent deadly paramyxovirus.  
*Nature*. 2005 Jul 21;436(7049):401-5.
122. Nilsson C, Hejdeman B, Goday-Ramirez K, Tecleab T, Scarlatti G, Brave A, Earl P, Stout R, Robb M, Shattock R, Biberfeld G, Sandström E, Wahren B.  
HIV-DNA given with or without intradermal electroporation is safe and highly immunogenic in healthy Swedish HIV-1 DNA/MVA vaccinees: a Phase I randomized trial.  
*PLoS One*. 2015 Jun 29;10(6):e0131748.
123. Njuguna I, Ambler G, Reilly M, Ondondo B, Kanyugo M, Lohman-Payne B, Gichuhi C, Borthwick N, Black A, Mehedi S, Sun J, Maleche-Obimbo E, Chohan B, John-Stewart G, Jaoko W, Hanke T.  
PedVacc 002: a phase I/II randomized clinical trial of MVA.HIVA vaccine administered to infants born to human immunodeficiency virus type 1-positive mothers in Nairobi.  
*Vaccine*. 2014 Oct 7;32(44):5801-8.
124. O'Shea T, Cryan P, Cunningham A, Fooks A, Hayman D, Luis A, Peel A, Plowright R, Wood J.  
Bat flight and zoonotic viruses.  
*Emerg Infect Dis*. 2014 May; 20(5): 741–745.
125. Pager C, Craft W, Patch J, Dutch R.  
A mature and fusogenic form of the Nipah virus fusion protein requires proteolytic processing by cathepsin L.  
*Virology*. 2006 Mar 15;346(2):251-7.
126. Pager C, Dutch R.  
Cathepsin L is involved in proteolytic processing of the Hendra virus fusion protein.  
*J Virol*. 2005 Oct;79(20):12714-20.
127. Pallister J, Middleton D, Wang L, Klein R, Haining J, Robinson R, Yamada M, White J, Payne J, Feng Y, Chan Y, Broder C.  
A recombinant Hendra virus G glycoprotein-based subunit vaccine protects ferrets from lethal Hendra virus challenge.  
*Vaccine*. 2011 Aug 5;29(34):5623-30.
128. Patch J, Crameri G, Wang L, Eaton B, Broder C.  
Quantitative analysis of Nipah virus proteins released as virus-like particles reveals central

- role for the matrix protein.  
*Virology*. 2007 Jan 4;4:1.
129. Peel A, Baker K, Crameri G, Barr J, Hayman D, Wright E, Broder C, Fernandez-Loras A, Fooks A, Wang L, Cunningham A, Wood J.  
Henipavirus neutralising antibodies in an isolated island population of African fruit bats.  
*PLoS One*. 2012;7(1):e30346.
130. Pernet O, Lee B.  
Henipavirus receptor usage and tropism.  
*Curr Top Microbiol Immunol*. 2012;359:59-78.
131. Pernet O, Schneider B, Beaty S, LeBreton M, Yun T, Park A, Zachariah T, Bowden T, Hitchens P, Ramirez C, Daszak P, Mazet J, Freiberg A, Wolfe N, Lee B.  
Evidence for henipavirus spillover into human populations in Africa.  
*Nat Commun*. 2014 Nov 18; 5: 5342.
132. Pfeleiderer M, Wichmann O.  
Von der Zulassung von Impfstoffen zur Empfehlung durch die Ständige Impfkommission in Deutschland: Kriterien zur objektiven Bewertung von Nutzen und Risiken.  
*Bundesgesundheitsblatt* 2014 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014 (published online: 08 January 2015)
133. Pillai V, Kannanganat S, Penaloza- Macmaster P, Chennareddi L, Robinson H, Blackwell J, Amara R.  
Different patterns of expansion, contraction and memory differentiation of HIV-1 Gag-specific CD8 T cells elicited by adenovirus type 5 and modified vaccinia Ankara vaccines.  
*Vaccine*. 2011 Jul 26;29(33):5399-406.
134. Playford E, McCall B, Smith G, Slinko V, Allen G, Smith I, Moore F, Taylor C, Kung Y, Field H.  
Human Hendra virus encephalitis associated with equine outbreak, Australia, 2008.  
*Emerg Infect Dis*. 2010 Feb;16(2):219-23.
135. Plemper R, Hammond A, Cattaneo R.  
Characterization of a region of the measles virus hemagglutinin sufficient for its dimerization.  
*J Virol*. 2000 Jul;74(14):6485-93.
136. Plowright R, Eby P, Hudson P, Smith I, Westcott D, Bryden W, Middleton D, Reid P, McFarlane R, Martin G, Tabor G, Skerratt L, Anderson D, Crameri G, Quammen D, Jordan D, Freeman P, Wang L, Epstein J, Marsh G, Kung N, McCallum H.  
Ecological dynamics of emerging bat virus spillover.  
*Proc Biol Sci*. 2015 Jan 7; 282(1798): 20142124.

137. Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N.  
Identification of four conserved motifs among the RNA- dependent polymerase encoding elements.  
*EMBO J* 1989 8(12):3867-3874
138. Price P, Torres-Dominguez L, Brandmüller C, Sutter G, Lehmann M.  
Modified Vaccinia virus Ankara: innate immune activation and induction of cellular signalling.  
*Vaccine*. 2013 Sep 6;31(39):4231-4.
139. Riedel S.  
Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination.  
*Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 2005 Jan; 18(1): 21–25.
140. Rosales R, Lopez- Contreras M, Rosales C, Magallanes-Molina J, Gonzalez-Vergara R, Arroyo-Cazarez J, Ricardez-Arenas A, Del Follo-Valencia A, Padilla-Arriaga S, Guerrero M, Pirez M, Arellano-Fiore C, Villareal F.  
Regression of human papillomavirus intraepithelial lesions is induced by MVA E2 therapeutic vaccine.  
*Hum Gene Ther*. 2014 Dec;25(12):1035-49.
141. Saariaho A, Vuorela A, Freitag T, Pizza F, Plazzi G, Partinen M, Vaarala O, Meri S.  
Autoantibodies against ganglioside GM3 are associated with narcolepsy-cataplexy developing after Pandemrix vaccination against 2009 pandemic H1N1 type influenza virus.  
*J Autoimmun*. 2015 Jul 27. pii: S0896-8411(15)30009-3.
142. Said R, Amato R.  
Identification of Pre- and Post-Treatment Markers, Clinical, and Laboratory Parameters Associated with Outcome in Renal Cancer Patients Treated with MVA-5T4.  
*Front Oncol*. 2013; 3: 185.
143. Sasaki M, Setiyono A, Handharyani E, Rahmadani I, Taha S, Adiani S, Subangkit M, Sawa H, Nakamura I, Kimura T.  
Molecular detection of a novel paramyxovirus in fruit bats from Indonesia.  
*Virology Journal* 2012, 9:240
144. Selvey L, Sheridan J.  
Outbreak of severe respiratory disease in humans and horses due to a previously unrecognized Paramyxovirus.  
*J Travel Med*. 1995 Dec 1;2(4):275.
145. Selvey L, Wells R, McCormack J, Ansford A, Murray K, Rogers R, Lavercombe P, Selleck P, Sheridan J.  
Infection of humans and horses by a newly described morbillivirus.

- Med J Aust.* 1995 Jun 19;162(12):642-5.
146. Shaw M, Cardenas W, Zamarin D, Palese P, Basler C.  
Nuclear localization of the Nipah virus W protein allows for inhibition of both virus- and toll-like receptor 3-triggered signaling pathways.  
*J Virol.* 2005 May;79(10):6078-88.
147. Shaw M, Garcia- Sastre A, Palese P, Basler C.  
Nipah virus V and W proteins have a common STAT1-binding domain yet inhibit STAT1 activation from the cytoplasmic and nuclear compartments, respectively.  
*J Virol.* 2004 Jun;78(11):5633-41.
148. Smith C, Skelly C, Kung N, Roberts B, Field H.  
Flying-fox species density - a spatial risk factor for Hendra virus infection in horses in Eastern Australia.  
*PLoS One.* 2014 Jun 17;9(6):e99965.
149. Smith E, Popa A, Chang A, Masante C, Dutch R.  
Viral entry mechanisms: the increasing diversity of paramyxovirus entry.  
*FEBS J.* 2009 Dec;276(24):7217-27.
150. Smith G, Moss B.  
Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25 000 base pairs of foreign DNA.  
*Gene.* 1983 Nov;25(1):21-8.
151. Smith G, Vanderplasschen A, Law M.  
The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus.  
*J Gen Virol.* 2002 Dec;83(Pt 12):2915-31.
152. Smith I, Broos A, de Jong C, Zeddeman A, Smith C, Smith G, Moore F, Barr J, Crameri G, Marsh G, Tachedjian M, Yu M, Kung Y, Wang L, Field H.  
Identifying Hendra virus diversity in Pteropid bats.  
*PLoS One.* 2011; 6(9): e25275.
153. Song F, Fux R, Provacia L, 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.  
*J Virol.* 2013 Nov;87(21):11950-4.
154. Staib C, Drexler I, Sutter G.  
Construction and isolation of recombinant MVA.  
*Methods Mol Biol.* 2004;269:77-100.
155. Stickl H, Hochstein-Mintzel V, Mayr A, Huber H, Schäfer H, Holzner A.  
MVA vaccination against smallpox: clinical tests with an attenuated live vaccinia virus strain (MVA)

- Dtsch Med Wochenschr.* 1974 Nov 22;99(47):2386-92.
156. Stittelaar K, Kuiken T, de Swart R, van Amerongen G, Vos H, Niesters H, van Schalkwijk P, van der Kwast T, Wyatt L, Moss B, Osterhaus A.  
Safety of modified vaccinia virus Ankara (MVA) in immune-suppressed macaques.  
*Vaccine.* 2001 Jun 14;19(27):3700-9.
157. Sutter G, Moss B.  
Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Nov 15;89(22):10847-51.
158. Sutter G, Moss B.  
Novel vaccinia vector derived from the host range restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus.  
*Dev Biol Stand.* 1995;84:195-200.
159. Sutter G, Ohlmann M, Erfle V.  
Non-replicating vaccinia vector efficiently expresses bacteriophage T7 RNA polymerase.  
*FEBS Lett.* 1995 Aug 28;371(1):9-12
160. 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 Aug;12(11):1032-40.
161. Takimoto T, Taylor G, Connaris H, Crennell S, Portner A.  
Role of the hemagglutinin-neuraminidase protein in the mechanism of paramyxovirus-cell membrane fusion.  
*J Virol.* 2002 Dec;76(24):13028-33.
162. Tan C, Goh K, Wong K, Sarji S, Chua K, Chew N, Murugasu P, Loh Y, Chong H, Tan K, Thayaparan T, Kumar S, Jusoh M.  
Relapsed and late-onset Nipah encephalitis.  
*Ann Neurol.* 2002 Jun;51(6):703-8.
163. Wang L, Mackenzie J, Broder C.  
Henipaviruses.  
*Fields Virology, 6th ed.; Knipe, D.M., Howley, P.M., Eds.; Lippincott Williams & Wilkins* 2013
164. Wang L, Michalski W, Yu M, Pritchard L, Crameri G, Shiell B, Eaton B.  
A novel P/V/C gene in a new member of the Paramyxoviridae family, which causes lethal infection in humans, horses, and other animals.  
*J Virol.* 1998 Feb;72(2):1482-90.
165. Wang L, Yu M, Hansson E, Pritchard L, Shiell B, Michalski W, Eaton B.

- The exceptionally large genome of Hendra virus: support for creation of a new genus within the family Paramyxoviridae.  
*J Virol* 2000 Nov;74(21):9972-9.
166. Wang Z, Martinez J, Zhou W, La Rosa C, Srivastava T, Dasgupta A, Rawal R, Li Z, Britt W, Diamond D.  
Modified H5 promoter improves stability of insert genes while maintaining immunogenicity during extended passage of genetically engineered MVA vaccines.  
*Vaccine*. 2010 Feb 10;28(6):1547-57.
167. Weingartl H, Berhane Y, Caswell J, Loosmore S, Audonnet J, Roth J, Czub M.  
Recombinant nipah virus vaccines protect pigs against challenge.  
*J Virol*. 2006 Aug;80(16):7929-38.
168. Whitman S, Dutch R.  
Surface density of the Hendra G protein modulates Hendra F protein-promoted membrane fusion: role for Hendra G protein trafficking and degradation.  
*Virology*. 2007 July 5; 363(2): 419-429
169. Wong K, Ong K.  
Pathology of acute henipavirus infection in humans and animals.  
*Patholog Res Int*. 2011;2011:567248.
170. Wong K, Robertson T, Ong B, Chong J, Yaiw K, Wang L, Ansford A, Tannenberg A.  
Human Hendra virus infection causes acute and relapsing encephalitis.  
*Neuropathol Appl Neurobiol*. 2009 Jun;35(3):296-305.
171. Wong K, Shieh W, Kumar S, Norain K, Abdullah W, Guarner J, Goldsmith C, Chua K, Lam S, Tan C, Goh K, Chong H, Jusoh R, Rollin P, Ksiazek T, Zaki S.  
Nipah virus pathology working group. Nipah virus infection: pathology and pathogenesis of an emerging paramyxoviral zoonosis.  
*Am J Pathol*. 2002 Dec;161(6):2153-67.
172. Woodson B.  
Vaccinia mRNA synthesis under conditions which prevent uncoating.  
*Biochem Biophys Res Commun* 1967;27:169-175.
173. Wyatt L, Belyakov I, Earl P, Berzofsky J, Moss B.  
Enhanced cell surface expression, immunogenicity and genetic stability resulting from a spontaneous truncation of HIV Env expressed by a recombinant MVA.  
*Virology*. 2008 Mar 15; 372(2): 260-272.
174. Wyatt L, Carroll M, Czerny C, Merchlinsky M, Sisler J, Moss B.  
Marker rescue of the host range restriction defects of modified vaccinia virus Ankara.  
*Virology*. 1998 Nov 25;251(2):334-42.

175. Wyatt L, Earl P, Eller L, Moss B.  
Highly attenuated smallpox vaccine protects mice with and without immune deficiencies against pathogenic vaccinia virus challenge.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 30; 101(13): 4590–4595.
176. Wyatt L, Earl P, Vogt J, Eller L, Chandran D, Liu J, Robinson H, Moss B.  
Correlation of immunogenicities and in vitro expression levels of recombinant modified vaccinia virus Ankara HIV vaccines.  
*Vaccine.* 2008 Jan 24; 26(4): 486-493
177. Wyatt L, Earl P, Xiao W, Americo J, Cotter C, Vogt J, Moss B.  
Elucidating and minimizing the loss by recombinant vaccinia virus of human immunodeficiency virus gene expression resulting from spontaneous mutations and positive selection.  
*Virology.* 2009 Jul;83(14):7176-84.
178. 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 Oct;14(15):1451-8
179. Yin H, Wen X, Paterson R, Lamb R, Jardetzky T.  
Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation.  
*Nature.* 2006 Jan 5;439(7072):38-44.
180. Young P, Halpin K, Selleck P, Field H, Gravel J, Kelly M, Mackenzie J.  
Serologic evidence for the presence in Pteropus bats of a paramyxovirus related to equine morbillivirus.  
*Emerg Infect Dis.* 1996 Jul-Sep; 2(3): 239–240.
181. Yu M, Hansson E, Langedijk J, Eaton B, Wang L.  
The attachment protein of Hendra virus has high structural similarity but limited primary sequence homology compared with viruses in the genus Paramyxovirus.  
*Virology.* 1998 Nov 25;251(2):227-33.
182. Yun T, Park A, Hill T, Pernet O, Beaty S, Juelich T, Smith J, Zhang L, Wang Y, Vigant F, Gao J, Wu P, Lee B, Freiberg A.  
Efficient reverse genetics reveals genetic determinants of budding and fusogenic differences between Nipah and Hendra viruses and enables real-time monitoring of viral spread in small animal models of Henipavirus infection.  
*J Virol.* 2015 Jan 15;89(2):1242-53.
183. Zhu Z, Bossart K, Bishop K, Crameri G, Dimitrov A, McEachern J, Feng Y, Middleton D, Wang L, Broder C, Dimitrov D.

Exceptionally potent cross-reactive neutralization of Nipah and Hendra viruses by a human monoclonal antibody.

*J Infect Dis.* 2008 Mar 15;197(6):846-53.

184. Zhu Z, Dimitrov A, Bossart K, Cramer G, Bishop K, Choudhry V, Mungall B, Feng YR, Choudhary A, Zang M, Feng Y, Wang L, Xiao X, Eaton B, Broder C, Dimitrov D. Potent neutralization of Hendra and Nipah viruses by human monoclonal antibodies. *J Virol.* 2006 Jan;80(2):891-9.



## **IX. Anhang**

### **1. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Auflistung der Hendra- Ausbrüche von 1994-2010

Tabelle 2: Auflistung der bekannten Hendra-Fälle von 2011 bis heute

Tabelle 3: Chemikalien, Reagenzien und deren Herkunft

Tabelle 4: Liste der Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Liste der verwendeten Kits

Tabelle 6: Liste der Nährmedien, Zusätze und deren Hersteller

Tabelle 7: Liste der verwendeten Zelllinien und deren Nährmedien

Tabelle 8: Liste der Plasmide, deren Konstruktion und Herkunft

Tabelle 9: Liste der verwendeten Enzyme und deren Bezugsquelle

Tabelle 10: Liste der verwendeten Viren, deren Konstruktionsweise und Herkunft

Tabelle 11: Liste der verwendeten nicht-/konjugierten Antikörper

Tabelle 12: Liste der verwendeten Primer

Tabelle 13: Auflistung der verwendeten Verbrauchsgegenstände sowie deren Bezugsquellen

Tabelle 14: Auflistung der verwendeten Software und deren Anbieter

Tabelle 15: Liste der verwendeten Geräte und deren Hersteller

Tabelle 16: Darstellung der Rezeptur für die SDS-Page-Gele

## 2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ausschnitt aus The Australian vom 09.07.2011

Abbildung 2: Risikofaktoren für die Infektion mit dem Hendra-Virus

Abbildung 3: Phylogenetischer Baum basierend von ausgewählten Paramyxoviren

Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Hendra-Virus.

Abbildung 5: Genomgröße und -organisation des Hendra-Virus im Vergleich

Abbildung 6: Schematische Darstellung des Hendra-Virus

Abbildung 7: Darstellung des Fusions-Proteins der Paramyxoviridae

Abbildung 8: Darstellung des Fusionsvorgangs durch das F-Protein der Paramyxoviren

Abbildung 9: Pteropus conspicillatus/Brillenflughund

Abbildung 10: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Smallpox-Virionen

Abbildung 11: Schematische Darstellung des Prinzips der Polymerasekettenreaktion

Abbildung 12: Beispiel einer Virustiterbestimmung via Titration

Abbildung 13: Skizze des Tankblotverfahrens

Abbildung 14: Konstrukt MVA\_HeV-F

Abbildung 15: Konstrukt MVA\_HeV-G

Abbildung 16: Konstrukt MVA\_HeV-sG

Abbildung 17: PCR-Analyse MVA\_HeV-F Deletion I-VI

Abbildung 18: PCR-Analyse MVA\_HeV-G Deletion I-VI

Abbildung 19: PCR-Analyse MVA\_HeV-sG Deletion I-VI

Abbildung 20: PCR-Analyse I8R-G1L von MVA\_HeV-G und MVA\_HeV-sG

Abbildung 21: PCR-Analyse C7L

Abbildung 22: PCR-Analyse HeVF-Insert-Kontrolle MVA\_HeV-F

Abbildung 23: PCR-Analyse HeVsG-Insert-Kontrolle MVA\_HeV-sG

Abbildung 24: PCR-Analyse HeVG-Insert-Kontrolle MVA\_HeV-G

Abbildung 25: Mehrstufen-Wachstumsanalyse auf Cef-Zellen

Abbildung 26: Mehrstufen-Wachstumsanalyse auf HeLa-Zellen

Abbildung 27: Mehrstufen-Wachstumsanalyse auf Efb-Zellen

Abbildung 28: Western blot Cef-Zellen

Abbildung 29: Western blot HeLa-Zellen

Abbildung 30: Western blot Efb-Zellen

### 3. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A. dest.	Aqua destillata
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BHK-21	Baby hamster kidney fibroblasts
bp	base pairs
BSL-4	Bio safety level 4
BVD	Bovine Virus Diarrhoe
bzw	beziehungsweise
C-Terminus	Carboxy-Terminus
ca.	circa
Cef	Chicken embryo fibroblasts
CSIRO	Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation
Del	Deletion
DNA	Deoxyribonucleic acid
DR	Direct repeat
dsRNA	Double-stranded ribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEV	extracellular enveloped virion
Efb	Equine fibroblasts
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ELISpot	Enzyme Linked Immuno Spot Assay
et al.	et alii
etc.	et cetera
FCS	fetal calf serum
for	forward
FP	Fusionspeptid
FR	flank repeat
FSME	Frühsommer-Meningoenzephalitis
g	gramm
GFP	green fluorescent protein
griech.	griechisch
h	Stunde
HeLa	Henrietta Lacks-Zelllinie
HeV	Hendra-Virus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
hpi	hours post infection
HRA	Heptad-repeat region A
HRB	Heptad-repeat region B
HRP	horseradish peroxidase
IgG	Immunglobulin G
IMV	intracellular mature virion
kDa	kilo Dalton
km	kilometer
kpb	kilo base pairs
l	liter
L-Gen/-Protein	Large-Gen/-Protein
LLK-MK2	Macaca mulatta kidney cells (rhesus monkey)
log	Logarithmus
M	Molar

mA	milli Ampere
MDA5	Melanoma-differentiation-associated-protein 5
MDBK	Madin Darby Bovine Kidney
MEM	Minimal essential medium Eagle
min	Minute
mM	milli Molar
MOI	multiplicity of infection
Mock- Kontrolle	Pseudo-Kontrolle (engl. etwas vortäuschen)
mRNA	messenger ribonucleic acid
MVA	Modified Vaccinia Virus Ankara
N-Gen/-Protein	Nukleokapsid-Gen/-Protein
N-Terminus	Amino-Terminus
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEAA	Non-essential amino acid
ng	nano gramm
NiV	Nipah-Virus
nm	nano meter
NSW	New South Wales
ORF	open reading frame
P-Gen/-Protein	Phospho-Gen/-Protein
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFU	plaque forming unit
pH	potentia Hydrogenii
PVDF	Polyvinylidenfluorid
QLD	Queensland
rev	reverse
RK13	Rabbit kidney cells
rMVA	rekombinantes MVA
RNA	ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute/Umdrehungen pro Minute
SDS	sodium dodecyl sulfate
sec	Sekunde
sG	soluble G
sp.	spezies
spec.	specific
SPF	Specific pathogen free
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembrandomäne
u.a.	unter anderem
V	Volt
v.a.	vor allem
v/v	volume/volume
VacV	Vaccinia-Virus
Vero	African green monkey kidney cells (verda reno=grüne Niere)
w/v	weight/volume
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem
µl	mikro liter

## **Danksagung**

Meinen Eltern.

Für Unterstützung in jeder Lebenslage und für alles, was ich bin.

Meinem Bruder Michael.

Für seinen immerwährenden Glauben an mich und meine Fähigkeiten und seinen Humor.

Angelika.

Für stetes Aufrichten mit Weitsicht und Weisheit und für ihren Humor.

Bine.

Für Lebensweisheit und Durchblick, sowie das Lesen der Arbeit.

Robert.

Für eine immer offenstehende Tür in Kombination mit einem offenen Ohr, für Betreuung und Trost.

Michael.

Ebenfalls für ein stets offenes Ohr. Für die Begeisterung an der Wissenschaft, der Forschung und der Biologie an sich, die sie bei mir wieder geweckt hat.

Phil.

Für Spaziergänge im Englischen Garten und den Rat, der mich durch die drei Jahre gebracht hat: „You just need to persevere“.

Meine Mädels Carina, Lisa, Anna, Ellen, Katharina.

Für die Tränen, die wir zusammen geweint haben, aber vor allem für den Riesenspaß, den wir zusammen hatten. Es lebe das Doktorandenzimmer. Auf uns.

Lino und Juan.

Das dynamische spanisch- kubanische Duo. Für fachliche Hilfe und legendäre Karaokeabende.

Astrid.

Für ihren Humor und ihr fachliches Wissen. Danke für meine Ausbildung im Labor.

„Dann reite ich jetzt vom Gehöft.“

Sylvia.

Für deine Geduld im Labor mit mir, deine Unterstützung und die Gespräche.

Andrea und Christine.

Für die Gespräche bei einer Tasse Tee und eure Hilfe.

Christine.

Für die Vermittlung der nötigen Durchsetzungskraft.

Corina.

Die so manches Mal eingegriffen und mich gerettet hat. Ohne dich wäre ich das ein oder andere Mal sehr verloren gewesen.

Meinem Doktorvater Gerd.

A. Volz