

# **Weiterentwicklung des Orf-Virus Stamms D1701-V zur Verwendung als therapeutische Vektor-Vakzine**

## **Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Melanie Müller  
aus Herrenberg

Tübingen  
2019

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:	03.05.2019
Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Stefan Stevanović
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>VI</b>
<b>Abstract</b>	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VIII</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>X</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>XIII</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Impfstoffe.....	1
1.1.1 Immuntherapien gegen Krebs.....	2
1.2 Virale Vektoren.....	3
1.2.1 Poxviren.....	4
1.3 Das Orf-Virus.....	5
1.3.1 Klassifizierung.....	5
1.3.2 Morphologie.....	5
1.3.3 Das ORFV-Genom.....	6
1.3.4 Die virale Replikation.....	6
1.3.5 Die medizinische Relevanz des ORFV.....	6
1.3.6 Der ORFV-Vektor D1701-V.....	7
1.3.7 Immunantwort gegen ORFV.....	8
1.4 Das adaptive Immunsystem.....	8
1.4.1 Die Hämatopoese.....	9
1.4.2 Antigen-präsentierende Zellen.....	10
1.4.3 T-Zellen.....	10
1.4.4 Die Aktivierung von T-Zellen.....	10
1.5 Ko-stimulatorische Moleküle.....	11
1.5.1 CD80/CD86 und CD28.....	12
1.5.2 CD40L und CD40.....	14

# Inhaltsverzeichnis

1.6 Die Optimierung von viralen Vektoren.....	15
1.7 Das Humane Zytomegalievirus.....	16
1.7.1 Das Immunogen „PepTrio“ .....	16
1.8 Die Zielsetzung der Arbeit .....	17
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
2.1 Material.....	18
2.1.1 Geräte.....	18
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	19
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien .....	20
2.1.4 Enzyme.....	21
2.1.5 Kommerzielle Kits.....	21
2.1.6 Oligonukleotide .....	22
2.1.7 Antikörper.....	23
2.1.8 Software .....	25
2.1.9 Puffer und Medien.....	25
2.1.10 Viren .....	26
2.1.11 Gene und Plasmide.....	27
2.1.12 Peptide.....	27
2.1.13 Multimere .....	27
2.1.14 Zelllinien.....	27
2.1.15 Primäre humane Zellen .....	28
2.1.16 Bakterienstämme.....	28
2.1.17 Mausstämmen .....	28
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	28
2.2.1 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen.....	28
2.2.2 Agarosegelelektrophorese.....	28
2.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	29
2.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten.....	29
2.2.5 Transformation von <i>E.coli DH5<math>\alpha</math></i> ( <i>High Efficiency</i> ).....	29
2.2.6 Plasmidisolierung aus transformierten Bakterien.....	29
2.2.7 Sequenzierung.....	29
2.2.8 Isolierung viraler DNA aus infizierten Vero-Zellen .....	30
2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion.....	30
2.3 Virologische Methoden.....	31

## Inhaltsverzeichnis

2.3.1 Transfektion ORFV-infizierter Vero-Zellen.....	31
2.3.2 Selektion von ORFV-Rekombinanten.....	32
2.3.2.1 FACS-basierte Selektion der ORFV-Rekombinanten.....	32
2.3.2.2 MACS-basierte Selektion der ORFV-Rekombinanten.....	32
2.3.2.3 Selektion der ORFV-Rekombinanten mittels limitierender Verdünnung.....	33
2.3.3 Anzucht und Aufreinigung von Orf-Viren.....	33
2.3.4 Titration von Orf-Viren.....	34
2.4 Zellbiologische Methoden .....	35
2.4.1 Kultivierung von Vero-Zellen .....	35
2.4.2 Bestimmung der Lebendzellzahl .....	35
2.4.3 Isolierung von PBMCs aus Spenderblut.....	35
2.4.4 Isolierung von Monozyten aus PBMCs .....	35
2.4.5 Depletion von Monozyten aus PBMCs.....	36
2.4.6 Kultivierung von PBMCs und Monozyten.....	36
2.4.7 Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen und DCs .....	36
2.4.8 Einfrieren und Auftauen von PBMCs.....	36
2.5 Funktionelle immunologische Methoden <i>in vitro</i> .....	37
2.5.1 <i>Priming</i> von naiven T-Zellen mit ORFV-infizierten DCs.....	37
2.5.2 Expansion von Antigen-spezifischen T-Gedächtniszellen.....	38
2.6 Funktionelle immunologische Methoden <i>in vivo</i> .....	38
2.6.1 Immunisierung von Mäusen .....	38
2.6.2 Entnahme von Blut .....	38
2.6.3 Entnahme von Blutserum .....	39
2.6.4 Isolierung von Splenozyten.....	39
2.6.5 Tumormodell.....	39
2.7 Analytische Methoden.....	40
2.7.1 Ovalbumin-spezifischer IgG1- und IgG2-ELISA.....	40
2.7.2 <i>Cytometric Bead Array</i> .....	40
2.7.3 Färbung von Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie.....	40
2.7.4 Durchflusszytometrie.....	40
2.7.4.1 Hemmung des Fc-Rezeptors.....	41
2.7.4.2 Färbung mit Multimeren .....	41
2.7.4.3 Bestimmung der Zell-Viabilität.....	41
2.7.4.4 Extrazelluläre Antikörperfärbung.....	41
2.7.4.5 Intrazelluläre Zytokinfärbung.....	42

## Inhaltsverzeichnis

2.7.4.6 Fixierung der Zellen für die Durchflusszytometrie.....	42
2.7.5 Gating-Strategien.....	43
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>48</b>
3.1 Mechanismus der ORFV-induzierten Immunstimulierung .....	49
3.1.1 Zell-Tropismus von ORFV in humanen Leukozyten.....	49
3.1.2 Infektion von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen.....	51
3.1.3 Analyse der Aktivierung von humanen APCs und PBMCs nach ORFV-Infektion.....	52
3.1.4 Analyse der Zytokinproduktion von ORFV-infizierten DCs und PBMCs.....	69
3.1.5 Analyse des Aufnahmemechanismus von ORFV durch Antigen-präsentierende Zellen...	75
3.1.6 Induktion von Antigen-spezifischen T-Zell-Antworten <i>in vitro</i> .....	83
3.1.7 Induktion von Antigen-spezifischen T-Zell-Antworten <i>in vivo</i> .....	87
3.2 Herstellung und Charakterisierung CD80 und CD40L exprimierender ORFV-Rekombinanten .....	89
3.2.1 Herstellung der Transferplasmide .....	89
3.2.1.1 pD12-PepTrio-2-Cherry .....	89
3.2.1.2 pD12-CD80 und pV12-CD80.....	90
3.2.2 Herstellung der ORFV-Rekombinanten .....	92
3.2.2.1 V-CD4-D12-PepTrio-2-Cherry .....	92
3.2.2.2 V12-CD80-D12-PepTrio-2-Cherry und V-CD40L-2-CD80-D12-PepTrio-2-Cherry....	94
3.2.2.3 V-mCD40L-D12-Ova-2-GFP.....	96
3.2.2.4 V12-mCD80-D12-Ova-2-GFP und V-mCD40L-2-mCD80-D12-Ova-2-GFP .....	97
3.2.3 Charakterisierung CD80 und CD40L exprimierender ORFV-Rekombinanten <i>in vitro</i> .....	99
3.2.3.1 Analyse der Transgen-Expression mittels Durchflusszytometrie.....	99
3.2.3.2 Analyse der Transgen-Expression mittels Immunfluoreszenz.....	104
3.2.3.3 Analyse der Aktivierung von humanen DCs durch ORFV-Infektion .....	108
3.2.3.4 Analyse der Aktivierung von humanen PBMCs durch ORFV-Infektion .....	113
3.2.3.5 Analyse der Zytokinproduktion von ORFV-infizierten DCs und PBMCs.....	118
3.2.3.6 Induktion von Antigen-spezifischen Immunantworten <i>in vitro</i> .....	127
3.2.4 Charakterisierung CD80 und CD40L exprimierender ORFV-Rekombinanten <i>in vivo</i> .....	133
3.2.4.1 Induktion von Ova-spezifischen Immunantworten.....	133
3.2.4.2 Die Effizienz der ORFV-Rekombinanten im Tumormodell.....	137

# Inhaltsverzeichnis

<b>4. Diskussion</b>	<b>142</b>
4.1 Mechanismus der ORFV-induzierten Immunstimulierung .....	142
4.1.1 Zell-Tropismus von ORFV in humanen Leukozyten.....	142
4.1.2 Aktivierung von humanen APCs und PBMCs nach ORFV-Infektion.....	144
4.1.3 Induktion von Antigen-spezifischen T-Zell-Antworten.....	148
4.2 Charakterisierung CD40L und CD80 exprimierender ORFV-Rekombinanten.....	149
4.2.1 Charakterisierung der CD40L exprimierenden ORFV-Rekombinanten .....	149
4.2.2 Charakterisierung der CD80 exprimierenden ORFV-Rekombinanten .....	152
4.2.3 Charakterisierung der CD40L-CD80 exprimierenden ORFV-Rekombinanten.....	153
<b>Anhang</b>	<b>157</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>163</b>

# Zusammenfassung

---

Virale Vektoren stellen eine vielversprechende Technologie für die Entwicklung von Impfstoffen dar, da sie starke humorale und zelluläre Immunantworten induzieren können. Neben dem Einsatz als prophylaktische Vakzine gegen Infektionskrankheiten werden sie auch zur therapeutischen Behandlung von Krebs weiterentwickelt. Das *Parapoxvirus ovis* oder Orf Virus (ORFV) gehört zur Familie der *Poxviridae*. Der attenuierte und apathogene Stamm D1701-V weist mehrere Besonderheiten auf, die ihn als neuen viralen Vektor interessant machen. ORFV-basierte rekombinante Vakzine wurden in der Vergangenheit als prophylaktische Impfstoffe getestet und konnten dabei starke und langlebige Immunantworten in verschiedenen Tiermodellen induzieren, sowie Schutz gegen eine nachfolgende Infektion vermitteln. In wie weit diese Impfstoffe zelluläre Immunantworten induzieren und sich zur therapeutischen Vakzinierung eignen, ist bislang nicht beschrieben.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden der Mechanismus der Immunstimulierung und die Induktion von Antigen-spezifischen zellulären Immunantworten durch ORFV D1701-V untersucht. Mit Hilfe einer mCherry-exprimierenden ORFV-Rekombinanten konnte nachgewiesen werden, dass nach Infektion von mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMCs) professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APCs) infiziert werden und dass ORFV mittels Phagozytose und Makropinozytose in diese Zellen gelangt. Dies führt zur Aktivierung der APCs, was sich in der Hochregulierung von Aktivierungsmarkern wie beispielsweise CD80, CD83, CD86 oder HLA-DR sowie der Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und CXCL10 äußerte. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der APCs ausreicht, um Antigen-spezifische T-Zell-Antworten gegen ein ORFV-exprimiertes HLA-A\*02-restringiertes HCMV Peptid *in vitro* zu induzieren. Sowohl die Expansion von Antigen-spezifischen T-Gedächtniszellen als auch die Aktivierung von naiven T-Zellen war erfolgreich. Zusätzlich bestätigte die Immunisierung von Mäusen mit einem Ovalbumin-exprimierenden ORFV, dass vor allem nach intravenöser Immunisierung eine starke Antigen-spezifische zelluläre Immunantwort induziert wird.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die immunstimulierenden Eigenschaften des Vektors durch Ko-Expression der Moleküle CD40L, CD80 und CD40L/CD80 weiter zu verbessern. Es konnte gezeigt werden, dass die Ko-Expression von CD40L zu einer gesteigerten Expression der Aktivierungsmarker CD80, CD83, CD86 und HLA-DR auf infizierten DCs führt und vermehrt pro-inflammatorische Zytokine produziert werden. Die Ko-Expression von CD80 führte hingegen zu einer verstärkten Aktivierung von Antigen-spezifischen T-Gedächtniszellen. Die kombinierte Expression von CD40L und CD80 zeigte die beste Immunstimulierung: Neben der erhöhten DC-Aktivierung und einer gesteigerten Expansion von T-Gedächtniszellen wurden auch naive T-Zellen *in vitro* am effizientesten stimuliert. Die Ergebnisse konnten mithilfe von *in vivo*-Studien bestätigt werden. So führte die therapeutische Immunisierung von Tumor-tragenden Mäusen mit einer CD40L-CD80 exprimierenden ORFV-Rekombinanten zur Tumorregression sowie zu vollständiger Remission in einem Drittel der immunisierten Mäuse.

# Abstract

---

Viral vectors represent an attractive technology for the development of recombinant vaccines because of their potential to induce strong humoral and cellular immune responses. Beside their application as vaccines against infectious diseases they were recently adapted for the development of therapeutic cancer vaccines. The *Parapoxvirus ovis* or Orf virus (ORFV) belongs to the family of *Poxviridae*. The highly attenuated and apathogenic ORFV strain D1701-V offers several advantageous properties for an interesting viral vector candidate. ORFV-based vectors were tested in the past as prophylactic vaccines and induced strong and long-lasting immune responses in different animal species and mediated protection against subsequent infections. The extent of ORFV D1701-V to induce a cellular immune response as well as its utility for therapeutic vaccinations is not described yet.

In the first part of this work the mechanism of immune stimulation and the induction of antigen-specific cellular immune responses by ORFV D1701-V were investigated. With the aid of a recombinant ORFV expressing the fluorescent marker protein mCherry professional antigen-presenting cells (APCs) among human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were identified as the ORFV infectable immune cells. It was further shown that the infection occurs via phagocytosis and macropinocytosis. After infection the APCs became activated which was demonstrated by the upregulation of activation markers as CD80, CD83, CD86 or HLA-DR and the production of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and CXCL10. Additionally, it could be shown that the activation of APCs is sufficient to induce strong antigen-specific T cell responses against an ORFV expressed HLA-A\*02-restricted HCMV peptide *in vitro*. Both expansion of antigen-specific memory T cells and priming of naïve T cells were performed successfully. In addition, the immunization of mice with an Ovalbumin expressing ORFV revealed the induction of strong antigen-specific cellular immune responses, especially after intravenous immunization.

Another aim of this work was to improve the immune stimulatory properties of ORFV vector D1701-V by the co-expression of the molecules CD40L, CD80 and CD40L/CD80. The co-expression of CD40L resulted in the enhanced expression of the activation markers CD80, CD83, CD86 and HLA-DR of DCs and the increased production of pro-inflammatory cytokines. The co-expression of CD80 induced strong activation of antigen-specific memory T cells. The combined expression of CD40L and CD80 showed the best immune stimulatory properties: Beside the increased activation of DCs and the enhanced expansion of memory T cells the *in vitro* activation of naïve T cells was stimulated most efficiently. These results could be confirmed by *in vivo* studies. The therapeutic immunization of tumor-bearing mice with a CD40L-CD80 expressing ORFV recombinant led to tumor regression and to the complete remission in one third of the immunized mice.

# Abkürzungsverzeichnis

---

°C	Grad Celsius
α	anti
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
APC	<i>Antigen presenting cell</i> , Antigen-präsentierende Zelle
BMDCs	<i>bone marrow-derived dendritic cells</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
BV	Brilliant Violett
bzw.	beziehungsweise
CAR-T-Zellen	chimäre Antigenrezeptor T-Zellen
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD40L	CD40-Ligand
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CPE	Zytopathischer Effekt
CPI	Immun-Checkpoint-Inhibitoren
CTLA-4	<i>Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4</i>
Da	Dalton
DC	Dendritische Zelle
ddH <sub>2</sub> O	doppelt-destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EtOH	Ethanol
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> , fötales Kälberserum
FSC	<i>Forward Scatter</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , grün-fluoreszierendes Protein
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
Gy	Gray
h	Stunde(n)
HCMV	Humanes Zytomegalievirus
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> , humanes Leukozytenantigen
i.d.	intradermal
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ITR	<i>Inverted terminal repeats</i>
kDa	Kilodalton
kbp	Kilobasenpaare
l	Liter

LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
MACS	<i>Magnetic Cell Separation</i>
MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
mg	Milligramm
ml	Milliliter
min	Minute
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
MVA	Modified Vaccinia Ankara Virus
ng	Nanogramm
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
ORF	<i>Open reading frame</i>
ORFV	Orf Virus
Ova	Ovalbumin
P	Promotor
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> , mononukleäre Zellen des peripheren Bluts
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pg	Pikogramm
pfu	<i>plaque forming units</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
s.c.	subkutan
sCD40L	<i>soluble CD40L</i> , löslicher CD40L
SOC	<i>Super Optimal Broth</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
TCM	<i>T cell medium</i> , T-Zell-Medium
T <sub>CM</sub>	<i>Central memory T cells</i> , zentrale T-Gedächtniszellen
TCR	<i>T Cell Receptor</i> , T-Zell-Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRICOM	<i>Triad of Costimulatory Molecules</i>
U	Unit
VACV	Vaccinia Virus
vegf	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VT	Versen Trypsin
v/v	<i>volume per volume</i>
x g	relative Erdbeschleunigung

# Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 1.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines ORFV-Partikels.....	5
Abbildung 1.2: Karte der genomischen Deletionen durch die Adaption an Vero-Zellen.....	7
Abbildung 1.3: Die Hämatopoese entlang der myeloiden und lymphoiden Entwicklungslinie.....	9
Abbildung 1.4: Aktivierung von T-Zellen durch eine Dendritische Zelle (DC).....	11
Abbildung 1.5: Die ko-stimulatorischen Moleküle der Immunglobulin-Superfamilie.....	13
Abbildung 1.6: Schematischer Aufbau des artifiziellen Antigens „PepTrio“.....	16
Abbildung 2.1: Verteilung der Virusverdünnungsstufen in einer 24-Lochplatte für die Titration von Orf-Viren.....	34
Abbildung 2.2: Angewandte Gating-Strategie zur Analyse von DCs, Monozyten und Makrophagen.....	43
Abbildung 2.3: <i>Gating</i> -Strategie zur Analyse von PBMCs.....	44
Abbildung 2.4: <i>Gating</i> -Strategie zur Analyse der Tetramer-Färbungen.....	45
Abbildung 2.5: <i>Gating</i> -Strategie zur Analyse der Zytokinproduktion Antigen-spezifischer T-Zellen.....	46
Abbildung 2.6: <i>Gating</i> -Strategie zur Analyse der Dextramer-Färbungen.....	47
Abbildung 2.7: <i>Gating</i> -Strategie zur Analyse der Zytokinproduktion von murinen Antigen-spezifischen T-Zellen.....	48
Abbildung 3.1: Analyse der mCherry-Expression nach Infektion von humanen PBMCs.....	50
Abbildung 3.2: Kinetik der mCherry-Expression in infizierten APCs.....	52
Abbildung 3.3: Analyse der Viabilität, Infektionsrate und Aktivierung von Monozyten nach Infektion mit V-D12-Cherry.....	55
Abbildung 3.4: Aktivierung von Monozyten nach Infektion mit V-D12-Cherry.....	56
Abbildung 3.5: Analyse der Viabilität, Infektionsrate und Aktivierung von Makrophagen nach Infektion mit V-D12-Cherry.....	58
Abbildung 3.6: Aktivierung von Makrophagen nach Infektion mit V-D12-Cherry.....	59
Abbildung 3.7: Analyse der Viabilität, Infektionsrate und Aktivierung von DCs nach Infektion mit V-D12-Cherry.....	61
Abbildung 3.8: Aktivierung von DCs nach Infektion mit V-D12-Cherry.....	62
Abbildung 3.9: Aktivierung von humanen PBMCs durch Infektion mit V-D12-Cherry.....	65
Abbildung 3.10: Analyse der Aktivierung von Monozyten-depletierten PBMCs.....	68
Abbildung 3.11: Analyse der Zytokin-Produktion von DCs nach 24 h Infektion mit V-D12-Cherry.....	70
Abbildung 3.12: Analyse der Zytokin-Produktion von DCs 4 h - 72 h nach Infektion mit V-D12-Cherry.....	72
Abbildung 3.13: Analyse der Chemokin-Produktion von PBMCs nach 24 h Infektion mit V-D12-Cherry.....	74
Abbildung 3.14: Analyse der Infektionsrate von APCs nach Behandlung mit Cytochalasin D.....	76
Abbildung 3.15: Analyse der Infektionsrate von APCs nach Behandlung mit Rottlerin.....	78
Abbildung 3.16: Analyse der Infektionsrate von iDCs und mDCs.....	80
Abbildung 3.17: Analyse der Aufnahmefähigkeit von V-GFP nach Infektion mit V-D12-Cherry..	82
Abbildung 3.18: Nachweis von NLVPMVATV-spezifischen T-Gedächtniszellen <i>ex vivo</i> und 5 Tage nach Peptid-Stimulierung.....	84
Abbildung 3.19: Analyse der Expansion und Funktionalität von T-Gedächtniszellen nach Infektion mit PepTrio-ORFV.....	85

Abbildung 3.20: Analyse des <i>in vitro priming</i> von naiven T-Zellen durch PepTrio-ORFV-infizierte DCs .....	86
Abbildung 3.21: Die Ova-spezifische T-Zell-Antwort <i>in vivo</i> nach Immunisierung mit Ova-ORFV .....	88
Abbildung 3.22: Restriktionsverdau von pD12-Cherry und pD12-PepTrio-2-Cherry.....	90
Abbildung 3.23: Restriktionsverdau von pD12-Cherry und pD12-CD80 .....	91
Abbildung 3.24: Restriktionsverdau von pD12-CD80, pV12-Cherry und pV12-CD80 .....	92
Abbildung 3.25: Nachweis-PCRs zur genomischen Typisierung von V-CD4-D12-PepTrio-2-Cherry.....	93
Abbildung 3.26: 374/R PCR zur Verifikation von V12-CD80-D12-PepTrio-2-Cherry und V-CD40L-2-CD80-D12-PepTrio-2-Cherry .....	95
Abbildung 3.27: Nachweis-PCRs zur genomischen Typisierung von V12-CD80-D12-PepTrio-2-Cherry und V-CD40L-2-CD80-D12-PepTrio-2-Cherry.....	95
Abbildung 3.28: Nachweis-PCRs zur genomischen Typisierung von V-mCD40L-D12-Ova-2-GFP .....	96
Abbildung 3.29: Nachweis-PCRs zur genomischen Typisierung von V12-mCD80-D12-Ova-2-GFP und V-mCD40L-2-mCD80-D12-Ova-2-GFP .....	98
Abbildung 3.30: Analyse ORFV-infizierter DCs auf Expression der humanen Transgene .....	100
Abbildung 3.31: Analyse ORFV-infizierter Vero-Zellen auf Expression der murinen Transgene .....	102
Abbildung 3.32: Analyse der Expression humaner Transgene auf infizierten DCs mittels Immunfluoreszenz.....	105
Abbildung 3.33: Analyse der Expression der murinen Transgene auf infizierten Vero-Zellen mittels Immunfluoreszenz .....	107
Abbildung 3.34: Aktivierung von DCs nach Infektion mit ORFV-Rekombinanten.....	110
Abbildung 3.35: Aktivierung von DCs 10 verschiedener Spender nach Infektion mit ORFV-Rekombinanten .....	113
Abbildung 3.36: Aktivierung von humanen PBMCs nach Infektion mit ORFV-Rekombinanten .....	115
Abbildung 3.37: Aktivierung von humanen PBMCs 10 verschiedener Spender nach Infektion mit ORFV-Rekombinanten.....	117
Abbildung 3.38: Analyse der Zytokin-Produktion von DCs 24 h nach Infektion mit ORFV-Rekombinanten .....	121
Abbildung 3.39: Analyse der Zytokin-Produktion von DCs 4 h - 72 h nach Infektion mit ORFV-Rekombinanten .....	123
Abbildung 3.40: Analyse der Zytokin-Produktion von PBMCs nach 24 h Infektion mit ORFV-Rekombinanten .....	126
Abbildung 3.41: Analyse der Expansion und Funktionalität von T-Gedächtniszellen nach Infektion mit ORFV-Rekombinanten.....	129
Abbildung 3.42: Expansion und Funktionalität von T-Gedächtniszellen 7 verschiedener Spender nach Infektion mit ORFV-Rekombinanten .....	130
Abbildung 3.43: <i>Priming</i> naiver T-Zellen mittels ORFV-infizierter DCs .....	131
Abbildung 3.44: <i>Priming</i> von naiven T-Zellen 3 verschiedener Spender mittels ORFV-infizierter DCs .....	132
Abbildung 3.45: SIINFEKL-spezifische CD8+ T-Zell-Antwort nach Immunisierung mit verschiedenen ORFV-Rekombinanten .....	134
Abbildung 3.46: Analyse der Funktionalität SIINFEKL-spezifischer CD8+ T-Zellen nach <i>in vivo</i> -Immunisierung mit verschiedenen ORFV-Rekombinanten.....	136

Abbildung 3.47: Quantifizierung Ova-spezifischer IgG1- und IgG2-Antikörper nach Immunisierung mit verschiedenen ORFV-Rekombinanten .....	137
Abbildung 3.48: Anti-tumorale Wirksamkeit verschiedener ORFV-Rekombinanten im Tumormodell B16-F10(OVA) .....	140
Abbildung 3.49: <i>Antigen Spread</i> nach Tumorthherapie mit ORFV-Rekombinanten .....	141
Abbildung 0.1: Plasmidkarte des generierten Plasmids pD12-PepTrio-2-Cherry .....	157
Abbildung 0.2: Plasmidkarte des generierten Plasmids pD12-CD80.....	158
Abbildung 0.3: Plasmidkarte des generierten Plasmids pV12-CD80.....	159
Abbildung 0.4: Anti-tumorale Wirksamkeit verschiedener ORFV-Rekombinanten im Tumormodell B16-F10(OVA) .....	161
Abbildung 0.5: <i>Antigen-Spread</i> nach Tumorthherapie mit ORFV-Rekombinanten.....	162

# Tabellenverzeichnis

---

Tabelle 2.1: Verwendete forward (F) und reverse (R) Primer, deren Nukleotidsequenz in 5'-3'- Richtung, sowie ggf. Angaben der Größe der amplifizierten DNA-Fragmente .....	22
Tabelle 2.2: Zur FACS-Analyse eingesetzte Antikörper, der Antikörper-Klon sowie gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe, eingesetzte Verdünnung und Hersteller.....	23
Tabelle 2.3: Verwendete Isotypen-Kontrollen sowie gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe und Hersteller.....	24
Tabelle 2.4: Zur Fluoreszenzmikroskopie eingesetzte Antikörper, der Antikörper-Klon sowie gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe, eingesetzte Verdünnung und Hersteller .....	24
Tabelle 2.5: Im ELISA eingesetzte Antikörper, der Antikörper-Klon sowie eingesetzte Konzentration und Hersteller.....	24
Tabelle 2.6: <i>In vivo</i> eingesetzte Antikörper, der Antikörper-Klon sowie eingesetzte Konzentration und Hersteller.....	24
Tabelle 2.7: Verwendete Peptide, deren Proteinquelle und Hersteller .....	27
Tabelle 2.8: Verwendete Multimere, das gebundene Epitop, das konjugierte Fluorochrom und der Hersteller .....	27
Tabelle 2.9: Temperaturprofile der verwendeten PCRs.....	31
Tabelle 3.1: Anteil CD40L exprimierender DCs und MFI von CD40L nach Infektion.....	101
Tabelle 3.2: Anteil CD80 exprimierender DCs und MFI von CD80 nach Infektion.....	101
Tabelle 3.3: Anteil mCD40L exprimierender Vero-Zellen und MFI von mCD40L nach Infektion .....	103
Tabelle 3.4: Anteil mCD80 exprimierender Vero-Zellen und MFI von mCD80 nach Infektion ....	103
Tabelle 3.5: Anteil infizierter DCs und MFI der Aktivierungsmarker .....	111
Tabelle 3.6: Anzahl positiver Replikate nach <i>Priming</i> von naïven T-Zellen .....	132
Tabelle 3.7: Anteil der Nonresponder, Partiellen Responder und Kompletten Responder im Tumormodell sowie die Inhibierung des Tumorwachstums.....	139

# 1 - Einleitung

---

## 1.1 Impfstoffe

Prophylaktische Impfstoffe gegen Infektionskrankheiten gehören zu den erfolgreichsten Errungenschaften der Medizin. Im 18. Jahrhundert gelang Edward Jenner der erste Durchbruch mit der Erkenntnis, dass zuvor an Kuhpocken erkrankte Personen gegen eine Infektion durch echte Pocken (Variola) geschützt waren [1-3]. Im 20. Jahrhundert lag die geschätzte Zahl der pockenbedingten Todesfälle weltweit bei ca. 375 Millionen. Durch breit angelegte Pocken-Impfkampagnen gelang es, die Pocken erfolgreich auszurotten, sodass seit 1978 kein Todesfall aufgrund von Pocken zu beklagen war [4]. Auch Krankheiten wie z.B. Polio, Masern, Mumps und Röteln konnten durch den Einsatz von Impfstoffen stark zurückgedrängt werden. So ging der Anteil der Todesfälle durch Maserninfektion nach Einführung des Masern-Impfstoffes weltweit um 84 % zurück [5]. Auch die Fälle von Polio-Infektionen zeigten einen Rückgang um 99 %. 2013 wurden weltweit nur 400 Fälle einer Polio-Infektion gemeldet [6]. Mittlerweile sind weltweit mehr als 70 Impfstoffe gegen ca. 30 verschiedene Erreger zugelassen.

Prophylaktische Impfstoffe werden in attenuierte Lebendimpfstoffe und Totimpfstoffe unterteilt: Bei den attenuierten Lebendimpfstoffen handelt es sich um abgeschwächte, replikationsfähige Versionen der Erreger. Hierzu zählen z.B. die Impfstoffe gegen Pocken, Gelbfieber, Masern, Mumps oder Röteln. Attenuierte Lebendimpfstoffe induzieren eine sehr starke Immunantwort und schützen bereits häufig nach nur einer Immunisierung für viele Jahre [7]. Bei den Totimpfstoffen handelt es sich um abgetötete Erregerbestandteile, wie das inaktivierte Toxin bei den Diphtherie- und Tetanus-Impfstoffen, das Polysaccharid beim Meningokokken-Impfstoff oder um einzelne Proteine des Erregers, wie es beim Hepatitis B-Impfstoff der Fall ist [1, 7]. Die Impfung mit Totimpfstoffen erfolgt in der Regel in Kombination mit sogenannten Adjuvantien. Diese Hilfsstoffe sind meist Öl-in-Wasser Emulsionen oder basieren auf Aluminiumsalzen und dienen dazu, die durch die Impfung induzierte Immunantwort zu verstärken. Im Gegensatz zu den attenuierten Lebendimpfstoffen ist der induzierte Schutz nach Impfung mit einem Totimpfstoff von kürzerer Dauer. Daher werden für einen dauerhaften Schutz wiederholte Impfungen benötigt [7]. Neben den klassischen Impfstofftypen gibt es auch neue Konzepte. Gerade im Feld der Krebsimpfstoffe werden zum Beispiel Impfstoffe auf DNA-, RNA-, Peptid- oder Proteinbasis, sowie auf Basis von bestrahlten Tumorzellen verwendet. Mit den rekombinanten viralen Vektoren ist in den letzten Jahren eine weitere sehr vielversprechende Technologie zur Entwicklung von Vakzinen aufgekommen [8-12].

Ziel einer prophylaktischen Impfung gegen Infektionskrankheiten ist die Induktion einer schützenden, langlebigen Immunantwort gegen Antigene des Erregers ohne dabei eine Infektionserkrankung auszulösen. Für die Ausbildung einer effektiven Immunantwort werden verschiedene Teile des Immunsystems benötigt. Die Bildung von Antigen-spezifischen neutralisierenden Antikörpern und Gedächtniszellen spielt eine wichtige Rolle in der Ausbildung einer schützenden Immunantwort. Diese leiten bei einer Infektion eine spezifische Immunantwort ein, wodurch der Erreger schnell bekämpft werden kann [7, 13, 14].

## Einleitung

In der Vergangenheit gab es im Bereich der Impfstoffforschung wichtige Weiterentwicklungen. Neben den prophylaktischen Impfstoffen geraten vermehrt therapeutische Impfstoffe gegen Infektionskrankheiten und Tumorerkrankungen in den wissenschaftlichen Fokus. Letztere stehen vor allem seit dem Durchbruch der Krebsimmuntherapie im Vordergrund [10, 15-18].

### 1.1.1 Immuntherapien gegen Krebs

Als Krebs werden unterschiedliche Krankheiten bezeichnet, die das unkontrollierte Wachstum und die Anreicherung entarteter, maligner Zellen gemeinsam haben. Durch Akkumulation der malignen Zellen entstehen Tumore, die in der Lage sind über Blut- und Lymphbahnen in andere Gewebe zu migrieren und Tochtergeschwülste (Metastasen) zu bilden. Krebs zählt mit knapp einer halben Million Neuerkrankungen im Jahr zu den häufigsten Erkrankungen in Deutschland und gehört mit weltweit 9,6 Millionen Todesfällen zu der zweithäufigsten Todesursache nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen [19]. Laut Robert-Koch-Institut werden die Zahlen der Neuerkrankungen bis 2020 weiter steigen [20].

Als konventionelle Therapien gelten seit vielen Jahren die chirurgische Resektion des Tumors sowie die Chemo- oder Strahlentherapie. Bei metastasierendem Krebs oder dem Zurückbleiben weniger maligner Zellen, die zu einer Wiederkehr der Krebserkrankung (*Relapse*) führen können, stoßen diese Therapien allerdings an ihre Grenzen [21]. Des Weiteren sind die Therapien in ihrer Wirkung sehr unspezifisch. Neben der Zerstörung von Tumorzellen beschädigen sie auch gesundes Gewebe, weshalb starke Nebenwirkungen auftreten können. Wissenschaftliche Erkenntnisse in der Tumor-Immunbiologie ebneten den Weg für weitere Krebstherapien, die Immuntherapien. Bei diesen Therapien wird das körpereigene Immunsystem genutzt, um die Tumorzellen spezifisch und mit geringen Nebenwirkungen zu eliminieren. Die Ausbildung einer adaptiven Immunantwort und eines immunologischen Gedächtnisses soll zu einem verlängerten Überleben der Patienten führen [21].

Einen ersten Ansatz zur Krebs-Immuntherapie gab es bereits im 19. Jahrhundert. William B. Coley löste durch die intratumorale Injektion von abgetöteten Bakterien eine Entzündungsreaktion aus, die zu einer Aktivierung des Immunsystems gegen den Tumor führte. Bei manchen Patienten bewirkte dies einen Rückgang des Tumors [22]. Wenig später postulierte Paul Ehrlich das Konzept der Immunüberwachung (*immunosurveillance*). Er stellte die Hypothese auf, dass die Entstehung von malignen Zellen ein häufig auftretender Prozess ist, das Immunsystem jedoch die Bildung von Tumoren unterdrückt [23]. Diese Hypothese wurde von Lewis Thomas und Sir Frank MacFarlane Burnet weiter ausgebaut. Sie waren davon überzeugt, dass maligne Zellen durch Lymphozyten anhand spezifischer Tumor-Antigene erkannt und eliminiert werden [24]. Schließlich beschrieb die Gruppe um Robert D. Schreiber ein Konzept, bei welchem das Immunsystem eine Doppelrolle einnimmt und das sowohl die Unterdrückung des Tumorwachstums als auch die Unterstützung der Tumorentwicklung beschreibt (*cancer immunoediting*) [25]. Durch die Interaktion von Tumorzellen, Immunzellen und der Tumorumgebung entstehen drei aufeinanderfolgende Phasen, die Eliminierung, das Equilibrium und der *Escape*. Die Eliminierung ist gleichzusetzen mit der ursprünglich beschriebenen Immunüberwachung, bei welcher maligne Zellen vom Immunsystem erkannt und zerstört werden. Das Equilibrium beschreibt den Zustand, bei welchem maligne Zellen die Eliminierung überlebt haben. Unter großem Selektionsdruck entstehen Tumorzellen mit Mutationen, die vor einer Eliminierung durch das Immunsystems geschützt sind. Während der

## Einleitung

*Escape* Phase expandieren die entstandenen Varianten der Tumorzellen unkontrolliert und führen zu einer klinisch nachweisbaren Erkrankung [25].

Eine erfolgreiche Immuntherapie sollte daher die Immunzellen spezifisch gegen maligne Zellen aktivieren, um deren Eliminierung zu bewirken oder die Unterdrückung der Immunantwort in der Tumorumgebung verhindern. Im Feld der Krebs-Immuntherapie wird zwischen aktiver und passiver Immuntherapie unterschieden. Ziel der passiven Immuntherapie ist es eine bereits existierende anti-tumorale Immunantwort zu reaktivieren. Dies erfolgt zum Beispiel über Zytokine, den adoptiven Zelltransfer von tumorinfiltrierenden Lymphozyten oder CAR-T-Zellen (chimäre Antigenrezeptor T-Zellen) oder monoklonale Antikörper [26]. Bei der aktiven Immuntherapie werden Immunzellen spezifisch oder unspezifisch gegen Tumorzellen aktiviert, um diese zu eliminieren. Eine Möglichkeit bietet hierbei die Verwendung von Antikörpern gegen Immun-Checkpoint-Inhibitoren (CPI) [26]. Eine weitere Form der aktiven Immuntherapie ist die Immunisierung mit tumorassoziierten Antigenen in Form von synthetisch hergestellten Proteinen oder Peptiden zusammen mit einem Adjuvanz, welches die Aktivierung der Immunzellen und folglich die optimale Präsentation der Peptide bewirkt. Nach der Aufnahme der Proteine bzw. Peptide durch Dendritische Zellen (DCs) erfolgt die Prozessierung und Präsentation der Epitope und die Aktivierung von spezifischen T-Zellen [27, 28]. Bei der Vakzinierung von Peptiden muss der verwendete Peptid-Cocktail an den HLA-Haplotyp des jeweiligen Patienten angepasst werden. Eine weitere Form der aktiven Immuntherapie stellt die Vakzinierung mit körpereigenen DCs dar. Nach *ex vivo* Beladung der DCs mit tumorassoziierten Peptiden oder Proteinen können diese im Patienten wiederum spezifische T-Zellen aktivieren [29]. Eine weitere sehr vielversprechende Möglichkeit der aktiven Immuntherapie stellt die Verwendung rekombinanter viraler Vektoren dar welche auch die Grundlage dieser Arbeit darstellen und folglich ausführlicher beschrieben werden.

### 1.2 Virale Vektoren

1972 beschrieben Jackson et al. erstmalig die Herstellung eines viralen Vektors durch die Integration rekombinanter DNA in das Simian-Virus 40 [30]. Die stabile Integration und Expression von Fremd-DNA durch das Vaccinia Virus konnte 10 Jahre später von der Gruppe um Moss demonstriert werden [31]. Derselben Gruppe gelang es daraufhin auch, ein für Vakzinierungen anwendbares rekombinantes Vaccinia Virus herzustellen, welches das Hepatitis B Oberflächenantigen (HBsAg) exprimiert. Mit Hilfe dieses Vektors gelang es erstmalig eine Immunantwort gegen das integrierte Antigen zu induzieren, die Schimpansen vor einer Hepatitis B Infektion schützte [32, 33]. Mittlerweile gelten virale Vektoren in den Feldern der Gentherapie und der Impfstoffe als vielversprechende Werkzeuge [8, 34]. Das angeborene Immunsystem wird durch virale Bestandteile stimuliert, was zur Produktion von Interferonen und weiteren inflammatorischen Zytokinen führt [9, 35]. Dadurch besitzen virale Vektoren eine hohe Immunogenität, sodass sie ohne weiteres Adjuvanz verwendet werden können [12]. Für einige virale Vektoren konnte die Infektion von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APCs), insbesondere DCs, nachgewiesen werden. In infizierten Zellen erfolgt nachfolgend die Expression der in den Vektoren integrierten Antigene, sowie deren Prozessierung und Präsentation [9, 36-38]. Die Transgene werden somit verstärkt exprimiert und präsentiert, was in einer gesteigerten Antigen-spezifischen Immunantwort resultiert [39, 40]. Studien haben gezeigt, dass die von viralen Vektoren exprimierten Transgene immunogener sind als Antigene, die als Protein mit einem Adjuvanz verabreicht werden [41-43].

## Einleitung

Eine Problematik bei viralen Vektoren stellt die Balance zwischen Attenuierung und Immunogenität des Virus dar. Während replizierende Viren sehr immunogen sind, kann ein hohes Risiko der Rekombination der viralen DNA in das Wirtsgenom bestehen. Durch die Attenuierung der Viren steigt zwar die Sicherheit des Vektors, dies kann allerdings auch zu einer reduzierten Immunogenität führen [8]. In Tierversuchen und klinischen Studien wurden mehrere virale Vektoren getestet, wobei verschiedene Virusfamilien verwendet wurden. Die Eigenschaften des Vektors sind dabei abhängig von dem zugrunde liegenden Virus, somit hat jeder Vektor eigene Vor- und Nachteile [12].

### 1.2.1 Poxviren

Einige der am umfassendsten untersuchten viralen Vektoren stammen aus der Familie der Poxviridae (Pockenviren). Diese wird unterteilt in 2 Unterfamilien, den Entemopoxvirinae, die Insekten als Wirt nutzen und den Chordopoxvirinae mit den Wirbeltieren als Wirt. Die Chordopoxvirinae werden in verschiedene Gattungen unterteilt, die Orthopoxviren (Echte Pockenviren), die Avipoxviren (Vogelpockenviren), die Capripoxviren (Schaf- und Ziegenpockenviren), die Leporipoxviren (Hasenpockenviren), die Suipoxviren (Schweinepockenviren), die Molluscipoxviren (Weichtierpockenviren), die Yabapoxviren (Yabapockenviren) und die Parapoxviren (Parapockenviren).

Bekannte virale Vektoren sind Abkömmlinge des Vaccinia Virus (VACV) aus der Gattung der Orthopoxviren sowie Mitglieder der Gattung der Avipoxviren, wie Fowlpox und Canarypox [9]. Pockenviren sind doppelsträngige DNA-Viren mit einem großen linearen Genom, welches die Aufnahme großer Mengen an Fremd-DNA ermöglicht [9, 35]. Die virale Replikation und die Transkription des poxviralen Genoms beschränken sich auf das Zytoplasma, wodurch eine Integration von viralen Genen in das Wirtsgenom ausgeschlossen werden kann [45, 46]. Die intrazelluläre Expression der Transgene erlaubt die Prozessierung und Präsentation auf MHC Klasse I- und II-Molekülen, was zu einer Aktivierung von CD4+ und CD8+ T-Zellen führt [47].

Pockenviren besitzen durch ihre hohe Immunogenität ideale Eigenschaften als virale Vektoren. Der Einsatz des VACV als viraler Vektor birgt aufgrund seiner Replikationsfähigkeit vor allem in immunsupprimierten Patienten einige Probleme. Aus diesem Grund wurden attenuierte Replikation-defiziente Derivate des VACV entwickelt. Das bekannteste Derivat von VACV ist das Modifizierte Vaccinia Ankara (MVA). Durch über 500 Passagen in embryonischen Hühnerfibroblasten verlor das Virus 15 % des ursprünglichen viralen Genoms [48-51]. Durch die Attenuierung ist das MVA replikations-defizient und nicht mehr in der Lage, infektiöse Viruspartikel zu produzieren. Daher führte die Immunisierung immunsupprimierter Makaken mit hohen Dosen MVA zu keiner sich ausbreitenden Infektion [52]. Trotz Attenuierung ist die Immunogenität des Vektors jedoch nach wie vor vergleichbar zu VACV [53-55]. Virale Vektoren aus der Gattung der Avipoxviren sind zwar in einigen Vogelarten pathogen, können den viralen Zyklus innerhalb humaner Zellen allerdings nicht vervollständigen und somit keine infektiöse Nachkommenschaft bilden [56]. Ein Nachteil der auf VACV basierenden Vektoren ist die Ausbildung einer Vektor-spezifischen Immunantwort und die Produktion von neutralisierenden Antikörpern. Oft können diese Vektoren daher nur einmal als Impfstoff verwendet werden [57]. Auch eine durch die natürliche Infektion oder die Pocken-Impfung hervorgerufene „Prä-Immunität“ kann die Wirksamkeit des Impfstoffs herabsetzen [58]. Eine Immunisierung mit viralen Vektoren der Gattung der Avipoxviren führt dagegen nicht zur Produktion von

## Einleitung

neutralisierenden Antikörpern [59]. Eine Kombination aus erster Immunisierung (*Prime*) mit MVA und weiteren Immunisierungen mit einem Avipoxvirus (*Boost*) umgeht das Problem der Vektor-spezifischen Immunantwort. Verschiedene Studien konnten bereits erfolgreich die Überlegenheit dieser Kombination bei der Induktion von Antigen-spezifischen Immunantworten demonstrieren [54, 60, 61].

### 1.3 Das Orf-Virus

#### 1.3.1 Klassifizierung

Das *Parapoxvirus ovis* oder Orf-Virus (ORFV) ist Mitglied der Familie der Poxviridae und der Gattung der Parapoxviren. Neben dem ORFV als Prototyp gehören unter anderem das Stomatitis-Papulosa-Virus (BPSV), das Pseudokuhpocken-Virus (PCPV), das Parapoxvirus der Hörnchen (SPPV) und das Parapoxvirus des Rotwildes (PVNZ) zur Gattung des Parapoxvirus [62, 63].

#### 1.3.2 Morphologie

Das ORFV ist ein behülltes doppelsträngiges DNA-Virus und mit einer Größe von 260 nm x 160 nm kleiner als andere Pockenviren [64-66]. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen die ovoide Struktur des ORFV-Partikels, das mit einem Tubulus-ähnlichen Protein spiralförmig umschlossen ist (Abbildung 1.1) [65, 66].

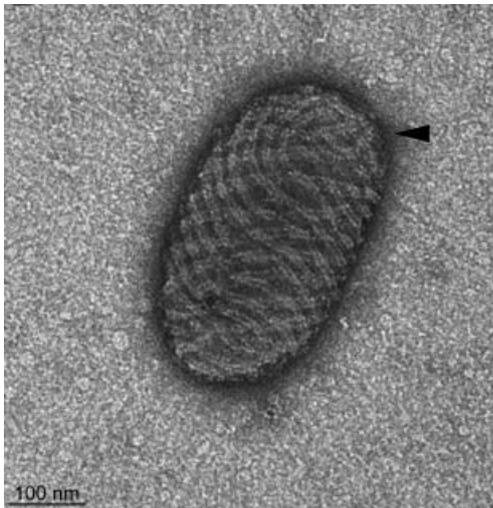


Abbildung 1.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines ORFV-Partikels [66].

Das sogenannte virale Core enthält das Genom sowie Enzyme und Transkriptionsfaktoren, die für die frühe virale Genexpression benötigt werden [67]. Das ORFV besitzt mehrere Reifungsformen mit unterschiedlichen Morphologien. Wie bei VACV ist die infektiöse Form das reife Virion (*mature virion*, MV), dessen äußere Membran vom Endoplasmatischen Retikulum stammt. Die behüllten Virionen (*wrapped virions*, WV) sind von zwei weiteren vom Golgiapparat stammenden Membranen umschlossen. Durch Fusion der WV mit der Zellmembran werden hauptsächlich infektiöse MV, zu einem kleinen Teil auch extrazelluläre Virionen (EV) ohne äußere Membran, freigesetzt [66-68].

### 1.3.3 Das ORFV-Genom

Das ORFV besitzt ein lineares, GC-reiches Genom mit einer Größe von 130-150 kbp. Im zentralen Bereich liegen Gene, die innerhalb der Poxviridae hochkonserviert und wichtig für die Infektion der Wirtszelle, die Genexpression und den Zusammenbau der Virionen sind [67, 69, 70]. Umschlossen wird der zentrale Bereich von invertierten terminalen Wiederholungssequenzen (*Inverted Terminal Repeat*, ITR), in denen nicht-konservierte Virulenzgene liegen, die das Wirtsspektrum, die Pathogenität und die Immunmodulation bestimmen [67, 69, 71-73]. Diese Virulenzgene sind für die Virusreplikation nicht essentiell und eine Deletion dieser Gene führt oftmals zu einer Attenuierung des Virus [74-76].

### 1.3.4 Die virale Replikation

Während die meisten DNA-Viren im Zellkern replizieren und dabei Gebrauch von zellulären Proteinen machen, sind Pockenviren bei ihrer Replikation auf virale Proteine angewiesen, was es ihnen ermöglicht im Zytoplasma zu replizieren [67, 77]. Der Eintritt in die Zelle beginnt mit einer unspezifischen Bindung des ORFV an die Oberfläche der Wirtszelle [67]. Nach Fusion wird das virale Core in das Zytoplasma freigesetzt und die virale Genexpression ausgehend von den frühen (*early*) Promotoren beginnt. Nach der frühen mRNA- und Proteinsynthese folgt die DNA-Replikation [78]. Die Transkription der *early* Gene erfolgt unter der Kontrolle viraler Transkriptionsfaktoren, während die *intermediate* und *late* Genexpressionen zelluläre Transkriptionsfaktoren benötigen [77, 79]. Für die Expression der Gene unter Kontrolle der *early* Promotoren sind weder die Replikation der viralen DNA noch eine Produktion infektiöser Viruspartikel erforderlich [80].

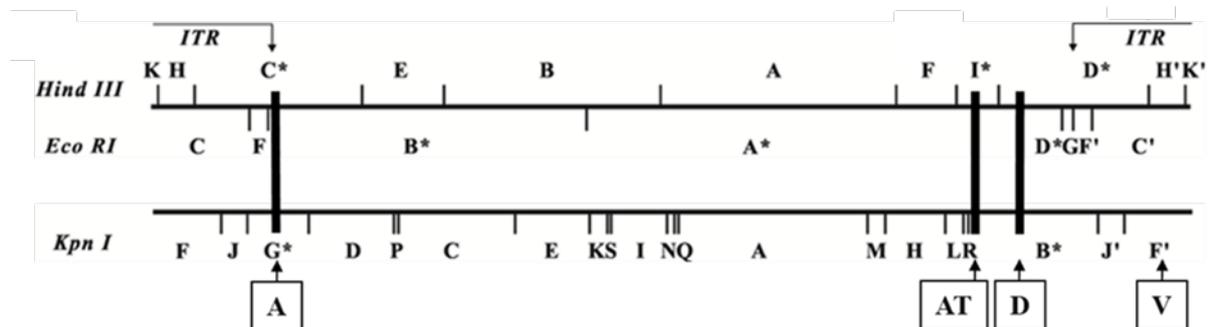
### 1.3.5 Die medizinische Relevanz des ORFV

Das ORFV ist ein zoonotischer Erreger, hat für den Menschen jedoch nur geringe klinische Relevanz. Es ist als Erreger der Pustular Dermatitis (*Ecthyma contagiosum* oder auch Lippengrind) in den natürlichen Wirtstieren, den Schafen und Ziegen, vor allem in der Veterinärmedizin von Bedeutung [81]. Läsionen in der Haut ermöglichen das Eindringen des Virus in den Wirt und die Infektion von proliferierenden Keratinozyten [81]. Das Virus verbreitet sich nicht systemisch im Organismus, weshalb die Infektion überwiegend lokal bleibt [82, 83]. Primärinfektionen sind oft schwerwiegend mit wuchernden und blutigen Läsionen an Maul, Eutern und Genitalien, die bis zu 8 Wochen anhalten [84, 85]. Trotz der starken Immunantwort gegen das ORFV bietet diese keinen Schutz vor einer Reinfektion, die schon nach kurzer Zeit möglich ist [86]. Bei einer Reinfektion sind die Läsionen allerdings kleiner und heilen nach ca. 3 Wochen ab [82, 85]. Durch Verletzungen der Haut kann das ORFV bei Kontakt mit infizierten Tieren auf den Menschen übertragen werden [87]. Die Infektion verläuft meist harmlos und äußert sich durch Hautläsionen der betroffenen Stellen, zumeist an Händen und Unterarmen, die nach ca. 4-8 Wochen verheilen. Vereinzelt kann es zu Schwellungen der Lymphknoten und Fieber führen [87]. Bei immunsupprimierten Menschen kann das ORFV schwerere Infektionsverläufe hervorrufen, die mit Virostatika wie Cidofovir und Imiquimod behandelt werden können [88-90].

### 1.3.6 Der ORFV-Vektor D1701-V

Der ORFV Stamm D1701-V wurde ursprünglich aus Pustelmaterial eines infizierten Lamms isoliert und über 135 Passagen in einer sekundären Zellkultur aus embryonalen Schafnieren attenuiert, Plaque gereinigt und anschließend in heterologen Zellkulturen aus embryonalen Rindernieren vermehrt. Der entstandene Stamm D1701 wurde im Veterinärbereich gegen ORFV als Lebend-Impfstoff zugelassen. In inaktivierter Form wurde er zudem unter den Handelsnamen Baypamun (Bayer) bzw. Zylexis (Pfizer) als Immunmodulator vertrieben [91]. Durch die Adaption an das Wachstum in Vero-Zellen (African green monkey kidney) entstand der Stamm D1701-V [92, 93]. Mit dem Verlust von 3 großen Genbereichen wurde das Virus weiter attenuiert, sodass Infektionen selbst in immunsupprimierten Schafen asymptomatisch verlaufen [72, 92]. Eine weitere Attenuierung erfolgte durch den Austausch des unter dem *early* Promotor stehenden Virulenzgens *vegf-e* (*vascular endothelial growth factor*) durch eine LacZ-Genkassette aus *Escherichia coli* [73]. Der entstandene ORFV Stamm D1701-VrV ermöglichte durch die Expression von LacZ ein Blau-Weiß-Selektionssystem [73] und wurde als Ausgangsvirus für die Herstellung verschiedener Rekombinanten verwendet. Auf diese Weise entstanden Impfstoffe gegen Infektionskrankheiten wie Pseudorabies [94-96], Tollwut [97], die Borna'sche Erkrankung [98, 99], Influenza [100] oder die klassische Schweinepest [101].

Neben dem *vegf* Genlokus wird mittlerweile ein weiterer Genlokus zur Insertion von Fremdgenen verwendet, der Del2 (kurz: D) Lokus, ein während der Adaption an das Wachstum in Vero-Zellen entstandener Deletionsbereich (Abbildung 1.2) [92, 93, 102].



**Abbildung 1.2:** Karte der genomischen Deletionen durch die Adaption an Vero-Zellen. Genomkarte der *HindIII*, *EcoRI* und *KpnI* Restriktionsfragmente des D1701-V und schematische Darstellung der drei entstandenen Deletionsbereiche A, AT und D. ITR = Inverted Terminal Repeats, V = *vegf-e* Lokus (modifiziert nach [90]).

Durch den Austausch des *vegf-e* Gens stehen in diesen Lokus inserierte Gene unter der Kontrolle des frühen poxspezifischen Promotors *Pvegf*. Neben diesem natürlichen Promotor wurden zwei synthetische Promotoren P1 und P2 entwickelt, die ebenfalls in der frühen Phase der viralen Genexpression aktiv sind. Alle drei Promotoren garantieren so die Expression von Fremdgenen ohne nötige ORFV DNA-Replikation und die Produktion infektiöser ORFV-Partikel [93, 102].

Der ORFV-Vektor D1701-V verfügt über einige Eigenschaften, durch die er sich hervorragend für den Einsatz als Vektor-Vakzine eignet. Neben dem sehr engen natürlichen Wirtsbereich zeichnet er sich durch den eingeschränkten Hauttropismus und die Abwesenheit einer systemischen Infektion aus [72, 82]. Da nur sehr wenige Fälle einer natürlichen Infektion des Menschen bekannt sind, kann eine Prä-Immunität gegen den Vektor, wie sie z.B. bei VACV oder Adenovirus

## Einleitung

vorliegt, nahezu ausgeschlossen werden [92, 103]. Das ORFV hat in permissiven wie nicht-permissiven Wirten starke immunstimulierende und immunmodulierende Eigenschaften [104-106]. Neben der Induktion einer starken humoralen Immunantwort wird durch eine Immunisierung mit ORFV auch eine starke zelluläre Immunantwort induziert [95]. Der Einsatz von Adjuvantien, die zu unerwünschten Nebenwirkungen führen kann, ist bei der Immunisierung mit ORFV somit nicht notwendig [72, 82]. Durch die Expression von immunmodulatorischen Proteinen durch das Virus und deren Interaktion mit dem Immunsystem fällt die Vektor-spezifische Immunantwort kurz und sehr schwach aus. Es findet keine Bildung von ORFV-neutralisierenden Antikörpern statt, was Mehrfachimmunisierungen mit dem ORFV-Vektor möglich macht [85, 95, 107]. Ein weiterer großer Vorteil gegenüber anderen Technologien ist die Adaption des ORFV an ein Wachstum in Zellkultur, was eine standardisierte Herstellung ohne Verwendung von Antibiotika oder Hühnereiern ermöglicht [103].

### 1.3.7 Immunantwort gegen ORFV

Eine Immunisierung mit ORFV führt in permissiven wie nicht-permissiven Wirten zu einer Induktion des angeborenen Immunsystems. An der Injektionsstelle akkumulieren zunächst DCs, Neutrophile Granulozyten sowie B- und T-Zellen [108, 109], wobei die DCs die B- und T-Zellen aktivieren und eine spezifische adaptive Immunantwort induzieren. In den ersten Tagen nach einer Immunisierung werden vor allem CD4<sup>+</sup> T-Zellen aktiviert [85]. Die antivirale Immunantwort zeichnet sich durch die Freisetzung von Zytokinen, Interferonen und Chemokinen, wie IL-1 $\beta$ , IL-8 und die spätere Produktion von GM-CSF, IL-2 und IFN $\gamma$  aus [105, 106, 110].

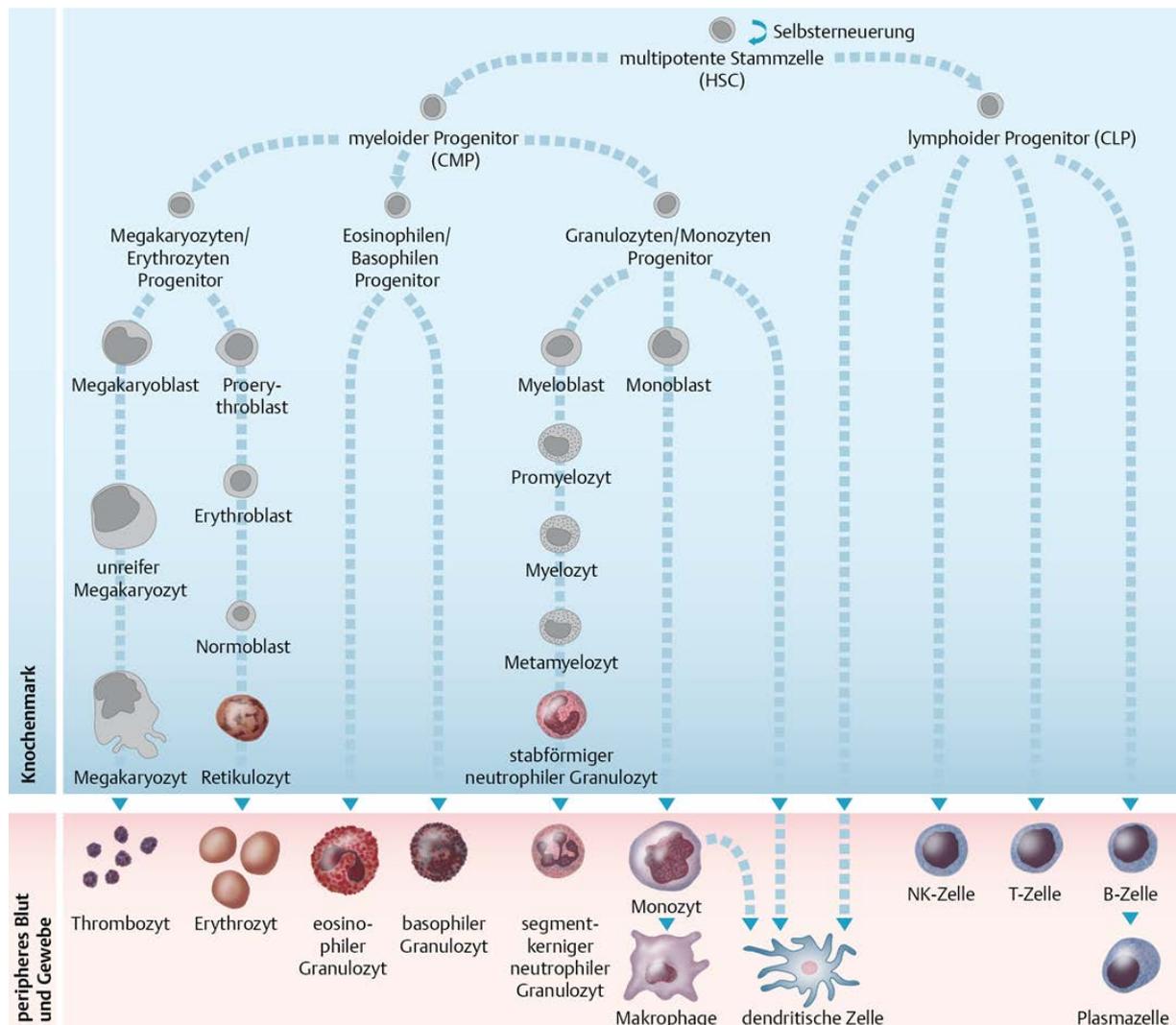
Das ORFV exprimiert verschiedene immunmodulatorische Gene, die die Immunantwort des Wirtes unterdrücken können [85]. Ein wichtiges Gen ist ein Homolog zum humanen IL-10, ein immunregulatorisches, anti-inflammatorisches Zytokin, das die antivirale Immunantwort der T-Zellen sowie die Reifung und Aktivierung von DCs inhibiert [111-113]. Weitere immunmodulatorische Gene sind ein GM-CSF und IL-2 inhibierender Faktor (GIF) [114], ein Chemokin-Binde-Protein [115] und ein Homolog zum E3L-Gen von VACV, das Interferon-Resistenzgen (IFNR) [80, 85, 116-118].

## 1.4 Das adaptive Immunsystem

Die adaptive bzw. erworbene Immunantwort ist eng mit der angeborenen Immunantwort verknüpft und bezeichnet sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunreaktion, die sich spezifisch gegen Antigene richtet. Die wichtigsten Zellen für die Ausbildung einer adaptiven Immunantwort sind T-Zellen und B-Zellen sowie Antigen-präsentierende Zellen (APCs), wie DCs und Makrophagen.

### 1.4.1 Die Hämatopoese

APCs sind Teil des angeborenen Immunsystems. Sie entstehen wie alle Leukozyten aus hämatopoetischen Stammzellen [44]. Während T-Zellen, B-Zellen und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) aus einer lymphoiden Vorläuferzelle (*common lymphoid precursor*, CLP) differenzieren, entwickeln sich Monozyten, Makrophagen und Granulozyten aus einer myeloiden Vorläuferzelle (*common myeloid precursor*, CMP) (Abbildung 1.3) [119-121]. DCs sind eine sehr heterogene Zellpopulation und differenzieren sowohl entlang der myeloiden als auch der lymphoiden Entwicklungslinie, wobei die meisten DCs von einer myeloiden Vorläuferzelle abstammen (Abbildung 1.3)[122].



**Abbildung 1.3: Die Hämatopoese entlang der myeloiden und lymphoiden Entwicklungslinie.** Aus dem myeloiden Progenitor entstehen Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten, Monozyten und Makrophagen. Aus dem lymphoiden Progenitor entstehen T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen [120].

### 1.4.2 Antigen-präsentierende Zellen

Ein essentieller Schritt in der Initiation der adaptiven Immunantwort ist die Aufnahme von Pathogenen durch Makrophagen und unreife DCs. Die Aufnahme erfolgt Rezeptor-vermittelt über Phagozytose oder über Makropinozytose, eine kontinuierliche Rezeptor-unabhängige Aufnahme von extrazellulärem Material [123]. Die aufgenommenen Antigene werden prozessiert und in Form von Peptid-MHC Komplexen auf der Zelloberfläche präsentiert [124]. Die Aufnahme von Pathogenen aktiviert APCs und stimuliert die Expression verschiedener Aktivierungsmarker wie beispielsweise das MHC Klasse II-Molekül HLA-DR und die ko-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86. Auf aktivierten DCs wird zusätzlich der Reifungsmarker CD83 exprimiert [125]. Nach Aktivierung verlieren die APCs die Fähigkeit zur Aufnahme weiterer Pathogene und sie verlassen die peripheren Gewebe in Richtung sekundärer lymphatischer Organe [126].

### 1.4.3 T-Zellen

Nach Entwicklung im Knochenmark wandern T-Zellen in den Thymus, um zu reifen [127]. Dort entstehen über somatische Rekombination vielfältige Antigenrezeptoren, die T-Zell-Rezeptoren (*T cell receptor*, TCR), die Antigene in Form von Peptid-MHC Komplexen erkennen können. Durch eine anschließende positive Selektion wird die Erkennung der MHC-Moleküle über den TCR gewährleistet [128]. Die negative Selektion eliminiert dagegen selbst-reaktive T-Zellen [129]. Jeder TCR hat einen Ko-Rezeptor, der die Bindung des TCRs an die MHC-Moleküle verstärkt. T-Zellen, die den Thymus verlassen, exprimieren einen von zwei möglichen Ko-Rezeptoren: CD4 oder CD8. Anhand der Ko-Rezeptoren werden CD4+ T-Helferzellen von CD8+ zytotoxischen T-Zellen (*cytotoxic T lymphocyte*, CTLs) unterschieden. T-Helferzellen werden für die Induktion der zellulären und humoralen Immunantwort benötigt. Der Ko-Rezeptor CD4 erkennt MHC Klasse II-Moleküle (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP) auf der Zelloberfläche von APCs, die Antigene mit extrazellulärem Ursprung präsentieren. Nach Aktivierung produzieren sie Zytokine, um die zelluläre oder humorale Immunantwort zu modulieren. CTLs erkennen mit dem Ko-Rezeptor CD8 MHC Klasse I-Moleküle (HLA-A, HLA-B, HLA-C) auf allen kernhaltigen Zellen. MHC Klasse I-Moleküle präsentieren Antigene intrazellulären Ursprungs, weshalb CTLs nach Aktivierung den Zelltod von malignen Zellen oder Zellen mit intrazellulären Pathogenen einleiten können [126, 130-132].

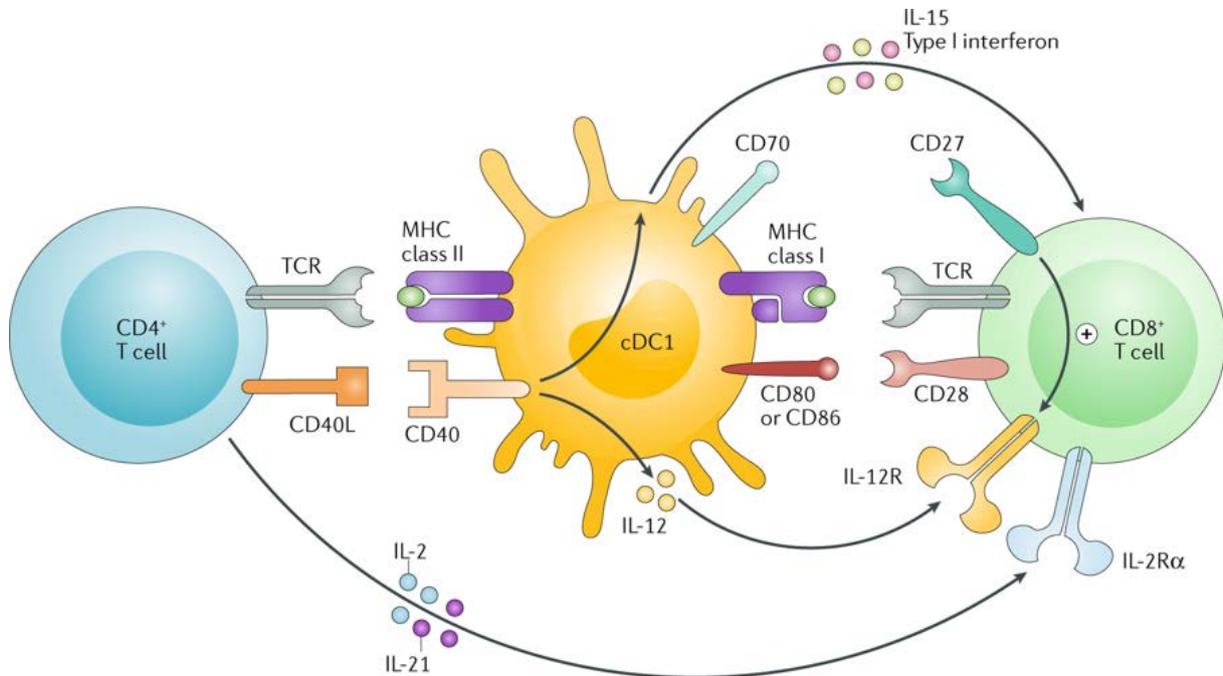
### 1.4.4 Die Aktivierung von T-Zellen

T-Zellen, die nach der Reifung den Thymus verlassen, bezeichnet man als naiv. Erst nach Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen werden die naiven T-Zellen aktiviert (*Priming*). Für die Ausbildung einer adaptiven Immunantwort wandern die T-Zellen in die peripheren lymphoiden Organe (*Homing*) wie Milz und Lymphknoten, wo sie spezifisch Peptid-MHC Komplexe auf der Zelloberfläche von APCs erkennen [126, 133, 134].

Um eine naive T-Zelle effektiv zu aktivieren, werden 3 Signale benötigt (Abbildung 1.4) [135]. Das Signal 1 ist die spezifische Erkennung des Peptid-MHC Komplexes auf der Oberfläche von APCs durch den TCR. Signal 2 wird von ko-stimulatorischen Molekülen vermittelt. Durch die Bindung von Rezeptor und Ligand auf T-Zellen und APCs wird das Überleben der Zellen sichergestellt und die Proliferation von T-Zellen gefördert. Signal 3 ist die Sekretion von

## Einleitung

Zytokinen durch APCs. Verschiedene Zytokine können die Proliferation und die Differenzierung der T-Zellen in unterschiedliche Effektor T-Zellen stimulieren [136]. Nach Aktivierung entstehen Effektor- und langlebige Gedächtniszellen. Diese klonale Expansion ist ein entscheidender Prozess bei der Ausbildung einer adaptiven Immunantwort [126].



**Abbildung 1.4: Aktivierung von T-Zellen durch eine Dendritische Zelle (DC).** Die DC präsentiert Antigene über Peptid-MHC Komplexe, welche von den TCRs der CD4+ und CD8+ T-Zellen erkannt werden (Signal 1). Die Interaktion von ko-stimulatorischen Molekülen (CD40L-CD40 und CD80/CD86-CD28) fördert die Proliferation und das Überleben der T-Zelle sowie die Antigenpräsentation der DC (Signal 2). Die Produktion von Zytokinen (IL-15, IL-12, Typ I Interferon) durch die DC induziert die Differenzierung der CD8+ T-Zellen. Die IL-2- und IL-21-Produktion der CD4+ T-Zellen unterstützt die Aktivierung der CD8+ T-Zellen. TCR = T-Zell-Rezeptor [137].

### 1.5 Ko-stimulatorische Moleküle

Ko-stimulatorische Moleküle spielen eine zentrale Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen. Die Entdeckung von CD28 zeigte, dass zur Aktivierung von T-Zellen neben der Signalkaskade des T-Zell-Rezeptors auch die Signalkaskade der ko-stimulatorischen Moleküle benötigt wird [138-140]. Ko-stimulatorische und ko-inhibitorische Moleküle sind wichtig für die Regulierung der T-Zell-Aktivierung, der Differenzierung in verschiedene Effektorzellen und das Überleben der Zellen [141]. Vielseitige ko-stimulatorische Rezeptoren und deren Liganden wurden bislang gefunden, am besten charakterisiert sind sie auf professionellen APCs [141, 142]. Nach Erkennung des Peptid-MHC Komplexes ko-lokalisieren TCR und ko-stimulatorische Moleküle in der Immunologischen Synapse, um die T-Zell-Aktivierung zu verstärken [141, 143]. In Abwesenheit dieses zweiten Signals verbleiben die T-Zellen entweder unempfindlich oder sie werden aktiv tolerant gegen das präsentierte Antigen (Anergie) [144-146]. Die meisten ko-stimulatorischen und ko-inhibitorischen Moleküle gehören zu der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) und der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie (TNFRSF). Die am besten beschriebenen ko-stimulatorischen Moleküle in der IgSF gehören der CD28- und B7-Familie an.

## Einleitung

Hier interagieren vorrangig Moleküle der CD28-Familie mit Molekülen der B7-Familie, wie zum Beispiel CD80 und CD86 [147]. Bekannte Vertreter der TNFRSF sind CD40, 4-1BB, CD27 und OX40 [148].

### 1.5.1 CD80/CD86 und CD28

CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) gehören zur Ig-Superfamilie und werden auf Monozyten, Makrophagen, aktivierten DCs und B-Zellen exprimiert. Sie sind Liganden von CD28 und dem Zytotoxischen T-Lymphozyt Antigen-4 (CTLA-4, CD152) und unterscheiden sich in ihrem Expressionsmuster und ihrer Funktionalität. CD80 bildet auf der Zelloberfläche Homodimere, CD86 liegt dagegen als Monomer vor [149]. Während CD86 konstitutiv exprimiert und nach Aktivierung hochreguliert wird, wird die Expression von CD80 nach Aktivierung *de novo* induziert. Die CD80-Expression findet somit im Vergleich zur CD86-Expression später statt [147, 150]. Verschiedene Faktoren wurden bislang auf ihren Einfluss auf die CD80- und CD86-Expression untersucht. Faktoren wie CD40, IFN $\gamma$ , IFN $\alpha$ , GM-CSF oder Lipopolysaccharid (LPS) resultieren in einer verstärkten Expression der Liganden [151-154], dagegen inhibieren IL-10 oder IL-4 diese [146, 155-157]. Da CD86 häufiger und schneller exprimiert wird als CD80, wurde angenommen, dass CD86 der Hauptakteur bei der T-Zell-Aktivierung ist. Diese Annahme konnte auch durch *in vivo* Studien gestützt werden [158, 159]. Funktionelle Daten sowie Affinitätsstudien deuten jedoch an, dass CD80 der wirkungsvollere Ligand von CD28 ist [160, 161]. Die biologische Begründung für die Existenz zweier Liganden ist bislang nicht bekannt.

CD28 ist ein integrales Membranprotein mit einer Größe von 44 kDa und ist konstitutiv auf T-Zellen zu finden [150]. Nach Aktivierung von T-Zellen durch die Erkennung des Peptid-MHC Komplexes wird CD28 verstärkt exprimiert [162, 163]. CD28 vermittelt wichtige Signale für die T-Zell-Aktivierung und Proliferation und induziert die Produktion von IL-2. Neben CD28 ist auch CTLA-4 ein Rezeptor für CD80 und CD86. Im Gegensatz zum konstitutiv exprimierten CD28 wird die Expression von CTLA-4 nach T-Zell-Aktivierung hochreguliert. CTLA-4 hat eine höhere Affinität für CD80 und CD86 und konkurriert mit CD28 um deren Bindung. Durch die Bindung von CD80 und CD86 an CTLA-4 wird die Aktivierung der T-Zellen gehemmt [147, 164]. CTLA-4 gilt somit als der Prototyp der Immune Checkpoints.



### 1.5.2 CD40L und CD40

CD40L und CD40 gehören zur TNF- bzw. TNFR-Superfamilie. CD40 ist ein 48 kDa großes Typ I Transmembranprotein, das 1985 erstmalig auf B-Zellen nachgewiesen wurde und auch auf Monozyten, DCs, Makrophagen und Thrombozyten exprimiert wird [170-172]. CD40 wird auch auf nicht-hämatopoetischen Zellen wie Endothelzellen, Fibroblasten und Epithelzellen exprimiert [173]. Der Ligand von CD40, CD154 (CD40L, gp39, T-BAM oder TRAP) ist ein Typ II Transmembranprotein und hat aufgrund post-translationaler Modifikationen ein variables Molekulargewicht von 32-39 kDa [173]. Neben der membranständigen Form liegt auch eine lösliche Form von CD40L mit ähnlicher Aktivität vor [174]. CD40L besteht aus einer sandwichartigen extrazellulären Struktur, bestehend aus einem  $\beta$ -Faltblatt, einer  $\alpha$ -Helix und einem weiteren  $\beta$ -Faltblatt [175]. Diese Struktur erlaubt die Trimerisierung von CD40L, was charakteristisch für TNFR-Liganden ist. CD40L wird vorwiegend von aktivierten T-Zellen und B-Zellen sowie auf Thrombozyten exprimiert [176, 177]. Die Wechselwirkung von CD40 und CD40L spielt eine wichtige Rolle in der Induktion T-Zell-abhängiger B-Zell-Antworten, ist ein wichtiger Faktor in der Aktivierung von Monozyten und DCs und ist somit in die Regulierung von Entzündungsreaktionen involviert [173]. Das humane Protein besteht aus 261 Aminosäuren, wovon 22 Aminosäuren die zytoplasmatische Domäne, 24 Aminosäuren die Transmembrandomäne und 215 Aminosäuren die extrazelluläre Domäne bilden. Das murine Protein hat in der Aminosäuresequenz eine Ähnlichkeit zum humanen Protein von 78 % [173]. Die Oberflächenexpression von CD40L benötigt keine *de novo*-Synthese. Die Bindung von CD40L und CD40 führt zur Rezeptor-vermittelten Endozytose von CD40L und zur lysosomalen Degradierung [173].

Die umfangreiche Expression von CD40-CD40L lässt auf eine zentrale Rolle im Immunsystem schließen. Die Interaktion von CD40 und CD40L hat dabei starke Auswirkungen auf DCs, B-Zellen und Endothelzellen [148]. Durch die Bindung von CD40L an CD40 kommt es zu einer Gruppierung von CD40 und der Rekrutierung von Adapterproteinen, den TNFR-assoziierten Faktoren (TRAFs) an die zytoplasmatische Domäne von CD40. Abhängig vom Zelltyp aktivieren oder inhibieren die TRAFs verschiedene Signalwege, unter anderem den klassischen (kanonischen) und den alternativen (nicht-kanonischen) NF $\kappa$ B-Signalweg, den MAP-Kinase-Weg sowie den PI3K/Akt-Signalweg [148, 178]. Neben den TRAFs findet eine weitere Signalübertragung auch über die Janus-Kinase 3 statt. Diese induziert die Phosphorylierung von STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5). Durch diese komplexen Signalwege werden verschiedene zelluläre Prozesse gesteuert wie die Reifung und Proliferation von Zellen, die Produktion von inflammatorischen Zytokinen sowie die Expression von ko-stimulatorischen Molekülen. Die Bindung an CD40 erleichtert außerdem die Cross-Präsentation von Antigenen [179, 180]. DCs werden zur Reifung lizenziert und können die Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen induzieren. In B-Zellen fördert der CD40-Signalweg die B-Zell-Proliferation, den Immunglobulin-Isotypwechsel, die somatische Hypermutation, um die Affinität zum Antigen zu erhöhen und letztendlich die Bildung von Plasmazellen und B-Gedächtniszellen [148, 181, 182].

Mutationen in CD40L bzw. CD40 sind Ursache für das Hyper-IgM-Syndrom Typ 1 bzw. Typ 3. Bei diesem angeborenen Immundefekt ist der Isotypwechsel gestört, was zu einem stark erhöhten Anteil an IgM und gleichzeitig zu einem verminderten Anteil an IgG und IgA im Blutserum führt [183-186].

### 1.6 Die Optimierung von viralen Vektoren

Trotz der bereits vorhandenen, sehr guten immunstimulatorischen Eigenschaften poxviraler Vektoren werden verschiedene Strategien verfolgt, um diese zu optimieren. Dazu zählen unter anderem die genomische Deletion von Virulenzgenen, die Optimierung der viralen Promotoren, die Steigerung der Fremgen-Expression oder die Verwendung von zusätzlichen Adjuvantien [187]. Eine weitere vielversprechende Möglichkeit bietet die simultane Expression von Antigen und ko-stimulatorischen Molekülen oder Zytokinen. Unter anderem die Ko-Expression der Zytokine IL-12, IL-2, IL-15 oder GM-CSF konnten die Immunogenität poxviraler Vektoren in verschiedenen Studien steigern [188-191].

Die bekanntesten Beispiele für die Ko-Expression von ko-stimulatorischen Molekülen sind TRICOM (*TRIad of COstimulatory Molecules*) exprimierende Vektoren der Orthopoxviren (VACV und MVA) und Avipoxviren (Fowlpox). Diese Vektoren exprimieren die ko-stimulatorischen Moleküle B7-1/CD80, ICAM-1 und LFA-3. Natürlicherweise werden diese Moleküle auf APCs exprimiert. Als Liganden von CD28, CD2 und LFA-1 induzieren sie spezifische Signalwege bei der Aktivierung von T-Zellen [192]. *In vitro*-Studien zeigten, dass TRICOM-exprimierende Vektoren die Fähigkeit von DCs zur Antigen-Präsentation verbessern und so in einer verstärkten Antigen-spezifischen Immunantwort resultieren [193, 194]. Die Expression aller drei Moleküle war dabei deutlich potenter als die Expression von nur einem oder zwei dieser Moleküle [195]. Auch *in vivo* konnten diese verstärkten immunstimulatorischen Eigenschaften TRICOM-exprimierender Poxviren erfolgreich demonstriert werden. In verschiedenen Mausmodellen führte die Immunisierung mit TRICOM-exprimierenden Vektoren zu einer verstärkten Antigen-spezifischen T-Zell Antwort, was sich zudem in einer effektiveren Anti-tumoralen Immunantwort widerspiegelte [9, 195].

Nach diesem Vorbild entwickelte Bavarian Nordic PROSTVAC, eine Immuntherapie, bei welcher die *Prime*-Immunisierung mit einem Vaccinia-Vektor und die *Boost*-Immunisierungen mit einem Fowlpox-Vektor durchgeführt werden. Beide Vektoren exprimieren neben dem Prostata-Antigen PSA die drei ko-stimulatorischen Moleküle TRICOM [196]. PROSTVAC wird momentan in verschiedenen klinischen Studien in Patienten mit metastasierendem Kastrations-resistentem Prostata-Karzinom getestet. In einer Studie mit 125 Patienten resultierte die Immunisierung mit PROSTVAC im Vergleich zur Kontroll-Gruppe in einem verbesserten Gesamtüberleben [197]. Eine darauffolgende Phase III-Studie konnte diesen Zusatznutzen allerdings nicht bestätigen [198]. In weiteren klinischen Studien wird PROSTVAC in Kombination mit anderen Immuntherapien wie Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02933255) und Zytokinen (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01322490) sowie in Kombination mit einer Chemotherapie (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02649855) getestet.

Auch die zusätzliche Expression von CD40L in verschiedenen Orthopoxviren und Avipoxviren demonstrierte gesteigerte immunstimulatorische Eigenschaften. Bislang konnte vor allem *in vitro* durch die Infektion von APCs mit einem CD40L-exprimierenden Vektor eine erhöhte Fähigkeit zur Antigen-Präsentation gezeigt werden. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* hatten diese Vektoren einen positiven Effekt auf die Ausbildung einer Antigen-spezifischen T-Zell-Antwort [199-201].

Mit der Kombination von CD40L und CD80 in einem viralen Vektor ist bislang eine klinische Studie geplant. In dieser Phase I-Studie soll die Sicherheit und Wirksamkeit eines Vaccinia Virus, das neben CD40L und CD80 7 Epitope von Cancer/Testis-Antigenen exprimiert (rVV-740CTA),

in Patienten mit Mammakarzinom getestet werden (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03110445).

### 1.7 Das Humane Zytomegalievirus

Das Humane Zytomegalievirus (HCMV) oder auch Humane Herpesvirus 5 (HHV 5) ist ein behülltes, doppelsträngiges  $\beta$ -Herpesvirus und gehört zur Familie der Herpesviridae. Es ist ubiquitär verbreitet und verbleibt als subklinische latente Infektion im Menschen [202]. Zwar ist ein Großteil der Population mit HCMV infiziert, die Infektion ist jedoch meist asymptomatisch, da sie gut vom Immunsystem kontrolliert werden kann [203]. Allerdings gilt das HCMV als die häufigste Ursache kongenitaler Infektionen und ist ein großer Faktor bei der Erkrankung und Sterblichkeit von Menschen mit geschwächtem Immunsystem [204]. Aber auch in vermeintlich gesunden Menschen hat die Persistenz des Virus großen Einfluss durch Modulation des angeborenen und adaptiven Immunsystems [203]. Durch die Expression verschiedener Virulenzfaktoren verhindert das HCMV die Ausbildung einer Immunreaktion.

#### 1.7.1 Das Immunogen „PepTrio“

Wichtig bei der Entwicklung eines Impfstoffes im Bereich der Tumorerkrankungen ist die Induktion einer zellulären Immunantwort, also die Aktivierung von CD8+ T-Zellen. Das HCMV wurde vielfach als Modellantigen in präklinischen Experimenten *in vitro* und *in vivo* mit viralen Vektoren verwendet [205]. Im Zuge dieser Arbeit wurde das artifizielle Antigen „PepTrio“ verwendet. Dieses artifizielle Antigen besteht aus drei immundominanten Epitopen der Proteine IE-1 (VLEETSVML) und pUL83/pp65 (NLVPMVATV und MLNIPSINV), die auf dem MHC Klasse I-Molekül HLA-A\*02:01 präsentiert werden [206]. Das immediate-early Protein 1 (IE-1) blockiert den JAK-STAT-Signalweg, wodurch die Interferon-Expression und somit die antivirale Immunantwort des Wirtes verhindert wird [207]. Auch pUL83 (pp65) beeinflusst die Interferon-Antwort und ist wichtig bei der Expression viraler Proteine [208, 209]. Die Epitope werden in Form von Minigenen exprimiert, somit hat jedes der Epitope ein eigenes Start- und Stopp-Codon (Abbildung 1.6).



Abbildung 1.6: Schematischer Aufbau des artifiziellen Antigens „PepTrio“

### 1.8 Die Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es den Mechanismus der Immunstimulierung durch den ORFV Stamm D1701-V aufzuklären. Hierfür wurde neben der Analyse des Zell-Tropismus von ORFV in humanen Leukozyten die Aktivierung verschiedener Leukozyten-Populationen, die Produktion von Zytokinen sowie der Eintritt des ORFV in die Zellen untersucht. Des Weiteren wurde überprüft, ob eine Antigen-spezifische Immunantwort *in vitro* durch die Expression des artifiziellen Antigenkonstrukts „PepTrio“ durch ORFV induziert werden kann. *In vivo* wurde schließlich die Induktion von Antigen-spezifischen Immunantworten nach Immunisierung mit einem Ovalbumin (Ova) exprimierenden ORFV und der Einfluss der Immunisierungsrouten auf die Stärke der induzierten Immunantwort analysiert.

Im zweiten Teil der Dissertation sollte erforscht werden, ob die ORFV-induzierte Immunantwort durch die zusätzliche Expression von ko-stimulatorischen Molekülen gesteigert werden kann. Hierfür wurden ORFV-Rekombinanten hergestellt, die neben „PepTrio“ entweder CD40L und/oder CD80 exprimieren. Bei der *in vitro*-Charakterisierung dieser Rekombinanten wurde anschließend überprüft, ob die ORFV-induzierte Aktivierung des Immunsystems verstärkt wird. Zusätzlich wurden Rekombinanten hergestellt, die das Antigen Ova in Kombination mit den murinen Homologen von CD40L (mCD40L) und/oder CD80 (mCD80) exprimieren. Mit Hilfe dieser Rekombinanten wurde die Induktion von Antigen-spezifischen Immunantworten und der Effekt der Ko-Expression von CD40L und CD80 auf die anti-tumorale Immunität *in vivo* untersucht.

# 2 - Material und Methoden

---

## 2.1 Material

### 2.1.1 Geräte

Amaya CLB Transfection Device	LONZA
BD FACScyber	BD Biosciences
BD LSR Fortessa	BD Biosciences
Eclipse Ti2	Nikon
Fresco 21 (Zentrifuge)	Heraeus
Function Line BB16 CO <sub>2</sub> Incubator	Heraeus
Fusion SL	Peqlab
Galaxy 170 S (CO <sub>2</sub> Inkubator)	Eppendorf
Gammazelle, 1000 Elite	Nordion
Infinite M200 Plate Reader	Tecan
Inverses Phasen-Kontrast Mikroskop CK40	Olympus
L80 Ultracentrifuge (Zentrifuge)	Beckmann
Megafuge 1.0R (Zentrifuge)	Heraeus
MidiMACS Separator	Miltenyi Biotec
MiniMACS Separator	Miltenyi Biotec
Neubauer-Zählkammer	Brand
Owl D2 Wide-Gel Electrophoresis System	ThermoFisher
Rotator	ThermoFisher
Rotilabo-Mikroliterzentrifuge	Roth
Sonopuls	Bandelin
Supercycler	Kyratec
SW 41 Ti Swinging-Bucket Rotor	Beckman
TFA-20.250 Rotor	Kontron
Thermomixer 5437	Eppendorf
Wasserbad	Julabo
Wippschüttler WS5	Bühler

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

6-Loch Zellkulturplatte	Greiner bio-one
12-Loch Zellkulturplatte	Corning Costar
24-Loch Zellkulturplatte	Greiner bio-one
96-Loch Zellkulturplatte (flacher Boden)	Greiner bio-one
96-Loch Zellkulturplatte (runder Boden)	Corning Costar
96-Loch ELISA-Platte	Thermo Scientific
384-Loch Zellkulturplatte	Greiner bio-one
T25-Zellkulturflasche	Greiner bio-one
T75-Zellkulturflasche	Greiner bio-one
T175-Zellkulturflasche	Greiner bio-one
0,5 ml-Reaktionsgefäß	Eppendorf
1,5 ml-Reaktionsgefäß	Eppendorf
2 ml-Reaktionsgefäß	Eppendorf
5 ml-Reaktionsgefäß	Eppendorf
8er Strip PCR-Reaktionsgefäß	Nippon Genetics
15 ml-Röhrchen	Greiner bio-one
50 ml-Röhrchen	Greiner bio-one
5/10/25 ml serologische Pipette	Falcon
50 ml serologische Pipette	Corning Costar
CellVIEW Zellkulturschale	Greiner bio-one
Cryo.S Röhrchen (2 ml)	Greiner bio-one
End-to-End Kapillare, 20 µl, K2E	Sarstedt
MACS-Säule MS	Miltenyi Biotec
MACS-Säule LD	Miltenyi Biotec
MACS-Säule LS	Miltenyi Biotec
Microvette 500, K3E	Sarstedt
Microvette 500, Z-Gel	Sarstedt
Minicaps, Na-hep	Hirschmann
Pasteurpipette mit ultra-dünnere Spitze	Roth
Polyallomer 200 ml-Ultrazentrifugenbecher	Beraneck Laborgeräte
Polypropylen-Röhrchen (13,2 ml, dünnwandig)	Beckman
Trifill pipettier Reservoir	Camlab
Zellsieb, 40 µm	Falcon

### 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

ACK Lyse-Puffer	ThermoFisher
Ampicillin (100 mg/ml)	Sigma-Aldrich
BSA (Bovines Serum-Albumin)	Sigma-Aldrich
Biocoll	Biochrom
Brefeldin A	Sigma-Aldrich
CD4 MicroBeads	Miltenyi Biotec
CD8 MicroBeads	Miltenyi Biotec
CD14 MicroBeads	Miltenyi Biotec
CutSmart buffer (10 x)	New England Biolabs
CytochalasinD	Sigma-Aldrich
Cytofix/Cytoperm	BD Biosciences
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco by Life Technologies
DMSO (Dimethyl-Sulfoxid)	Biochrom
DNase I	Sigma-Aldrich
HyperLadder 1 kb	Bioline
EDTA	Invitrogen
Ethanol (100 %)	VWR Chemicals
FastGene Agarose-Tabletten	Nippon Genetics
FCS (Fötale Kälberserum)	Biochrom
Formaldehyd	Sigma-Aldrich
Gel Loading Dye Purple (6 x)	New England Biolabs
GM-CSF (Leukine, Sagramostim)	Uni Apotheke
Golgi-Plug	BD Biosciences
Golgi-Stop	BD Biosciences
Human TruStain FcX Fc Block	BioLegend
IFN $\gamma$	Peptidech
IL-2 (Interleukin 2)	R&D Systems
IL-4 (Interleukin 4)	Peptidech
IL-7 (Interleukin 7)	Peptidech
IL-12 (Interleukin 12)	PromoKine
IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)	Lonza
Isopropanol	Sigma-Aldrich
LPS (Lipopolysaccharid)	Sigma-Aldrich
Maus BD Fc Block	BD Biosciences
Midori-Green Advanced DNA Stain	Nippon Genetics
NEB Buffer 1.1 (10 x)	New England Biolabs
NEB Buffer 2.1 (10 x)	New England Biolabs
NEB buffer 3.1 (10 x)	New England Biolabs
Quick-Load® 1 kb DNA Ladder	New England Biolabs

## Material und Methoden

PBS (Phosphate Buffered Saline)	Gibco by Life Technologies
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich
Peroxidase Substrat	Sigma-Aldrich
Ready-To-Use 1 kb Ladder	Nippon Genetics
RPMI-Medium 1640	Gibco by Life Technologies
Schwefelsäure	AppliChem
SOC (Super Optimal Broth)	New England Biolabs
Streptavidin-HRP	BD Biosciences
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Trypsin	Lonza

### 2.1.4 Enzyme

AmpliTaq Gold Polymerase	ThermoFisher Scientific
BamHI-HF (20.000 U/ml)	New England Biolabs
BglII	New England Biolabs
EcoRI-HF (20.000 U/ml)	New England Biolabs
FseI	New England Biolabs
HindIII-HF (20.000 U/ml)	New England Biolabs
MluI	New England Biolabs
OptiTaq Polymerase	Roboklon
PstI	New England Biolabs
SalI	New England Biolabs
SpeI	New England Biolabs
XbaI	New England Biolabs

### 2.1.5 Kommerzielle Kits

Amaya CLB Transfection Kit	LONZA
<i>Cytometric Bead Array</i>	BD Biosciences
GeneElute Gel Extraction Kit	Sigma Aldrich
GeneElute HP Plasmid Miniprep Kit	Sigma Aldrich
MasterPure DNA Purification Kit	Epicentre Biotechnologies
Plasmid Midi Kit 100	Qiagen
Quick Ligation Kit	New England Biolabs

## 2.1.6 Oligonukleotide

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion synthetisiert.

**Tabelle 2.1: Verwendete forward (F) und reverse (R) Primer, deren Nukleotidsequenz in 5'-3'-Richtung, sowie ggf. Angaben der Größe der amplifizierten DNA-Fragmente.**

Primername	Nucleotidsequenz (5'-3')	Amplikon (bp)
huCD40L-F huCD40L-R	CGA GGA AAT CAA GAG CCA GTT TCT CAG CAG GAT TCT CTC GAA	369
mCD40L-F mCD40L-R	ACG AGG ACT TCG TGT TCA TC TCT CTG TTG CTG CAG AAT GT	363
CD4-F3 CD4-R3	GAT CGC GCT GAC TCA AGA A AGG TCA AAG GTG ATC CAA GAC	536
huCD80-Fn huCD80-Rn	GTA CAA GAA CCG GAC CAT CTT TTC CTG CTT GGT GGT GTT	454
mCD80-F mCD80-R	AGA GCG AGG ACA GAA TCT ACT GTG TGG TTT CTG GTT GTG TTG	460
Del2-F Del2-R2	GCA ACA AGG TCT GCG TGC CTG CCG ACC CGG CGA TCT GGA TGG TTG GAG CCA TGC C	388 ohne Insert
mGMCSF-F mGMCSF-R	CTG AAT CTG CTG GAC GAC AT GTA GGT GGT CAC TTG TGT CTC	234
Ova-F Ova-R	CAG TGC GTG AAA GAG CTG TA GGG CAG GTA CAC TTT GAT CTT	495
123-F VPepR	ATG AAC CTG GTG CCC ATG G GTG GTG GTT TAC AAT CGC ATT TC	291
374 pdV-R	GGT GCT CAG CGT GGT GGC GGT TTC ACC ACA AGG CCG CCC AGA AGA CGC CGC TAG	Insertspezifisch

### 2.1.7 Antikörper

Der Lebend-Tot-Farbstoff Zombie Aqua wurde von BioLegend geliefert und in einer Verdünnung von 1:400 eingesetzt.

**Tabelle 2.2: Zur FACS-Analyse eingesetzte Antikörper, der Antikörper-Klon sowie gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe, eingesetzte Verdünnung und Hersteller**

<b>Spezifität</b>	<b>Klon</b>	<b>Fluorochrom</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
α-human CD3	OKT3	FITC	1:100	hauseigen
α-human CD4	RPA-T4	Pacific Blue	1:400	BioLegend
α-human CD8	SK1	APC/Cy7	1:150	BioLegend
α-human CD11c	3.9	BV421	1:20	BioLegend
α-human CD14	HCD14	Alexa Fluor 700	1:200	BioLegend
α-human CD19	HIB19	PerCP	1:160	BioLegend
α-human CD40	5C3	PE/Cy7	1:200	BioLegend
α-human CD56	HCD56	BV605	1:20	BioLegend
α-human CD69	FN50	PE	1:20	BioLegend
α-human CD80	2D10	FITC	1:20	BioLegend
α-human CD83	HB15e	APC	1:100	BioLegend
α-human CD86	IT2.2	BV605	1:100	BioLegend
α-human CD154	24-31	APC	1:50	BioLegend
α-human HLA-DR	L243	BV711	1:200	BioLegend
α-human IFNγ	B27	APC	1:400	BioLegend
α-human TNFα	MAb11	PE/Cy7	1:400	BioLegend
α-murin CD80	16-10A1	PE	1:40	BioLegend
α-murin CD154	MR1	APC	1:50	BioLegend
α-murin CD90.2	53-2.1	APC	1:500	BD Biosciences
α-murin CD8	53-6.7	PerCP/Cy5.5	1:900	BioLegend
α-murin CD19	6D5	FITC	1:200	BioLegend
α-murin CD107a	1D4B	BV711	1:50	BD Biosciences
α-murin IFNγ	XMG1.2	APC	1:50	BD Biosciences
α-murin TNFα	MP6-XT22	PE	1:50	BD Biosciences

## Material und Methoden

**Tabelle 2.3: Verwendete Isotypen-Kontrollen sowie gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe und Hersteller**

<b>Isotyp</b>	<b>Klon</b>	<b>Fluorochrom</b>	<b>Hersteller</b>
IgG1κ	MOPC-21	FITC	BioLegend
IgG1κ	MOPC-21	PE	BioLegend
IgG1κ	MOPC-21	APC	BioLegend
IgG1κ	MOPC-21	PE/Cy7	BioLegend
IgG2bκ	MPC-11	BV605	BioLegend
IgG2bκ	MPC-11	BV711	BioLegend

**Tabelle 2.4: Zur Fluoreszenzmikroskopie eingesetzte Antikörper, der Antikörper-Klon sowie gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe, eingesetzte Verdünnung und Hersteller**

<b>Spezifität</b>	<b>Klon</b>	<b>Fluorochrom</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
α-human CD80	2D10	FITC	1:50	BioLegend
α-human CD154	24-31	Alexa Fluor 647	1:50	BioLegend
α-murin CD80	16-10A1	PE	1:40	BioLegend
α-murin CD154	208109	-	1:10	R&D Systems
Goat α-rat IgG	Poly4054	Alexa Fluor 647	1:100	BioLegend

**Tabelle 2.5: Im ELISA eingesetzte Antikörper, der Antikörper-Klon sowie eingesetzte Konzentration und Hersteller**

<b>Antikörper</b>	<b>Klon</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
Biotin Mouse Anti-Mouse IgG2	5.7	0,5 mg/ml	BD Biosciences
Biotin Rat Anti-Mouse IgG1	A85-1	0,5 mg/ml	BD Biosciences
Standard für IgG1	OVA-14	9,8 mg/ml	Sigma-Aldrich

**Tabelle 2.6: *In vivo* eingesetzte Antikörper, der Antikörper-Klon sowie eingesetzte Konzentration und Hersteller**

<b>Antikörper</b>	<b>Klon</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
Anti LAG3	C9B7W	10 mg/kg	BioXcell
Anti PD-1	J43	10 mg/kg	BioXcell

## Material und Methoden

### 2.1.8 Software

BD FACSDiva	BD Biosciences
FlowJo V_10	Tree Star
Fusion-Capt	Peqlap
i-control 1.10	Tecan
ImageJ	NIH
MS Office 2010	Microsoft
NanoDrop 1000 3.7.1	Peqlap
Ti2 control	Nikon
Prism 5	GraphPad
Serial Cloner 2.5	Serial Basics

### 2.1.9 Puffer und Medien

Auftau-Medium	RPMI 0,003 mg/ml DNase
Einfrier-Medium	90 % FCS 10 % DMSO
ELISA Waschlösung	PBS 0,05 % Tween 20
ELISA Blocklösung	PBS 1 % BSA
LB/Amp Medium (flüssig)	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 5 g NaCl 2 ml 2 N NaOH (pH 7,0-7,2) 1 l ddH <sub>2</sub> O 100 µg/ml Ampicillin
LB/Amp Medium (Platten)	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 5 g NaCl 2 ml 2 N NaOH (pH 7,0-7,2) 1 l ddH <sub>2</sub> O 15 g Agar 100 µg/ml Ampicillin
IMDM-Komplettmedium	IMDM 10 % (v/v) hitze-inaktiviertes FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
Nucleofection-Stop Lösung	1 x PBS 3 % FCS

## Material und Methoden

PBE	1 x PBS 0.5 % (v/v) FCS 5 mM EDTA
Permwash	1 x PBS 0,1 % Saponin 0,02 % Natriumazid 0,5 % FCS
PFEA	1 x PBS 2 mM EDTA 2 % FCS 0.02 % Natriumazid
TAE 50x	2 M Tris-Aminomethan 0.5 M EDTA 1M Essigsäure
Tetramer-Puffer	50 % FCS 50 % PBS 2 mM EDTA
T-Zell-Medium (TCM)	RPMI 5 % (v/v) hitze-inaktiviertes humanes Serum 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
Versen Trypsin (VT)	50 ml Trypsin (10x, Lonza) 50 ml PBS (10x, Gibco) 6 mM EDTA 1 l ddH <sub>2</sub> O
Zellkulturmedium Vero-Zellen	DMEM 5 % (v/v) hitze-inaktiviertes FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin

### 2.1.10 Viren

Die in dieser Arbeit verwendeten ORFV Rekombinanten sind im Folgenden gelistet und wurden in der Arbeitsgruppe Amann hergestellt.

- D1701-V-CD4
- D1701-V-D12-Cherry
- D1701-V-GFP
- D1701-V12-PepTrio-D12-Cherry
- D1701-V-CD40L-D12-PepTrio-2-Cherry
- D1701-V12-Ova-D12-GFP
- D1701-V-mGMCSF-D12-Ova-2-GFP
- D1701-V-mCD40L-D12-Cherry

### 2.1.11 Gene und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Fragmente CD80 und PepTrio wurden von der Firma Invitrogen synthetisiert.

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind im Folgenden gelistet und wurden in der Arbeitsgruppe Amann hergestellt.

- pV-CD40L-2-CD80
- pD12-Ova-2-GFP
- pV-mCD40L-2-mCD80
- pV12-mCD80
- pD12-Cherry
- pV12-Cherry

### 2.1.12 Peptide

Tabelle 2.7: Verwendete Peptide, deren Proteinquelle und Hersteller

Aminosäuresequenz	Proteinquelle (Position)	Hersteller
NLVPMVATV	HCMV pp65 (495 - 503)	hauseigen
SIINFEKL	Ovalbumin (257-264)	Sigma-Aldrich

### 2.1.13 Multimere

Tabelle 2.8: Verwendete Multimere, das gebundene Epitop, das konjugierte Fluorochrom und der Hersteller

Typ	Epitop	Fluorochrom	Hersteller
Tetramer	NLVPMVATV	PE	hauseigen
Dextramer	SIINFEKL	PE	Immudex

### 2.1.14 Zelllinien

Für die Herstellung und Anzucht von ORFV D1701-V wurde die adhärente, ORFV-permissive Affennierenzelllinie Vero (ATCC, CCL-81) verwendet. Als Tumorzelllinie *in vivo* diente die murine Melanom-Zelllinie B16-F10 (ATCC, CRL-6475).

### 2.1.15 Primäre humane Zellen

Für die Isolierung von PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, mononukleäre Zellen des peripheren Bluts) wurden Blutproben von gesunden Spendern der Blutspendezentrale Tübingen verwendet.

Die Verwendung von PBMCs aus Spenderbut wurde von der Tübinger Ethikkommission genehmigt: „Einfluss von Orf-Virusvektoren auf Zellen des Immunsystems“. Nummer des Ethikantrags: 156/2012B01

### 2.1.16 Bakterienstämme

Zur Transformationen wurden Bakterien des Stamms *E.coli DH5 $\alpha$*  (*High Efficiency*) der Firma New England Biolabs verwendet.

### 2.1.17 Mausstämme

Für *in vivo*-Versuche wurden Mäuse des C57BL/6-Stamms C57BL/6NTac der Firma Taconic verwendet.

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Für die Herstellung der Transferplasmide wurden die Inserts und die jeweiligen Ausgangsplasmide mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Durch die Verwendung der gleichen Enzyme entstanden komplementäre Enden, die eine Ligation von Insert und Plasmid ermöglichten. Bei der Klonierung der Transferplasmide sowie der anschließenden Kontrollspaltung wurden Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs verwendet. Der Restriktionsverdau erfolgte nach Herstellerangaben in mitgelieferten Restriktionspuffern für 1 h bei 37°C in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l.

### 2.2.2 Agarosegelelektrophorese

Zur Überprüfung eines Restriktionsverdaus oder einer PCR wurden die entstandenen DNA-Fragmente mittels horizontaler Agarosegelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Anhand von DNA-Größenmarkern konnten die Längen der DNA-Fragmente bestimmt werden.

Für die Analyse von DNA-Fragmentlängen wurde ein 1 %iges Agarosegel verwendet. Erfolgte nach der Elektrophorese eine Elution des DNA-Fragments aus dem Gel wurde ein 0,8 %iges Agarosegel eingesetzt. Die Herstellung der Gele erfolgte mittels Agarose-Tabletten, die nach Herstellerangaben in 1 x TAE-Puffer aufgekocht wurden. Pro 100 ml Agaroselösung wurden 3,5  $\mu$ l Midori Green Advanced DNA Stain zugegeben. Nach Bedarf wurden die Proben zusätzlich mit 6 x Ladepuffer (im Verhältnis 1:6) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei ca. 100 Volt in 1 x

TAE-Laufpuffer. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente wurde das Gel anschließend unter UV-Licht fotografiert (Fusion SL, Peqlab).

### **2.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Mittels Gene Elute Gel Extraction Kit (Sigma Aldrich) wurden nach Bedarf DNA-Fragmente aus dem Agarosegel isoliert. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

### **2.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten**

Die Ligation von linearisiertem Ausgangsplasmid und Insert erfolgte in einem Vektor:Insert-Verhältnis von 1:3 oder 1:5. Von den Ausgangsplasmiden wurden 30-50 ng eingesetzt. Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 10 µl Quick Ligationspuffer und 1 µl T4 DNA-Ligase. Die Ligation erfolgte für 5 min bei Raumtemperatur (RT).

### **2.2.5 Transformation von *E.coli* DH5α (High Efficiency)**

Nach der Ligation wurden die entstandenen Plasmide in *E. coli* DH5α (High Efficiency) transferiert. Die Transformation erfolgte nach dem „High Efficiency Transformation-Protocol“ von New England Biolabs. Zur Selektion transformierter *E. coli* wurde der Transformationsansatz anschließend auf LB/Amp-Platten (100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **2.2.6 Plasmidisolierung aus transformierten Bakterien**

Mittels Isolierung der Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli* und einem anschließenden Restriktionsverdau wurden Ligation und Transformation überprüft.

Für die Plasmidisolierung in kleinerem Maßstab wurden 2 ml LB/Amp-Medium (100 µg/ml Ampicillin) mit jeweils einer Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert. Die DNA wurde mittels GeneElute HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma Aldrich) nach Herstellerangaben isoliert.

Die Plasmid-Isolation in größerem Maßstab erfolgte nach Herstellerprotokoll mit dem Plasmid Midi Kit (Qiagen). Hierfür wurden 50 ml LB/Amp-Medium mit jeweils 100 µl Bakterienkultur beimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert.

### **2.2.7 Sequenzierung**

Die Sequenzierungen der Transferplasmide wurden von der Firma GATC Biotech durchgeführt. Diese erfolgte mit 50-80 ng DNA und 5 µM Primer in einem Gesamtvolumen von 10 µl.

### 2.2.8 Isolierung viraler DNA aus infizierten Vero-Zellen

Für die Isolierung der viralen DNA aus infizierten Vero-Zellen wurde das Master Pure DNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies, Biozym) verwendet. Je nach Kultivierung der Zellen in einer 12/24-Loch-Platte, 48/96-Loch-Platte oder 384-Loch-Platte wurden 200 µl (bzw. 75 µl, oder 50 µl) des geernteten Zellysats in 1 ml PBS aufgenommen und für 3 min bei 5000 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 200 µl (bzw. 100 µl, oder 50 µl) *Tissue and Cell Lysis Solution* gelöst, mit 0,6 µl (bzw. 0,3 µl, 0,15 µl) Proteinase K über 10 s auf einem Vortexer gemischt und für 15 min bei 65°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Proben wurden bei -20°C für 2 min inkubiert und mit 50 µl Präzipitations-Reagenz (MPC-Lösung) versetzt. Nach einer Zentrifugation bei 21.000 x g für 10 min bei 4°C wurde der Überstand mit 300 µl (bzw. 170 µl) Isopropanol durch Invertieren gemischt und für 3 min bei 21.000 x g zentrifugiert. Das DNA Pellet wurde mit 300 µl EtOH gewaschen und nach erneuter Zentrifugation für 3 min bei 21.000 x g getrocknet. Das getrocknete DNA-Pellet wurde in 20 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

### 2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion

Für die Überprüfung der rekombinanten Viren wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Hierbei wurden die Inserts der rekombinanten Viren mit Gen-spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert. Zusätzlich wurde der Verlust des parentalen Inserts nachgewiesen. Die korrekte Insertion von Genen in den Del2-Lokus bzw. *vegf*-Lokus wurde zusätzlich mittels einer Lokus-spezifischen PCR analysiert.

Die für die PCR benötigten Primer wurden von Metabion synthetisiert (Tabelle 2.1). Pro 10 µl Reaktionsansatz wurden 5 µl Polymerase-Mix (2 X OptiTaq Polymerase Mastermix oder 2 X AmpliTaq Gold Polymerase Mastermix), 1-2 µl 30 ng Primermix und 3-4 µl DNA verwendet.

Die Durchführung der PCR erfolgte im Supercycler (Kyratec). Einem initialen Denaturierungsschritt (98°C, 2 min) folgten 35-40 Zyklen mit erneuter Denaturierung (96°C, 15 s), der Primer-Hybridisierung (Primer-spezifische Temperatur) und der Elongation (72°C, 30 bzw. 120 s). Nach einem abschließenden Elongations-Schritt (72°C, 2 min) wurden die Proben bis zur Analyse bei 4°C gelagert

Der Ablauf der PCR mit jeweiligem Temperaturprofil ist im Folgenden noch einmal zusammengefasst (Tabelle 2.9).

**Tabelle 2.9: Temperaturprofile der verwendeten PCRs.**

Insert	Initiale Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Finale Elongation
mCD40L	98°C, 2 min	96°C, 15 s	57°C, 30 s	72°C, 30 s	72°C, 2 min
mCD80			62°C, 30 s	72°C, 30 s	
Ova			60°C, 30 s	72°C, 30 s	
mGMCSF			62°C, 30 s	72°C, 30 s	
CD4			62°C, 30 s	72°C, 30 s	
huCD80			59°C, 30 s	72°C, 30 s	
huCD40L			57°C, 30 s	72°C, 30 s	
PepTrio			57°C, 30 s	72°C, 30 s	
Del2 Lokus			65°C, 30 s	72°C, 120 s	
<i>vegf</i> -Lokus			72°C, 30 s	72°C, 120 s	

## 2.3 Virologische Methoden

### 2.3.1 Transfektion ORFV-infizierter Vero-Zellen

Für die Herstellung rekombinanter Orf-Viren wurden die Transferplasmide in Vero-Zellen transfiziert sowie mit ORFV infiziert. Die Transfektion erfolgte mittels Nukleofektion, eine auf Elektroporation basierende Transfektionsmethode. Durch zu dem ORFV-Genom homologe Sequenzen auf den Transferplasmiden konnten die Inserts über homologe Rekombination in das ORFV-Genom integriert werden.

Hierfür wurden zunächst 70-90 % konfluente Vero-Zellen mit 10 ml PBS und anschließend 5 ml VT gewaschen. Nach dem Ablösen der Zellen mit 2,5 ml VT wurden die Zellen in 8 ml NF-*Stopping Solution* (PBS + 3 % FCS) aufgenommen und die Lebendzellzahl bestimmt. Pro Transfektionsansatz wurden  $2 \times 10^6$  Zellen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei 63 rcf zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl Transfektionslösung (*Transfection Supplement* und *CLB Transfection Buffer* im Verhältnis 1:4,5) und 2 µg Plasmid-DNA resuspendiert und in eine Transfektions-Küvette pipettiert. Für die Transfektion wurde das *CLB Transfection Device* (Lonza) verwendet. Nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen mit NF *Stopping Solution* und einer Pasteurpipette aus der Küvette in eine T25-Zellkulturflasche mit 6 ml vorgewärmtem DMEM (+ 5 % FCS) überführt. Anschließend wurden die Zellen mit parentalem Virus (MOI 1.0) infiziert und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 4 h wurden nicht adhärenente Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und das DMEM-Medium gewechselt. Waren nach 72 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> Virus-Plaques und die Bildung eines CPE (Zytopathischer Effekt) sichtbar, wurde das Transfektionslysate geerntet. Durch dreimaliges Einfrieren bei -80°C und Auftauen bei 37°C im Wasserbad wurden die Zellen aufgebrochen und das Virus freigesetzt.

### 2.3.2 Selektion von ORFV-Rekombinanten

Die homologe Rekombination zwischen Transferplasmid und ORFV-Genom tritt nur selten auf und findet in etwa 1 aus 10.000 Zellen statt. Um die rekombinanten Orf-Viren von parentalem Virus zu trennen, können je nach Bedarf verschiedene Selektionsmethoden verwendet werden.

#### 2.3.2.1 FACS-basierte Selektion der ORFV-Rekombinanten

Die Selektion mittels FACS (*Fluorescence activated cell sorting*) basiert auf dem Verlust oder Zugewinn eines Fluoreszenzmarkers wie beispielsweise GFP oder mCherry. Hierfür wurden  $3 \times 10^5$  Vero-Zellen in einer 6-Lochplatte in 3 ml DMEM mit dem Transfektionslysats infiziert. Die Infektion erfolgte dabei in verschiedenen Verdünnungsstufen des Lysats für 20-24 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>. Für eine optimale Selektion sollte eine Verdünnung mit einer geringen Infektionsrate gewählt werden. Nach dem Ernten werden die Vero-Zellen für 5 min bei 400 x g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wird das Zellpellet zweimal mit 10 ml PBE gewaschen. Für eine Färbung der Zellen mit Antikörpern werden diese in 100 µl PBE verdünnt und mit den Zellen für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 10 ml PBS wurde das Zellpellet zum Sortieren in 200 µl PBE aufgenommen. Sortiert wurden die Zellen mittels BD FACSjazz (Biosciences) in eine 96-Lochplatte mit  $1 \times 10^4$  Vero-Zellen pro Vertiefung in 100 µl DMEM. Die sortierten Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 72 h wurden die Vertiefungen der 96-Lochplatte gewählt, die einzelne Virus-Plaques des rekombinanten ORFV oder das beste Verhältnis von rekombinantem ORFV zu parentalem ORFV aufweisen.

#### 2.3.2.2 MACS-basierte Selektion der ORFV-Rekombinanten

Die Selektion mittels MACS (*Magnetic Cell Sorting*) basiert auf der Oberflächenexpression von CD4 auf Vero-Zellen, die mit parentalem, CD4-exprimierenden ORFV infiziert werden.

Für die Infektion werden 80 % konfluente Vero-Zellen in einer T175-Zellkulturflasche verwendet. Der Zellrasen wird mit 10 ml PBS gewaschen. Die Infektion der Zellen erfolgt mit 1/3 des Transfektionslysats, zusammen mit DMEM auf ein Gesamtvolumen auf 8 ml aufgefüllt, für 2 h auf einem Kippschüttler. Nach Infektion wurde das Medium verworfen, die adhären Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und 35 ml frisches DMEM zugegeben. Die Zellen wurden für 20-24 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen einmal mit 10 ml PBS und einmal mit 5 ml VT gewaschen. Der Zellrasen wurde mit 2,5 ml VT abgelöst und in 9 ml Medium aufgenommen. Die abgelösten Zellen wurden in ein 50 ml Röhrchen überführt und für 5 min bei 200 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 300 µl PBE aufgenommen und nach Zugabe von 50 µl α-CD4-MicroBeads in ein 2 ml Reaktionsgefäß transferiert. Der Ansatz wurde für 30 min bei RT auf einem Rotator inkubiert. Nach dem Äquilibrieren der MS-Säule mit 1 ml PBE wurden die Zellen auf die Säule geladen und anschließend dreimal mit 1 ml PBE gewaschen. Durch die Bindung der magnetischen α-CD4-MicroBeads an die mit parentalem Virus infizierten Vero-Zellen befindet sich im Durchlauf der Selektion (negative Fraktion) angereichertes rekombinantes Virus. Nach Bestimmung der Lebendzellzahl werden  $5 \times 10^6$  Vero-Zellen mit  $5 \times 10^6$  Zellen der negativen Fraktion infiziert und in 35 ml DMEM in einer T175-Zellkulturflasche für 20-24 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Um möglichst viel rekombinantes ORFV anzureichern wurde die CD4-negative MACS-Selektion an vier aufeinander folgenden Tagen durchgeführt.

### **2.3.2.3 Selektion der ORFV-Rekombinanten mittels limitierender Verdünnung**

Für die weitere Selektion der rekombinanten Viren und nach der MACS-Selektion wurden limitierende Verdünnungen durchgeführt. Hierfür wurden Viruslysate oder die negative Fraktion der MACS-Selektion verwendet, die in einer 384- oder 96-Lochplatte in einer 1:3-Verdünnungsreihe ausgesät wurden.

$2,5 \times 10^6$  Vero-Zellen wurden in 25 ml DMEM aufgenommen und jeweils 2 ml in die Vertiefungen eines 12-Loch Pipettierreservoirs gegeben. In die erste Vertiefung wurden 3 ml Zellsuspension mit  $3 \times 10^5$  Zellen der negativen Fraktion der MACS-Selektion oder 50-100  $\mu$ l Viruslysat gegeben. Es folgte eine 1:3-Verdünnungsreihe von der ersten bis zur letzten Vertiefung. Mit einer 12-Kanalpipette wurden 50  $\mu$ l bzw. 100  $\mu$ l der Verdünnungsreihe in die 384- bzw. 96-Lochplatte pipettiert. Nach Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> für 72 h wurden die Vertiefungen der 384- bzw. 96-Lochplatte gewählt, die einzelne Virus-Plaques des rekombinanten ORFV oder das beste Verhältnis von rekombinantem ORFV zu parentalem ORFV aufweisen.

### **2.3.3 Anzucht und Aufreinigung von Orf-Viren**

Für die Anzucht von Orf-Viren in großen Mengen wurden 100 % konfluente Vero-Zellen geerntet, auf 6 T175-Zellkulturflaschen verteilt und mit DMEM auf ein Gesamtvolumen von 40 ml aufgefüllt. Nach 24 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Vero-Zellen mit der ORFV-Rekombinante infiziert (MOI 0.3) und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 72 h sollten ca. 30-50 % der Zellen konfluent und deutlicher CPE zu erkennen sein. Das Medium und die mit 3 ml VT abgelösten Zellen wurden in Ultrazentrifugationsbechern vereinigt und für 2 h bei 25.000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml PBS überschichtet und nach Inkubation über Nacht bei 4°C resuspendiert. Durch dreimaliges Einfrieren bei -80°C und Auftauen bei 37°C im Wasserbad wurden die Zellen aufgebrochen und das Virus freigesetzt.

Für die Aufreinigung der Orf-Viren wurde das Pellet zusätzlich mit Ultraschall behandelt. Hierfür wurde das Viruslysat auf Eis dreimal für 20 s mit einem Ultraschallstab beschallt (Sonopuls, Bandelin). Das Viruslysat wurde anschließend auf 3 ml 36 %iger Saccharose in einem UZ-Röhrchen überschichtet und mit einem Schwing-Rotor bei 49.000 x g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 10 ml PBS gewaschen, bei 49.000 x g und 4°C für 30 min zentrifugiert und in 1 ml PBS aufgenommen. Anschließend wurde das Viruslysat dreimal für 20 s auf Eis mit Ultraschall behandelt.

### 2.3.4 Titration von Orf-Viren

Um den Titer von Orf-Viren zu bestimmen wurden  $8 \times 10^4$  Vero-Zellen in jede Vertiefung einer 24-Lochplatte vorgelegt und mit verschiedenen Verdünnungen des Viruslysats infiziert. Für die Verdünnungsreihe wurden neun 1,5 ml-Reaktionsgefäße mit 450  $\mu$ l DMEM vorbereitet. Für die erste Verdünnung ( $10^{-1}$ ) wurden 50  $\mu$ l des Viruslysats in das erste Reaktionsgefäß gegeben. Die 1:10-Verdünnungsreihe wurde bis zu einer Verdünnung von  $10^{-9}$  fortgeführt. 100  $\mu$ l der Verdünnungen wurden entsprechend des in Abbildung 2.1 gezeigten Schemas in die Vertiefungen der 24-Lochplatte pipettiert.

	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$
A	1	2	3	4	5	6
B						
C	$10^{-3}$					
D	ni					

**Abbildung 2.1: Verteilung der Virusverdünnungsstufen in einer 24-Lochplatte für die Titration von Orf-Viren.**  $8 \times 10^4$  Vero-Zellen in jeder Vertiefung wurden mit der angegebenen Verdünnungsstufe infiziert. Zur Kontrolle wurden die Vero-Zellen einer Vertiefung nicht infiziert (ni).

Nach Inkubation für 96 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Virusplaques der verschiedenen Verdünnungsstufen gezählt und der Mittelwert der Replikate ermittelt. Zur Berechnung des Virustiters in *Plaque Forming Units* pro ml (pfu/ml) wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Virustiter} \left( \frac{\text{pfu}}{\text{ml}} \right) = n * 10^{-x} \cdot 10$$

n = Mittelwert der gezählten Virusplaques

x: Verdünnungsstufe, die zum Zählen der Plaques verwendet wurde

## 2.4 Zellbiologische Methoden

### 2.4.1 Kultivierung von Vero-Zellen

Vero-Zellen wurden in 30 ml DMEM unter Zusatz von 5 % (v/v) fötalem Kälberserum (FCS) und 0,2 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (P/S) in T175-Zellkulturflaschen kultiviert. Bei konfluentem Zellrasen wurden die Zellen geerntet. Hierfür wurde das Zellkulturmedium verworfen und die Zellen mit 5 ml Versen Trypsin (VT) gewaschen. Für das Ablösen der adhärenen Zellen wurden 2,5 ml VT verwendet. Nach Inkubation für 2 min wurden die Zellen in 15 ml DMEM aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Vero-Zellen wurden je nach Bedarf in den Verhältnissen 1:2 bis 1:8 in DMEM umgesetzt.

### 2.4.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden 20 µl Zellen mit 20 µl Trypanblau gefärbt und auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Trypanblau wird von toten Zellen aufgenommen und ermöglicht so die Differenzierung von lebenden und toten Zellen. Nach dem Auszählen der vier Eckquadranten wurde die Anzahl lebender Zellen mit folgender Formel bestimmt:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{n}{4} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 10^4$$

### 2.4.3 Isolierung von PBMCs aus Spenderblut

Zur Isolierung von PBMCs aus Spenderblut wurde das entnommene Blut mindestens 1:2 auf ein Gesamtvolumen von mindestens 100 ml mit PBS verdünnt. 25 ml verdünntes Blut wurden über 15 ml Ficoll in einem 50 ml-Röhrchen überschichtet. Die Röhrchen wurden für 20 min bei 700 x g und RT zentrifugiert. Die Leukozytenschicht auf dem Ficoll wurde in ein 50 ml-Röhrchen überführt und auf 50 ml mit PBS aufgefüllt. Nach einer Zentrifugation bei 400 x g und RT für 10 min wurde das Zellpellet in 50 ml PBS resuspendiert und bei 300 x g und RT für 10 min zentrifugiert. Die Zellpellets eines Spenders wurden anschließend in PBS vereinigt und die Lebendzellzahl bestimmt.

### 2.4.4 Isolierung von Monozyten aus PBMCs

Die Aufreinigung von Monozyten aus PBMCs erfolgte mittels CD14+ MACS-Selektion. PBMCs wurden für 10 min bei 300 x g und RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 ml PBE aufgenommen und 100 µl α-CD14-MicroBeads zugegeben. Nach Inkubation für 15 min bei 4°C wurden die Zellen auf eine zuvor mit PBE äquilibrierte LS-Säule geladen. Die Säule wurde dreimal mit 3 ml PBE gewaschen und die CD14+ Monozyten anschließend mit 5 ml PBE aus der Säule mit Hilfe eines Stempels eluiert. Nach der Elution erfolgte die Bestimmung der Lebendzellzahl.

### **2.4.5 Depletion von Monozyten aus PBMCs**

Für die Depletion von Monozyten aus PBMCs wurde eine CD14- MACS-Selektion durchgeführt. Hierfür wurden  $1 \times 10^8$  PBMCs für 10 min bei 300 x g und RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl PBE resuspendiert und 100 µl  $\alpha$ -CD14-MicroBeads zugegeben. Nach Inkubation für 15 min bei 4°C wurden die Zellen auf eine zuvor mit PBE äquilibrierte LD-Säule geladen. Die Säule wurde zweimal mit 1 ml PBE gewaschen. Anschließend wurde die Lebendzellzahl des Durchlaufs, also der Monozyten-depletierten Fraktion, ermittelt.

### **2.4.6 Kultivierung von PBMCs und Monozyten**

Isolierte PBMCs und aufgereinigte Monozyten wurden in IMDM versetzt mit 10 % (v/v) FCS und 0,2 % (v/v) P/S bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Soweit nicht anders angegeben wurden  $5 \times 10^5$  PBMCs und  $1 \times 10^5$  Monozyten in einer 96-Lochplatte mit U-Boden ausgesät.

### **2.4.7 Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen und DCs**

Für die Differenzierung zu Makrophagen wurden die aufgereinigten Monozyten für 5 Tage mit 86 ng/ml GM-CSF stimuliert, für die Differenzierung zu DCs erfolgte die Stimulation für 5 Tage mit 86 ng/ml GM-CSF und 10 ng/ml IL-4. Die Kultivierung erfolgte in IMDM versetzt mit 10 % (v/v) FCS und 0,2 % (v/v) P/S bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>.

### **2.4.8 Einfrieren und Auftauen von PBMCs**

Zum Einfrieren von Zellen wurde Einfrier-Medium (90 % FCS und 10 % DMSO) verwendet. Die Zellen wurden in einer Konzentration von  $1 \times 10^8$ /ml in Cryo-Röhrchen bei -80°C gelagert.

Das Auftauen von Zellen erfolgte in Auftau-Medium (RPMI mit 0,003 mg/ml DNase). In ein 15 ml-Röhrchen wurde 1 ml Auftau-Medium vorgelegt. Die Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C für 1-2 min aufgetaut. Tropfenweise wurden die aufgetauten Zellen zu dem Auftau-Medium in das Röhrchen gegeben. Nach 1 min wurde 1 ml Auftau-Medium dazugegeben, nach einer weiteren Minute 2 ml Auftau-Medium und nach einer weiteren Minute wurden 4 ml Auftau-Medium hinzu pipettiert. Die Zellen wurden bei 400 x g und RT für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml Auftau-Medium resuspendiert und bei 400 x g und RT für 5 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Pellet in 1 ml TCM gelöst.

## 2.5 Funktionelle immunologische Methoden *in vitro*

### 2.5.1 Priming von naiven T-Zellen mit ORFV-infizierten DCs

Für das *Priming* von naiven T-Zellen wurden ORFV-Rekombinanten verwendet, die das HLA-A\*02-restringierte Epitop pp65<sub>495-503</sub> NLVPMVATV des humanen Zytomegalievirus exprimieren. Aus dem Blut von Spendern mit HLA-A\*02 wurden PBMCs isoliert und die Lebendzellzahl bestimmt. Die Gesamtzellzahl sollte ca.  $1 \times 10^9$  betragen. Um zu erfahren, ob beim jeweiligen Spender NLVPMVATV-spezifische T-Gedächtniszellen vorliegen, wurde parallel eine Tetramer-Färbung *ex vivo* durchgeführt. Zusätzlich wurden  $5 \times 10^6$  PBMCs des Spenders mit  $1 \mu\text{M}$  NLVPMVATV-Peptid stimuliert, um die Expansion möglicher NLVPMVATV-spezifischer T-Gedächtniszellen auszuschließen. Hierfür wurde nach 5 Tagen erneut eine Tetramer-Färbung durchgeführt.

Die Hälfte der isolierten PBMCs wurde in Einfriermedium in einer Konzentration von  $1 \times 10^8/\text{ml}$  bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Aus den restlichen PBMCs wurden Monozyten isoliert und zu DCs in einer T175-Zellkulturflasche mit einer Konzentration  $1-2 \times 10^6$  Zellen/ml differenziert. Die negative Fraktion der CD14+ MACS zur Isolierung der Monozyten wurde in Einfriermedium in einer Konzentration von  $1 \times 10^8/\text{ml}$  bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Nach 7 Tagen wurden die DCs geerntet und  $2 \times 10^5$  DCs/Vertiefung/100  $\mu\text{l}$  IMDM in eine 96-Lochplatte mit U-Boden ausgesät. Da als Positivkontrolle mit Peptid beladene DCs dienen, wurde ein Teil der DCs für 24 h mit mehreren Zytokinen stimuliert (10 ng/ml IL-4, 800 U/ml GM-CSF, 10 ng/ml LPS, 100 U/ml IFN- $\gamma$ ).

Für die Isolierung von CD8+ T-Zellen wurden die eingefrorenen PBMCs in Auftau-Medium aufgetaut und für 10 min bei  $300 \times g$  und RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 4 ml PBE aufgenommen und 500  $\mu\text{l}$   $\alpha$ -CD8-MicroBeads zugegeben. Nach Inkubation bei  $4^\circ\text{C}$  für 15 min wurden die Zellen auf eine zuvor äquilibrierte LD-Säule gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit jeweils 3 ml PBE wurden die CD8+ T-Zellen mit 5 ml PBE mittels Stempel aus der Säule eluiert. Nach Bestimmung der Lebendzellzahl wurden die CD8+ T-Zellen in TCM (RPMI mit 5 % humanes Serum und 1 % P/S) mit 5 ng/ml IL-7 in einer Konzentration von  $3 \times 10^6$  Zellen/ml über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die CD8+ T-Zellen wurden anschließend für 10 min bei RT und  $300 \times g$  zentrifugiert und in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/100  $\mu\text{l}$  in TCM aufgenommen und mit 5 ng/ml IL-12 versetzt.

Die in der 96-Lochplatte ausgesäten nicht-gereiften DCs wurden mit verschiedenen ORFV-Rekombinanten für 6 h mit MOI 5.0 infiziert, die gereiften DCs wurden für 2 h mit 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  NLVPMVATV beladen. Anschließend wurden  $1 \times 10^6$  CD8+ T-Zellen in 100  $\mu\text{l}$  zu den DCs gegeben.

Alle 2-3 Tage wurde das Medium gewechselt. Hierfür wurden aus jeder Vertiefung 100  $\mu\text{l}$  Medium entnommen und durch 100  $\mu\text{l}$  TCM mit 40 U/ml IL-2 ersetzt.

7 Tage nach Ko-Kultivierung von DCs und CD8+ T-Zellen wurden diese mit autologen Peptid-beladenen PBMCs re-stimuliert. Hierfür wurden PBMCs des jeweiligen Spenders aufgetaut. Falls anfangs nicht ausreichend PBMCs isoliert werden konnten, wurden hierfür die Zellen der negativen Fraktion der CD14- MACS aufgetaut. Nach dem Auftauen wurden PBMCs in 1 ml TCM resuspendiert und die Lebendzellzahl bestimmt. Die PBMCs wurden anschließend mit 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$

## Material und Methoden

NLVPMVATV beladen und für 2 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Jeweils 1 x 10<sup>6</sup> Peptid-beladene PBMCs wurden nach einer Bestrahlung mit 30 Gy zur Stimulierung zu den *Priming*-Ansätzen gegeben. Insgesamt wurde das *Priming* 3- oder 4-mal im Abstand von 7 Tagen re-stimuliert.

7 Tage nach der letzten Re-Stimulierung erfolgte die Analyse des *Priming* mittels Tetramer-Färbung.

### 2.5.2 Expansion von Antigen-spezifischen T-Gedächtniszellen

Da für die Expansion Antigen-spezifischer T-Gedächtniszellen ORFV-Rekombinanten verwendet wurden, die das HLA-A\*02-restringierte Epitop pp65<sub>495-503</sub> NLVPMVATV des HCMV exprimieren, erfolgte die Isolation von PBMCs aus dem Blut von Spendern mit HLA-A\*02. Um zu erfahren, ob beim jeweiligen Spender NLVPMVATV-spezifische T-Gedächtniszellen vorliegen, wurde parallel eine Tetramer-Färbung *ex vivo* durchgeführt. Nach Bestimmung der Lebendzellzahl wurden jeweils 5 x 10<sup>6</sup> PBMCs in 2 ml TCM pro Vertiefung einer 24-Lochplatte ausgesät und für 6 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die PBMCs wurden mit verschiedenen ORFV-Rekombinanten infiziert oder zur Kontrolle mit 1 – 10 µM NLVPMVATV stimuliert. Alle 2-3 Tage wurden 500 µl verbrauchtes Medium durch 500 µl TCM mit 20 U/ml IL-2 ersetzt. Nach 12 Tagen Stimulation erfolgten die Analyse der Expansion mittels Tetramer-Färbung und die Analyse der Funktionalität der Antigen-spezifischen T-Zellen mit Hilfe einer intrazellulären Zytokin-Färbung.

## 2.6 Funktionelle immunologische Methoden *in vivo*

### 2.6.1 Immunisierung von Mäusen

Weibliche, 7-8 Wochen alte C57BL/6NTac Mäuse wurden zu angegebenen Zeitpunkten intradermal (i.d.) mit 20 µl, intramuskulär (i.m.) mit 20 µl oder intravenös (i.v.) mit 100 µl mit einer finalen Virus-Dosis von 1 x 10<sup>6</sup> pfu/ml immunisiert. Der Kontrollgruppe wurde jeweils dieselbe Menge PBS injiziert.

### 2.6.2 Entnahme von Blut

Die Bestimmung der Antigen-spezifischen T-Zell-Antwort erfolgte durch Dextramer-Färbung in Vollblut. Hierfür wurden die Mäuse mit Isofluran narkotisiert und ca. 25 µl Blut mittels Einmal-Kapillarpipetten retroorbital entnommen. Das Vollblut wurde in einer Microvette® mit EDTA gesammelt.

### 2.6.3 Entnahme von Blutserum

Für die Analyse der Antigen-spezifischen Antikörper-Konzentration im Serum wurde das Blut nach retroorbitaler Entnahme in einer Microvette® mit Serum-Gel gesammelt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 10 000 x g konnte das Serum aus der Microvette® entnommen und bis zur weiteren Verwendung in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß bei -20°C gelagert werden.

### 2.6.4 Isolierung von Splenozyten

Die Analyse der Funktionalität der Antigen-spezifischen T-Zellen erfolgte durch intrazelluläre Zytokinfärbung in Splenozyten. Für die Isolierung der Splenozyten wurde die Milz entnommen und mit Medium (RPMI + 10 % FCS) gespült. In einem 50 ml-Röhrchen wurden 15 ml Medium vorgelegt. Anschließend wurde die Milz mit Hilfe eines Spritzen-Stempels durch ein Zellsieb in das 50 ml-Röhrchen gedrückt und mit Medium auf 30 ml aufgefüllt. Nach Zentrifugation für 7 min bei 500 x g wurde das Pellet in 10 ml ACK Lyse-Puffer aufgenommen und für 4 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde mit 10 ml PBS + 10 % FCS abgestoppt und für weitere 7 min bei 500 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml PBS + 10 % FCS aufgenommen. Nach Bestimmung der Lebendzellzahl wurden die Splenozyten bei 500 x g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in Einfrier-Medium aufgenommen und die Splenozyten in einer Konzentration von  $3 \times 10^6$  Zellen/100 µl bei -80°C bis zu weiteren Verwendung gelagert.

### 2.6.5 Tumormodell

Für die Untersuchung des Tumorzell-Wachstums wurden 7-8 Wochen alten, weiblichen C57BL/6NTac Mäusen  $5 \times 10^5$  B16F10-Zellen in 100 µl PBS subkutan (s.c.) injiziert. Die Mäuse wurden während der Injektion mit Isofluran narkotisiert. Sobald die Tumore eine Größe von 40 – 100 mm<sup>3</sup> erreicht hatten, wurden die Mäuse anhand der Tumorgröße randomisiert, um zu Beginn des Experiments eine ähnliche mittlere Tumorgröße in jeder Gruppe zu erreichen.

Dreimal die Woche wurden sowohl Körpergewicht als auch Tumolvolumen aller Versuchstiere bestimmt, dokumentiert und anhand eines spezifischen *Score Sheets* evaluiert. Die Euthanasie der Mäuse erfolgte nach Narkotisierung durch Isofluran mittels zervikaler Dislokation.

Die Inhibierung des Tumorwachstums wurde wie folgt berechnet:

$$1 - \left( \frac{\text{Mittleres Tumolvolumen der Testgruppe}}{\text{Mittleres Tumolvolumen der Kontrollgruppe}} \right) \times 100 \%$$

## 2.7 Analytische Methoden

### 2.7.1 Ovalbumin-spezifischer IgG1- und IgG2-ELISA

Für die Ermittlung der Konzentration Ovalbumin-spezifischer IgG1- und IgG2-Antikörper im Blutserum von Mäusen wurde ein ELISA durchgeführt. Zunächst wurde die ELISA-Platte über Nacht bei 4°C mit 0,02 mg/ml Ovalbumin beschichtet. Nach dreimaligem Waschen mit 250 µl Waschlösung wurden unspezifische Bindungen mit 100 µl Blocklösung für 3-4 h auf dem Schüttler bei 450 rpm bei RT blockiert. Anschließend erfolgten weitere drei Waschschrte mit jeweils 250 µl Waschlösung. In die Vertiefungen wurden 50 µl der Serumproben bzw. des Standards aufgetragen und die Platte bei 4°C über Nacht inkubiert, wobei die *in vivo* produzierten IgG1- und IgG2-Antikörper an das an der Platte gebundene Ovalbumin binden. Auf drei weitere Waschschrte mit jeweils 250 µl Waschlösung folgte die Inkubation mit 50 µl biotinylierte anti-murin IgG1 (1:300-Verdünnung in Blocklösung) bzw. anti-murin IgG2 (1:600-Verdünnung in Blocklösung) Antikörpern für 2 h bei 450 rpm und RT. Nach Inkubation mit 50 µl HRP-Streptavidin (1:1000-Verdünnung in Blocklösung) für 30 min bei RT im Dunkeln konnten die biotinylierten Antikörper detektiert werden. Nach 6-maligem Waschen mit jeweils 250 µl Waschlösung konnte die Substrat-Reaktion mit 100 µl Peroxidase-Substrat für maximal 30 min entwickelt werden. Die Reaktion wurde anschließend mit 50 µl 2 M Schwefelsäure abgestoppt, bevor die Platte photometrisch bei 450 nm erfasst und die Antikörper-Konzentration anhand der Standardkurve bestimmt werden kann.

### 2.7.2 Cytometric Bead Array

Zur Quantifizierung von Zytokinen in den Überständen ORFV-infizierter PBMCs und DCs wurde der BD™ *Cytometric Bead Array* (CBA) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

### 2.7.3 Färbung von Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie

1 x 10<sup>5</sup> DCs oder Vero-Zellen pro Kompartiment wurden in eine CELLview Zellkulturschale mit 4 Kompartimenten ausgesät und infiziert.

Zur Färbung wurden die Zellen in 3,7 % Formaldehyd (in 1 x PBS) fixiert und für 15 min bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1 x PBS erfolgte der Block mit 5 % FCS in 1 x PBS für 30 min bei 37°C. Die Zellen wurden anschließend bei 37°C für 45 min mit 500 µl Antikörper-Mix in 1 % FCS in 1 x PBS gefärbt. Die Verdünnung der verwendeten Antikörper in 1 % FCS in 1 x PBS erfolgte nach Tabelle 2.4. Nach dreimaligem Waschen mit 1 x PBS wurden die Zellen in 500 µl PBS gelagert. Zur Färbung des Zellkerns wurde pro Kompartiment 1 Tropfen *NucBlue Live Cell Stain* zugegeben und für 20-25 min bei RT im Dunkeln inkubiert.

Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten mittels Nikon Ti2.

### 2.7.4 Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung von Viabilität und Infektionsraten infizierter Zellen sowie der Expression von Oberflächen- und intrazellulären Molekülen wurde die Durchflusszytometrie verwendet. Die

Färbung der Zellen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern erfolgte in 96-Lochplatten mit U-Boden. Die Zentrifugations-Schritte erfolgten bei 4°C und 400 x g für 5 min. Verwendet wurde das BD FACS LSRFortessa (BD Biosciences).

### **2.7.4.1 Hemmung des Fc-Rezeptors**

Um die unspezifische Bindung von Antikörpern an den Fc-Rezeptor zu verhindern, wurden die Zellen vor der Antikörper-Färbung mit Fc-Block (BioLegend) behandelt. Der Fc-Block wurde den Herstellerangaben entsprechend eingesetzt.

### **2.7.4.2 Färbung mit Multimeren**

Die Färbung mittels Tetrameren und Dextrameren diente der Identifizierung und Quantifizierung Antigen-spezifischer T-Zellen. Ein Tetramer besteht aus einem Fluoreszenz-markiertem Streptavidin-Komplex der mit hoher Affinität bis zu vier biotinylierte MHC-Moleküle bindet. Dextramere bestehen dagegen aus einem Dextran-Rückgrat, welches mehrere Fluorophore und MHC-Moleküle trägt. Die in den Multimeren enthaltenen MHC-Moleküle tragen ein Epitop des jeweiligen Antigens und bilden einen Peptid-MHC Komplex. T-Zellen, die sowohl spezifisch für den MHC als auch das gebundene Epitop sind, können nach einer Färbung mit Multimeren im Durchflusszytometer detektiert werden.

Zellen in einer 96-Lochplatte mit U-Boden wurden zweimal mit 200 µl PBS gewaschen und anschließend in 50 µl Tetramer-Lösung bzw. PBS resuspendiert. Die Tetramer-Lösung enthält 50 µl Tetramer-Puffer und 1 µl PE-konjugiertes HLA-Tetramer und wurde vor der Färbung für 5 min bei 4°C und 21.000 x g zentrifugiert. Für die Färbung mit Dextrameren wurden 5 µl Dextramer zu den 50 µl PBS gegeben. Die Inkubation erfolgte bei RT für 30 min im Dunkeln.

### **2.7.4.3 Bestimmung der Zell-Viabilität**

Um die Viabilität von Zellen zu bestimmen wurden diese mit dem Farbstoff Zombie Aqua gefärbt. Zombie Aqua ist ein Amin-reaktiver Fluoreszenzfarbstoff, der die Zellmembran lebender Zellen nicht durchdringen kann. Bei toten Zellen gelangt der Farbstoff in das Zytoplasma und bindet dort an intrazelluläre Proteine. Das deutlich höhere Fluoreszenz-Signal erlaubt die Differenzierung von lebenden und toten Zellen.

Zellen in einer 96-Lochplatte mit U-Boden wurden zweimal mit 200 µl PBS gewaschen und mit 50 µl Zombie Aqua (1:400 in PBS verdünnt) für 30 min bei 4°C im Dunkeln gefärbt.

### **2.7.4.4 Extrazelluläre Antikörperfärbung**

Zur Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen wurden Zellen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt.

Zellen in einer 96-Lochplatte mit U-Boden wurden zweimal mit 200 µl PFEA gewaschen, mit 50 µl Antikörper-Mix in PFEA gefärbt und für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Verdünnungen der verwendeten Antikörper erfolgten nach Tabelle 2.2.

### **2.7.4.5 Intrazelluläre Zytokinfärbung**

Um intrazelluläre Proteine nachzuweisen, wurden Zellen permeabilisiert und mit Fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Für den Nachweis von Zytokinen wurden die Zellen für 12-15 h wie angegeben stimuliert und mit 10 µg/ml Brefeldin A behandelt, um die Sekretion der Proteine zu verhindern. Für die Färbung von CD107a wurde zu diesem Zeitpunkt zusätzlich der entsprechende Antikörper zugegeben.

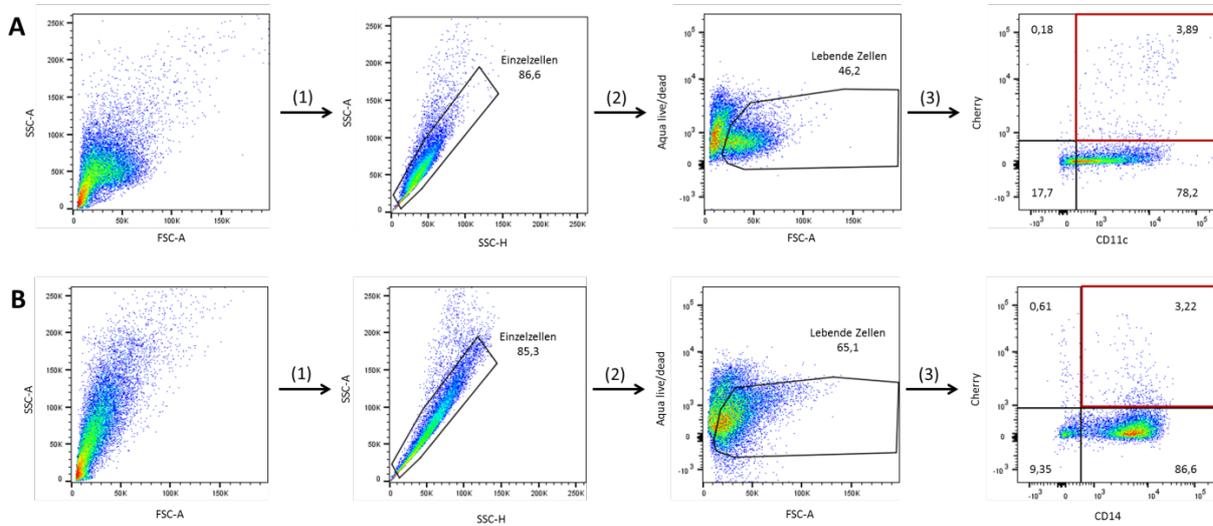
Zellen in einer 96-Lochplatte mit U-Boden wurden zweimal mit 200 µl PFEA gewaschen mit 50 µl Cytofix/Cytoperm für 30 min bei 4°C im Dunkeln permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit 200 µl Permwash wurden die Zellen mit 50 µl Antikörper-Mix in Permwash für 30 min bei 4°C im Dunkeln gefärbt. Die Verdünnungen der verwendeten Antikörper erfolgten nach Tabelle 2.2.

### **2.7.4.6 Fixierung der Zellen für die Durchflusszytometrie**

Für die Fixierung wurden die gefärbten Zellen zweimal mit 200 µl PFEA gewaschen und anschließend in 50 µl PFEA + 1 % Formaldehyd resuspendiert. Die Analyse der Zellen erfolgte innerhalb einer Woche.

### 2.7.5 Gating-Strategien

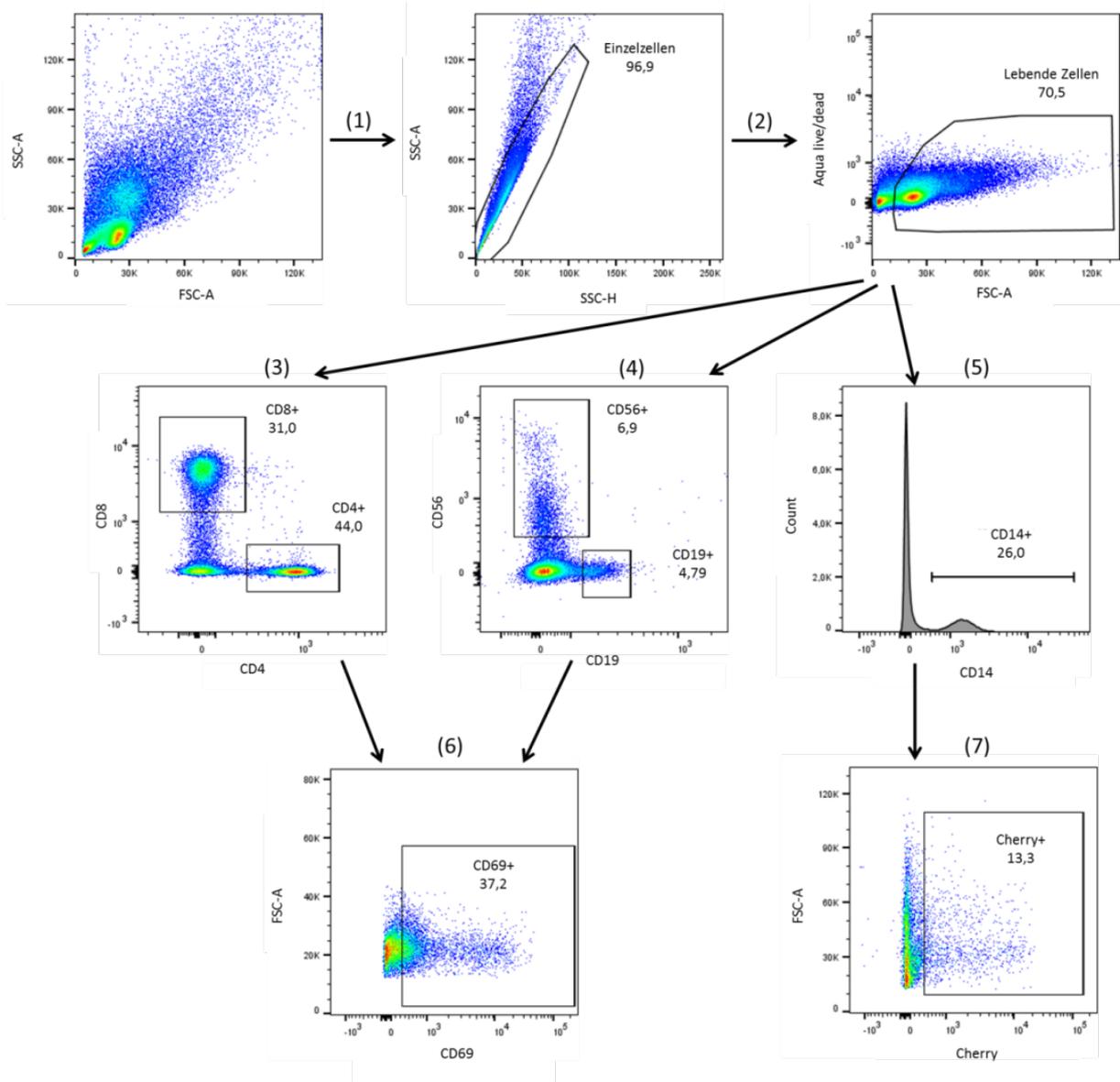
Gating-Strategie die zur Analyse der Infektionsrate und der Expression von Aktivierungsmarkern von Monozyten, Makrophagen und DCs verwendet wurde.



**Abbildung 2.2: Gating-Strategie zur Analyse von DCs, Monozyten und Makrophagen.** A) Gating für dendritische Zellen. B) Gating für Monozyten und Makrophagen. 1) Identifikation von Einzelzellen. 2) Identifikation von viablen Zellen. 3) Identifikation von infizierten Zellen (rot).

## Material und Methoden

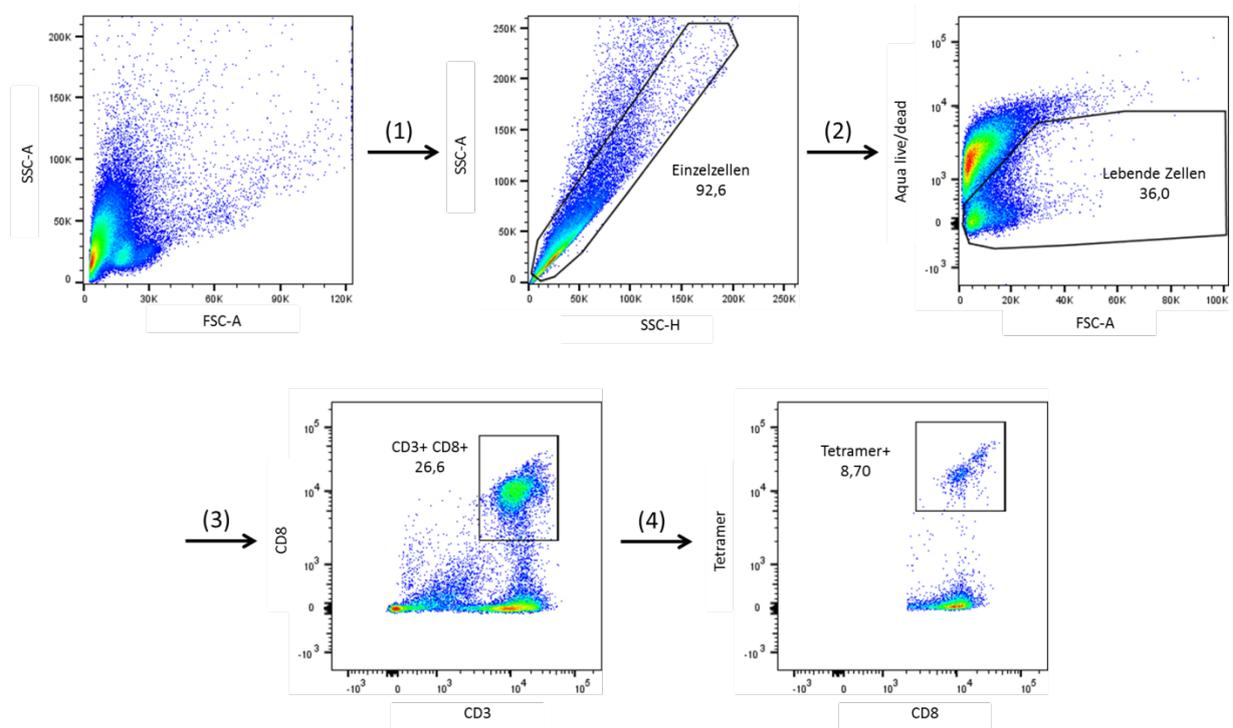
*Gating*-Strategie die zur Analyse der CD69-Expression von PBMCs verwendet wurde.



**Abbildung 2.3: *Gating*-Strategie zur Analyse von PBMCs.** 1) Identifikation von Einzelzellen. 2) Identifikation von viablen Zellen. 3) Identifikation von CD4+ und CD8+ T-Zellen. 4) Identifikation von CD56+ NK-Zellen und CD19+ B-Zellen. 5) Identifikation von CD14+ Monozyten. 6) Bestimmung des Anteils CD69+ PBMCs. 7) Bestimmung des Anteils infizierter Monozyten.

## Material und Methoden

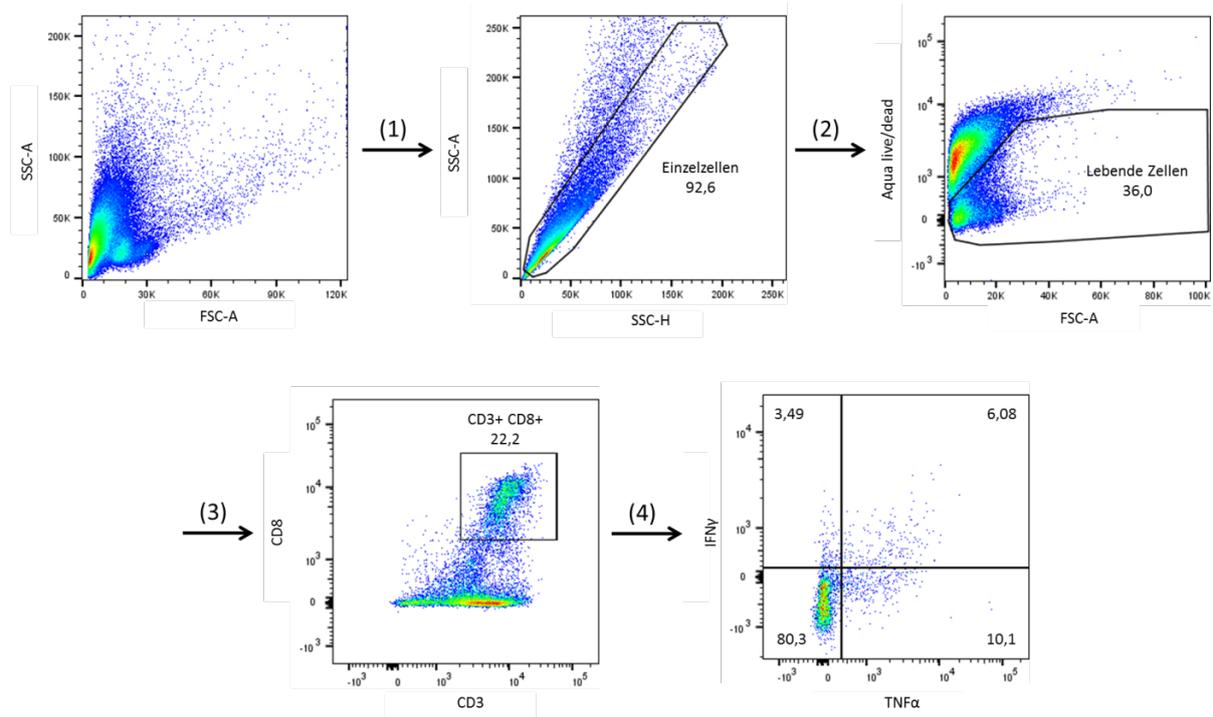
*Gating*-Strategie die zur Identifikation von Antigen-spezifischen T-Zellen mittels Tetramer-Färbung verwendet wurde.



**Abbildung 2.4: *Gating*-Strategie zur Analyse der Tetramer-Färbungen.** 1) Identifikation von Einzelzellen. 2) Identifikation von viablen Zellen. 3) Identifikation von CD8+ T-Zellen. 4) Identifikation von Tetramer+ Zellen.

## Material und Methoden

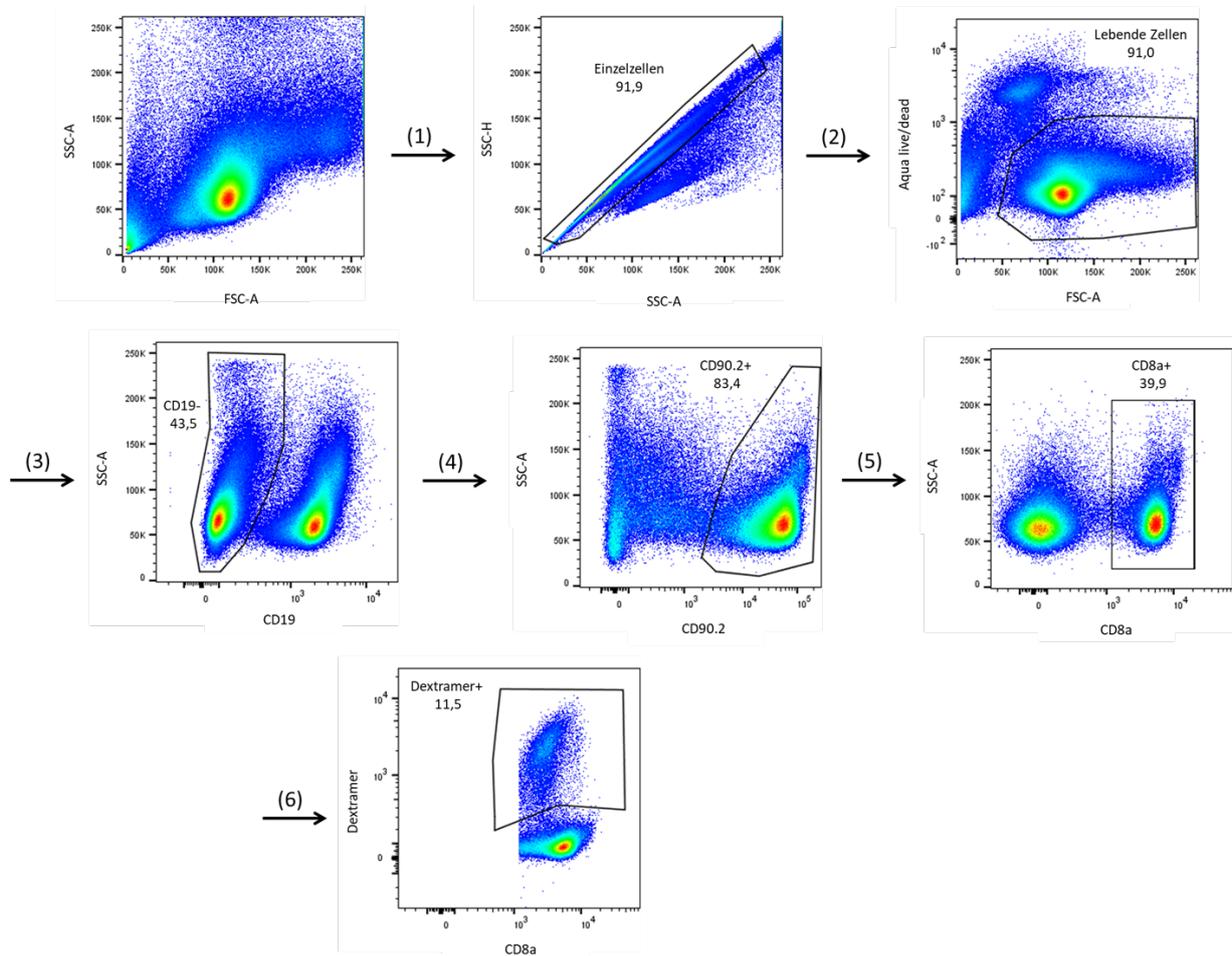
*Gating*-Strategie die zur Analyse der Funktionalität Antigen-spezifischer T-Zellen mittels intrazellulärer Zytokinfärbung verwendet.



**Abbildung 2.5: *Gating*-Strategie zur Analyse der Zytokinproduktion Antigen-spezifischer T-Zellen.** 1) Identifikation von Einzelzellen. 2) Identifikation von viablen Zellen. 3) Identifikation von CD8+ T-Zellen. 4) Identifikation der TNFα+ und IFNγ+ und TNFα+ IFNγ+ T-Zellen.

## Material und Methoden

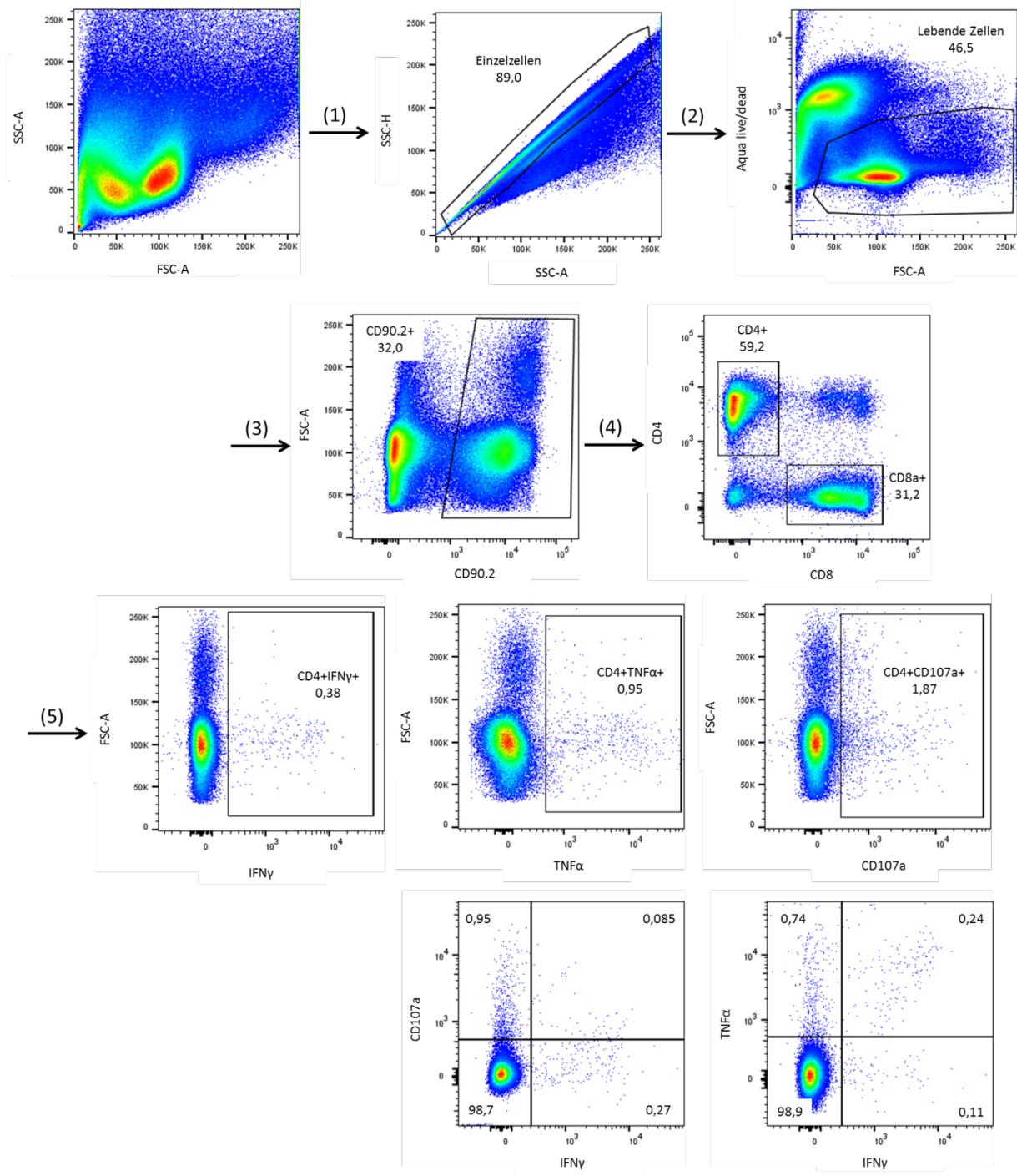
*Gating*-Strategie die zur Identifikation von Antigen-spezifischen T-Zellen mittels Dexramer-Färbung verwendet wurde.



**Abbildung 2.6: *Gating*-Strategie zur Analyse der Dexramer-Färbungen.** 1) Identifikation von Einzelzellen. 2) Identifikation von viablen Zellen. 3) Identifikation von CD19- Zellen. 4) Identifikation von T-Zellen. 5) Identifikation von CD8+ T-Zellen. 6) Identifikation von Dexramer+ Zellen.

## Material und Methoden

*Gating*-Strategie die zur Analyse der Funktionalität Antigen-spezifischer T-Zellen mittels intrazellulärer Zytokinfärbung von murinen Splenozyten verwendet wurde.



**Abbildung 2.7: *Gating*-Strategie zur Analyse der Zytokinproduktion von murinen Antigen-spezifischen T-Zellen.** 1) Identifikation von Einzelzellen. 2) Identifikation von viablen Zellen. 3) Identifikation von T-Zellen. 4) Identifikation von CD4+ und CD8+ T-Zellen. 5) Identifikation der CD107a+, TNF $\alpha$ + und IFN $\gamma$ + und TNF $\alpha$ + IFN $\gamma$ + und CD107a+ IFN $\gamma$ + T-Zellen.

# 3 - Ergebnisse

---

## 3.1 Mechanismus der ORFV-induzierten Immunstimulierung

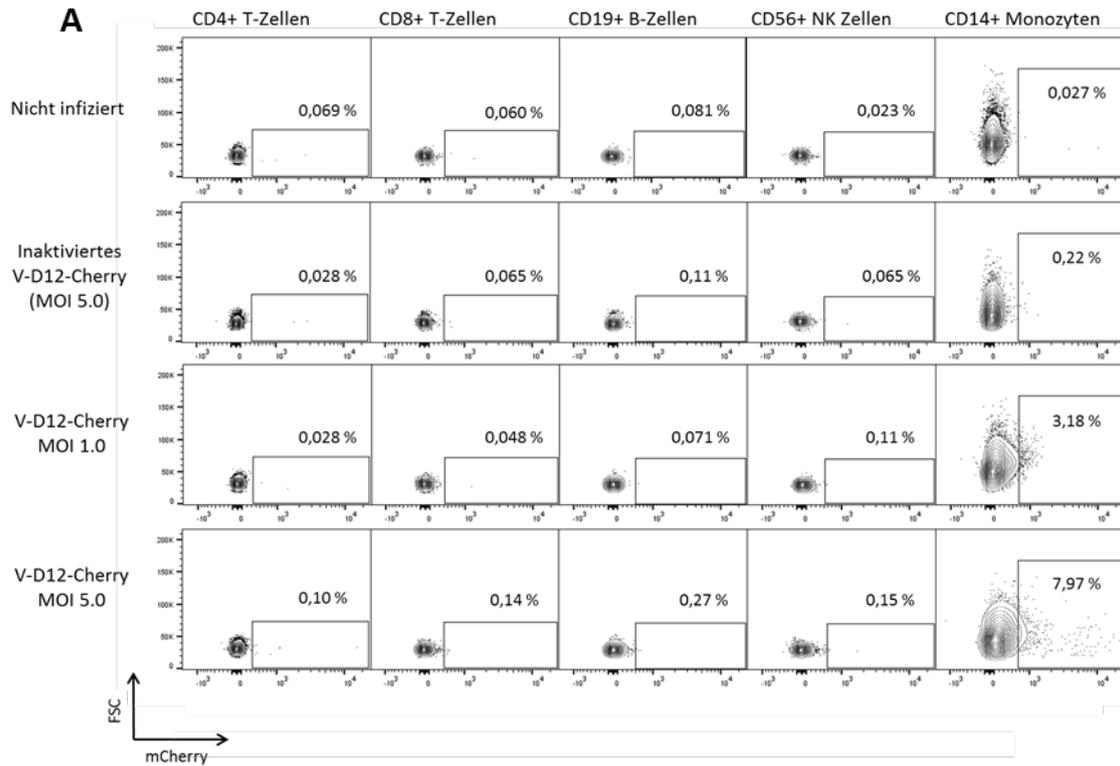
### 3.1.1 Zell-Tropismus von ORFV in humanen Leukozyten

Für die Analyse des Zell-Tropismus von ORFV in Leukozyten wurden humane PBMCs aus dem Blut gesunder Spender isoliert. Die PBMCs wurden für 24 h mit V-D12-Cherry (MOI 1.0 und 5.0) infiziert, als Kontrollen dienten nicht infizierte PBMCs und PBMCs die mit inaktivierten V-D12-Cherry stimuliert wurden (Virusmenge entspricht MOI 5.0). Nach Stimulierung wurden die Zellen geerntet und mit Antikörpern gefärbt, die spezifisch an die Oberflächenmarker der verschiedenen Zellpopulationen binden. Die Infektionsrate wurde mit Hilfe der mCherry-Expression bestimmt.

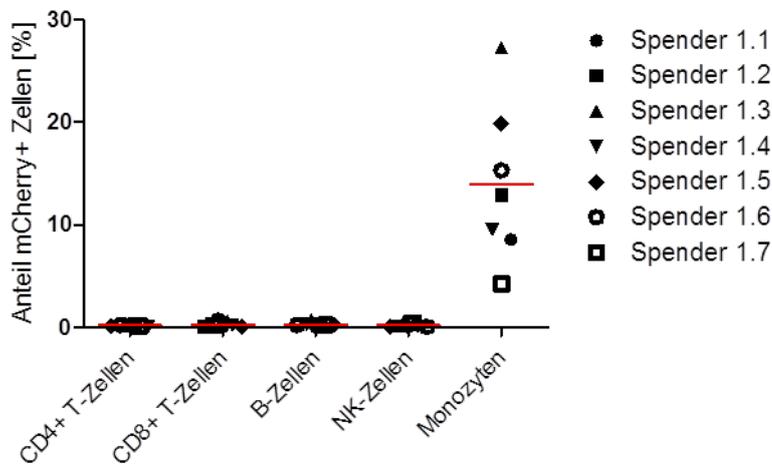
Mittels Durchflusszytometrie wurde die mCherry-Expression in CD14+ Monozyten nachgewiesen. Die Analyse der Zellen eines Spenders ist exemplarisch in Abbildung 3.1 dargestellt. Während nach Infektion mit V-D12-Cherry (MOI 1.0 und MOI 5.0) 3,18 % bzw. 7,97 % der Monozyten mCherry exprimierten, war kein Fluoreszenzsignal in CD4+ und CD8+ T-Zellen, CD19+ B-Zellen oder CD56+ NK-Zellen zu detektieren. Nach Stimulierung mit inaktiviertem V-D12-Cherry war keine Expression von mCherry zu erkennen (Abbildung 3.1 A).

Auch die Infektion von PBMCs 7 weiterer Spender mit V-D12-Cherry (MOI 5.0) zeigte die mCherry-Expression im Mittel in ca. 12 % der Monozyten, jedoch nicht in den anderen Zellpopulationen (Abbildung 3.1 B). Der Anteil infizierter Monozyten unterschied sich sehr zwischen den verschiedenen Experimenten. Je nach Spender lag der Anteil infizierter Monozyten bei ca. 3 – 27 %.

# Ergebnisse



**B mCherry+ Zellen**



**Abbildung 3.1: Analyse der mCherry-Expression nach Infektion von humanen PBMCs.** A) Die Infektion mit V-D12-Cherry (MOI 1.0 und 5.0) sowie die Stimulierung mit inaktiviertem V-D12-Cherry (Virusmenge entspricht MOI 5.0) erfolgte für 24 h. Der prozentuale Anteil infizierter mCherry+ CD4+ und CD8+ T-Zellen, CD19+ B-Zellen, CD56+ NK-Zellen und CD14+ Monozyten wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für 7 unabhängige Experimente. B) Nach Isolierung der PBMCs von 7 verschiedenen Spendern erfolgte die Infektion mit V-D12-Cherry (MOI 5.0) für 24 h. Dargestellt sind die Daten von 7 unabhängigen Experimenten und der berechnete Mittelwert (roter Balken).

### 3.1.2 Infektion von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen

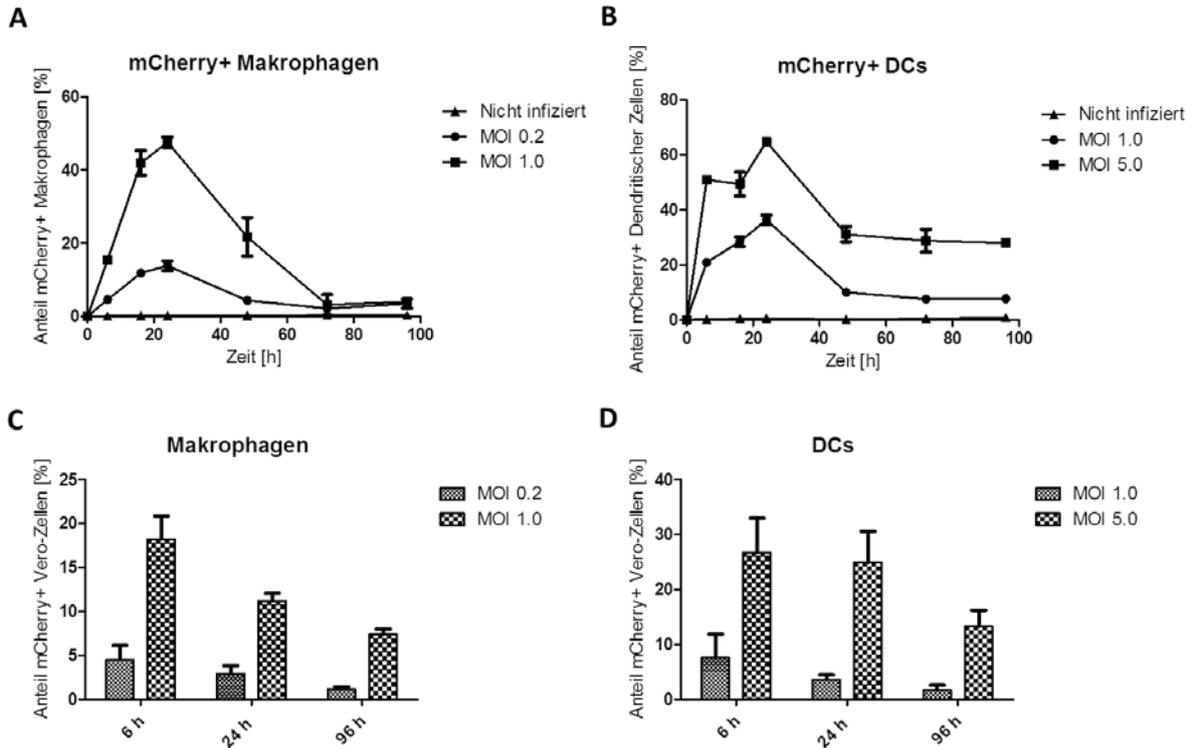
Nachdem gezeigt wurde, dass das ORFV nach Infektion von humanen Leukozyten nur in Monozyten vorzufinden ist, sollte analysiert werden, ob auch weitere APCs, wie Makrophagen und DCs, empfänglich für ORFV sind.

Für die Generierung von Makrophagen und DCs wurden zunächst PBMCs isoliert und anschließend Monozyten mittels CD14+ MACS-Selektion angereichert. Durch Zugabe von GM-CSF bzw. GM-CSF und IL-4 differenzierten die Monozyten in den folgenden fünf Tagen zu Makrophagen bzw. DCs. Die Infektion mit V-D12-Cherry erfolgte anschließend in einer Kinetik von 6 h bis 96 h. Mittels Durchflusszytometrie wurde der Anteil mCherry-positiver Makrophagen bzw. DCs ermittelt. Abbildung 3.2 A und B zeigen die Ergebnisse für Makrophagen bzw. DCs exemplarisch für jeweils einen Spender. Nach Infektion von Makrophagen mit MOI 0.2 bzw. MOI 1.0 und von DCs mit MOI 1.0 bzw. MOI 5.0 konnte eine Expression von mCherry in professionellen APCs nachgewiesen werden. Bereits nach 6 h wurde die mCherry-Expression detektiert. Der größte Anteil an mCherry+ Zellen war nach 24 h zu sehen. Bei Makrophagen führte die Infektion mit MOI 0.2 bzw. MOI 1.0 zu einem Anteil von ca. 18 % bzw. ca. 50 % mCherry+ Zellen nach 24 h (Abbildung 3.2 A). Der Anteil infizierter DCs lag nach Infektion mit MOI 1.0 bzw. 5.0 bei ca. 40 % bzw. ca. 60 % (Abbildung 3.2 B). Nach 24 h Infektion nahm der Anteil mCherry+ Zellen wieder ab. Bei den infizierten Makrophagen wurden, unabhängig von der verwendeten MOI, nach 72 h nur noch ca. 2 % mCherry+ Zellen detektiert (Abbildung 3.2 A). Der Anteil mCherry+ DCs blieb von 48 h bis 96 h Infektion dagegen beinahe unverändert bei ca. 10 % bzw. ca. 30-40 % nach Infektion mit MOI 1.0 bzw. MOI 5.0 (Abbildung 3.2 B).

Um zu überprüfen, ob ORFV in humanen APCs repliziert, wurde die Virusmenge in APCs zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion mit V-D12-Cherry untersucht. Hierfür wurden die APCs nach 6 h, 24 h und 96 h Infektion entnommen und durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen aufgebrochen. Mit 100 µl dieser APC-Lysate wurden Vero-Zellen für 24 h infiziert. Der Anteil an infizierten Vero-Zellen gibt Aufschluss über die Virusmenge in den APC-Lysaten zum Erntezeitpunkt. Führt die Infektion mit den 96 h-Lysaten zu einem größeren Anteil infizierter Vero-Zellen als die Infektion mit den 6 h-Lysaten, so würde dies auf eine Virusvermehrung innerhalb der APCs hinweisen. Eine Abnahme infizierter Vero-Zellen würde dagegen für die Abwesenheit einer viralen Replikation sprechen.

Abbildung 3.2 zeigt, dass die Infektion der Vero-Zellen mit den 6 h-Lysaten der Makrophagen die mit MOI 0.2 bzw. MOI 1.0 infiziert wurden zu ca. 5 % bzw. ca. 20 % infizierten Zellen führte, während nach Infektion mit den 96 h-Lysaten nur ca. 2 % bzw. ca. 10 % Vero-Zellen infiziert wurden (Abbildung 3.2 C). Die Infektion der Vero-Zellen mit den 6 h-Lysaten der DCs die mit MOI 1.0 bzw. MOI 5.0 infiziert wurden, führte zu ca. 8 % bzw. ca. 30 % infizierter Vero-Zellen. Die Infektion der Vero-Zellen mit den 96 h-Lysaten resultierte dagegen in einer verringerten Infektionsrate von ca. 2 % bzw. 15 % (Abbildung 3.2 D). In den Zell-Lysaten der APCs nach 6 h Infektion waren somit mehr infektiöse Viruspartikel als nach 96 h Infektion, die Virusmenge nahm folglich ab. Diese Ergebnisse zeigen, dass keine virale Replikation in Makrophagen und DCs stattfindet (Abbildung 3.2, C und D).

## Ergebnisse



**Abbildung 3.2: Kinetik der mCherry-Expression in infizierten APCs.** A) Makrophagen und B) DCs wurden für 6 h bis 96 h mit V-D12-Cherry infiziert (MOI 0.2 und MOI 1.0 bzw. MOI 1.0 und MOI 5.0). Der Anteil mCherry+ APCs wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. C) und D) Analyse der Virusmenge in infizierten Makrophagen und DCs nach 6 h, 24 h und 96 h Infektion. Mit V-D12-Cherry infizierte APCs und deren Zellkulturüberstand wurden nach 6 h, 24 h und 96 h Infektion geerntet. Mit 100  $\mu$ l der Zelllysate wurden Vero-Zellen für 24 h infiziert. Der Anteil infizierter Vero-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt und gibt Aufschluss auf die Virusmenge 6 h, 24 h und 96 h nach Infektion in den APCs.

### 3.1.3 Analyse der Aktivierung von humanen APCs und PBMCs nach ORFV-Infektion

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob APCs durch die Infektion mit ORFV aktiviert werden. Hierfür wurden Monozyten aus den PBMCs gesunder Spender mittels CD14+ MACS isoliert und mit V-D12-Cherry (MOI 0.2, MOI 1.0 und MOI 5.0) für 24 h infiziert. Die Infektionsrate wurde mit Hilfe der mCherry-Expression bestimmt. Für die Analyse der Aktivierung wurde die Expression verschiedener Aktivierungsmarker untersucht. Die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 sowie das MHC Klasse II-Molekül HLA-DR werden auf aktivierten APCs verstärkt exprimiert. Durch die Färbung mit spezifischen Antikörpern kann die Expressionsstärke dieser Marker durchflusszytometrisch bestimmt werden. Nicht infizierte Zellen sowie Zellen, die mit inaktiviertem V-D12-Cherry stimuliert wurden dienten als negative Kontrolle. Für die positive Kontrolle wurden Monozyten mit LPS stimuliert, einem TLR4-Liganden dessen Bindung APCs aktiviert [210].

## Ergebnisse

Mit Hilfe der Monozyten eines Spenders wird der Einfluss einer Infektion mit ORFV auf die Aktivierung von Monozyten im Detail erläutert (Abbildung 3.3). Die Stimulierung der Monozyten mit inaktiviertem V-D12-Cherry oder LPS hatte im Vergleich zu nicht infizierten Zellen keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen, diese betrug nach wie vor 70-80 %. Auch zeigten diese Zellen keine mCherry-Expression, was auf eine effektive Inaktivierung zurück zu führen ist. Durch das inaktivierte Virus wurden die Monozyten nicht aktiviert, alle analysierten Aktivierungsmarker blieben nahezu unverändert im Vergleich zu nicht infizierten Monozyten. Nach Infektion mit V-D12-Cherry mit verschiedenen Mengen an Viruspartikeln wurde eine mCherry-Expression in den Monozyten detektiert. Mit zunehmender Virusmenge nahm der Anteil lebender Zellen von 59,8 % nach Infektion mit MOI 0.2 bis 24,8 % nach Infektion mit MOI 5.0 ab und der Anteil mCherry+ Zellen von 2,38 % nach Infektion mit MOI 0.2 bis 11,9 % nach Infektion mit MOI 5.0 zu. Die Analyse der Expression des Oberflächenmarkers CD14 zeigte, dass mit zunehmender Infektionsrate der Anteil an CD14+ Zellen abnimmt. Die CD14-/mCherry+ Population (blaue Histogramme) zeigt im Vergleich zur CD14+/mCherry+ Population (rote Histogramme) eine deutlich geringere Expression der Aktivierungsmarker. Auch im Vergleich zu den nicht infizierten Zellen werden CD86, HLA-DR und CD40 in der CD14-/mCherry+ Population schwächer exprimiert. Die Analyse der Zellgröße (FSC) ergab außerdem, dass mit zunehmender Infektionsrate auch der Anteil kleinerer Zellen zunimmt. Auf der geringeren Zelloberfläche kleinerer Zellen werden weniger Moleküle exprimiert, was in einer verringerten Expressionsstärke von CD14 und der Aktivierungsmarker resultiert. Die infizierten Monozyten (CD14+/mCherry+, rote Histogramme) zeigen abhängig von der Virusmenge eine erhöhte Expression aller analysierten Aktivierungsmarker. Während CD86, HLA-DR und CD40 bei höherer Infektionsrate weniger stark exprimiert werden, bleibt CD80 bei einer erhöhten Expressionsstärke. Auch die Analyse von nicht infizierten Monozyten die in Kontakt mit infizierten Zellen sind (Bystander, CD14+/mCherry-, schwarze Histogramme) zeigt eine Hochregulierung der Aktivierungsmarker CD80, CD86 und CD40. Auch in dieser Population nimmt die Expressionsstärke von CD86, HLA DR und CD40 mit höherer Virusmenge ab.

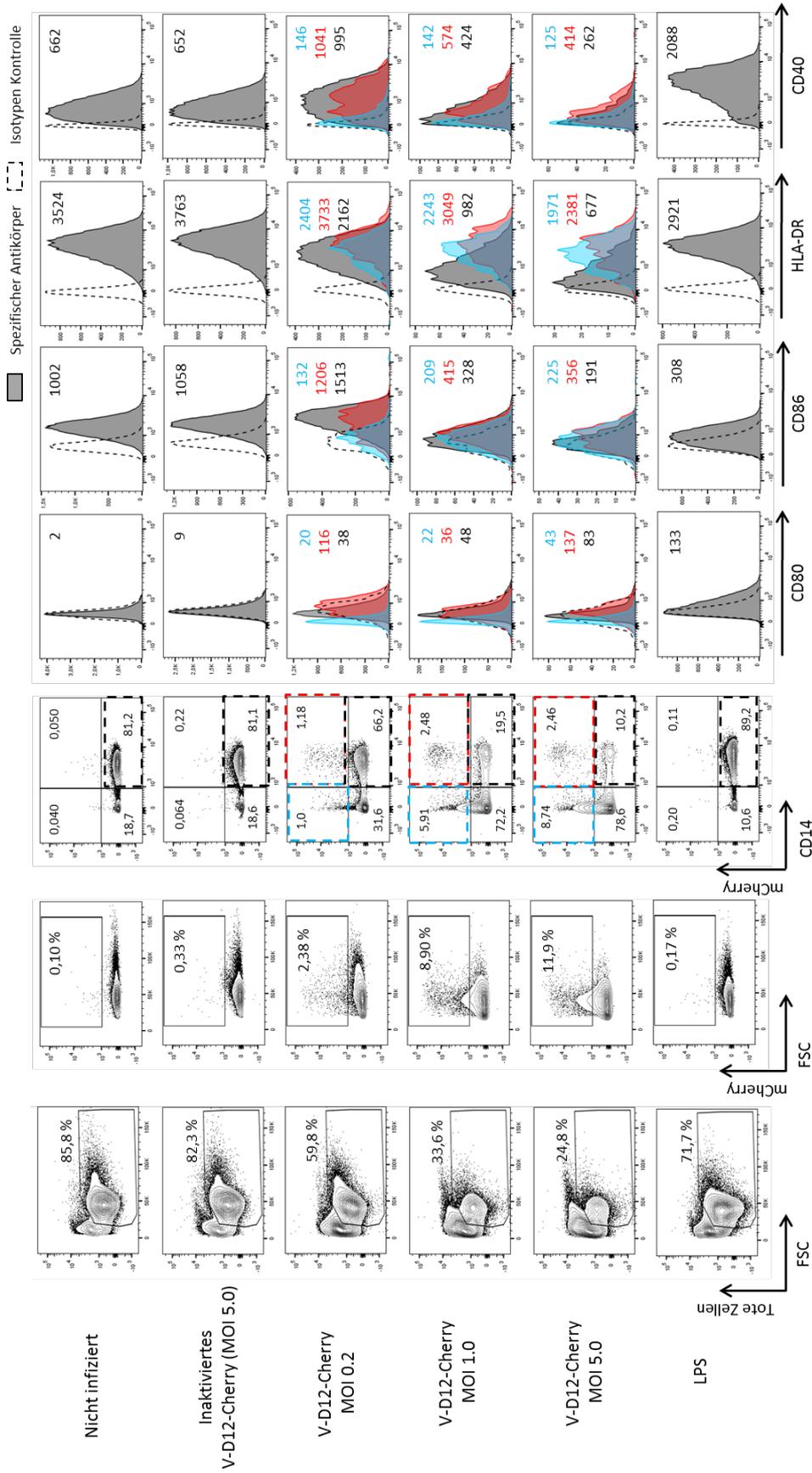
Da die Expression der Aktivierungsmarker abhängig von der Infektionsrate ist und die Infektionsrate bei gleicher Dosis zwischen den Spendern sehr variiert, wurden in den folgenden Experimenten die Monozyten der verschiedenen Spender mit verschiedenen MOIs von MOI 0.2 bis MOI 5.0 infiziert. Um sicherzustellen, dass die Ergebnisse mit den Zellen unterschiedlicher Spender vergleichbar sind und um die unterschiedlichen Infektionsraten in den verschiedenen Experimenten zu berücksichtigen, wurden die Proben analysiert, die unabhängig von der eingesetzten MOI zu vergleichbaren Infektionsraten führten. Die Expression der Aktivierungsmarker wurde dabei innerhalb der CD14+/mCherry+ Population betrachtet und gegen die CD14+/mCherry- Population der negativen Kontrolle verglichen.

Abbildung 3.4 zeigt die Zusammenfassung der Aktivierung von Monozyten, die von 5 verschiedenen Spendern isoliert wurden. Die mittlere Infektionsrate der analysierten Zellen lag nach 24 h Infektion bei ca. 6 % (Abbildung 3.4 A). Die Analyse der relativen Expressionsstärke im Vergleich zu nicht infizierten Zellen zeigte eine um den Faktor 1,2 bis 1,6 signifikant verstärkte Expression von CD86 (Abbildung 3.4 C). Die Expression von CD80, HLA-DR und CD40 nach Infektion fällt je nach Spender unterschiedlich aus und ist sehr heterogen. Während die Expression von CD80 bei Spender 2.2 um das 7-fache erhöht ist, wurde bei den Monozyten der weiteren Spender eine 1-3-fache Erhöhung detektiert (Abbildung 3.4 B). HLA-DR wurde in den infizierten Monozyten 4 verschiedener Spender 1-1,6-mal stärker exprimiert. Bei den

## Ergebnisse

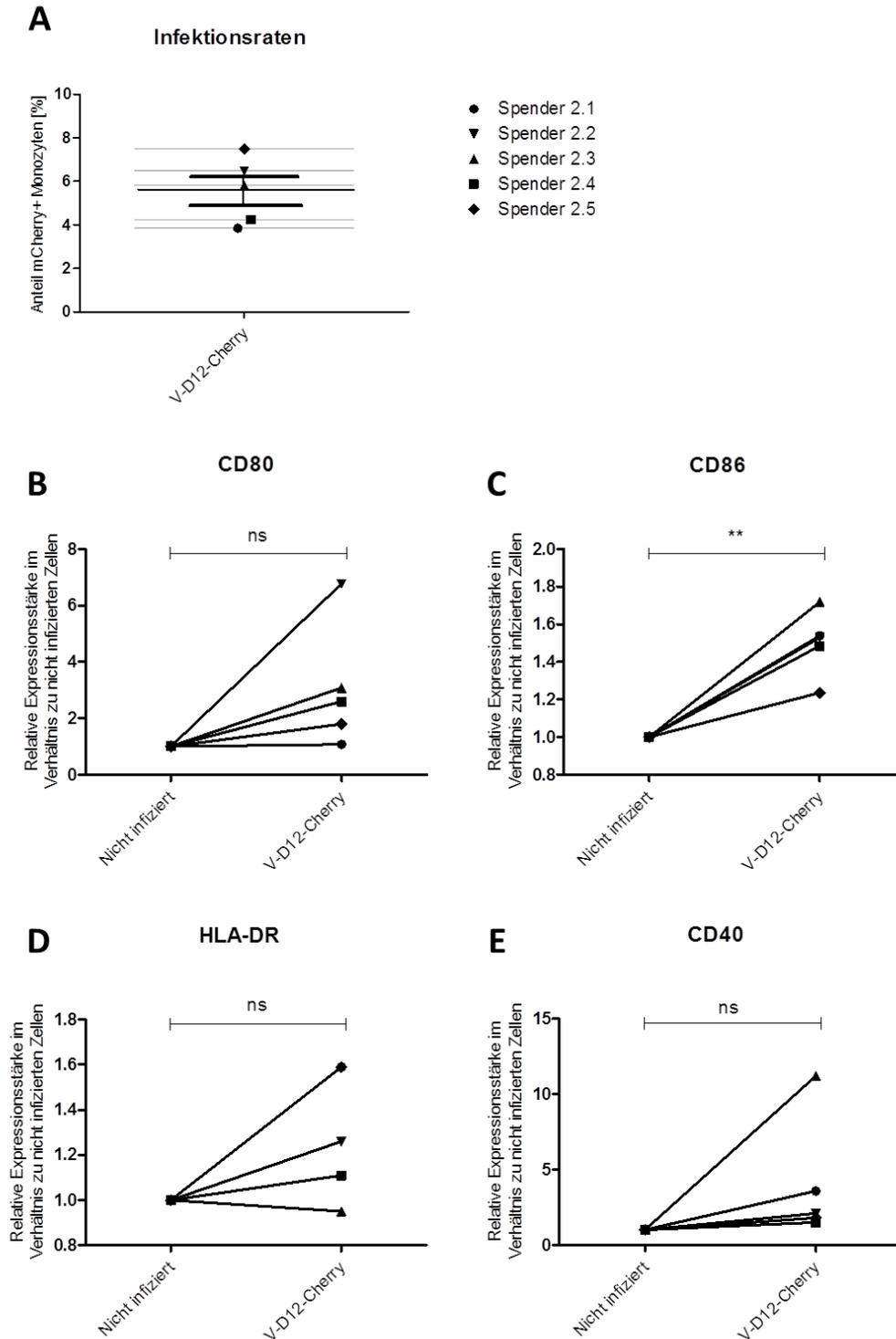
Monozyten von Spender 2.3 wurde HLA-DR weniger stark exprimiert als in der nicht infizierten Kontrolle (Abbildung 3.4 D). Die Expression von CD40 war in den Monozyten der meisten Spender nach Infektion 1-3-mal stärker. Bei den Monozyten von Spender 2.3 zeigte sich eine Erhöhung um den Faktor 10 (Abbildung 3.4 E). Zusammenfassend zeigt sich eine Hochregulierung der analysierten Aktivierungsmarker und folglich die Aktivierung der Monozyten nach Infektion mit V-D12-Cherry.

# Ergebnisse



**Abbildung 3.3: Analyse der Viabilität, Infektionsrate und Aktivierung von Monozyten nach Infektion mit V-D12-Cherry.** Aus den PBMCs eines gesunden Spenders wurden Monozyten mittels CD14+ MACS isoliert, mit V-D12-Cherry infiziert (MOI 0.2, MOI 1.0 und MOI 5.0) oder mit inaktiviertem V-D12-Cherry stimuliert (Virusmenge entspricht MOI 5.0). Nach 24 h erfolgte die Bestimmung des Anteils lebender Zellen und des Anteils infizierter mCherry+ Zellen über Durchflusszytometrie. Die Analyse der Expressionsstärke erfolgte für alle Bedingungen in der CD14+Cherry- Population (schwarz). Bei den infizierten Zellen wurde die Expressionsstärke zusätzlich in der CD14-Cherry+ Population (blau) und der CD14+Cherry+ Population (rot) betrachtet. Die Expressionsstärke ist als mittlere Fluoreszenzintensität dargestellt und wurde über den geometrischen Mittelwert bestimmt. Gefüllte Histogramme: Fluoreszenzintensität nach Färbung mit spezifischen Antikörpern. Gepunktete Linie: Fluoreszenzintensität nach Färbung mit Isotypen-Kontrollen. Das dargestellte Experiment ist repräsentativ für 5 unabhängige Experimente.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.4: Aktivierung von Monozyten nach Infektion mit V-D12-Cherry.** Nach Isolierung von Monozyten über CD14+ MACS aus den PBMCs gesunder Spender erfolgte die Infektion mit V-D12-Cherry. A) Anteil infizierter mCherry+ Monozyten nach 24 h Infektion. B)-E) Relative Expressionsstärke der Aktivierungsmarker CD80 (B), CD86 (C), HLA-DR (D) und CD40 (E) nach Infektion mit V-D12-Cherry im Verhältnis zur Expressionsstärke auf nicht infizierten Monozyten. Dargestellt ist die Änderung der Expressionsstärke in jedem der 5 unabhängig durchgeführten Experimente. Die statistische Analyse erfolgte durch einen gepaarten t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %: ns =  $p > 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ .

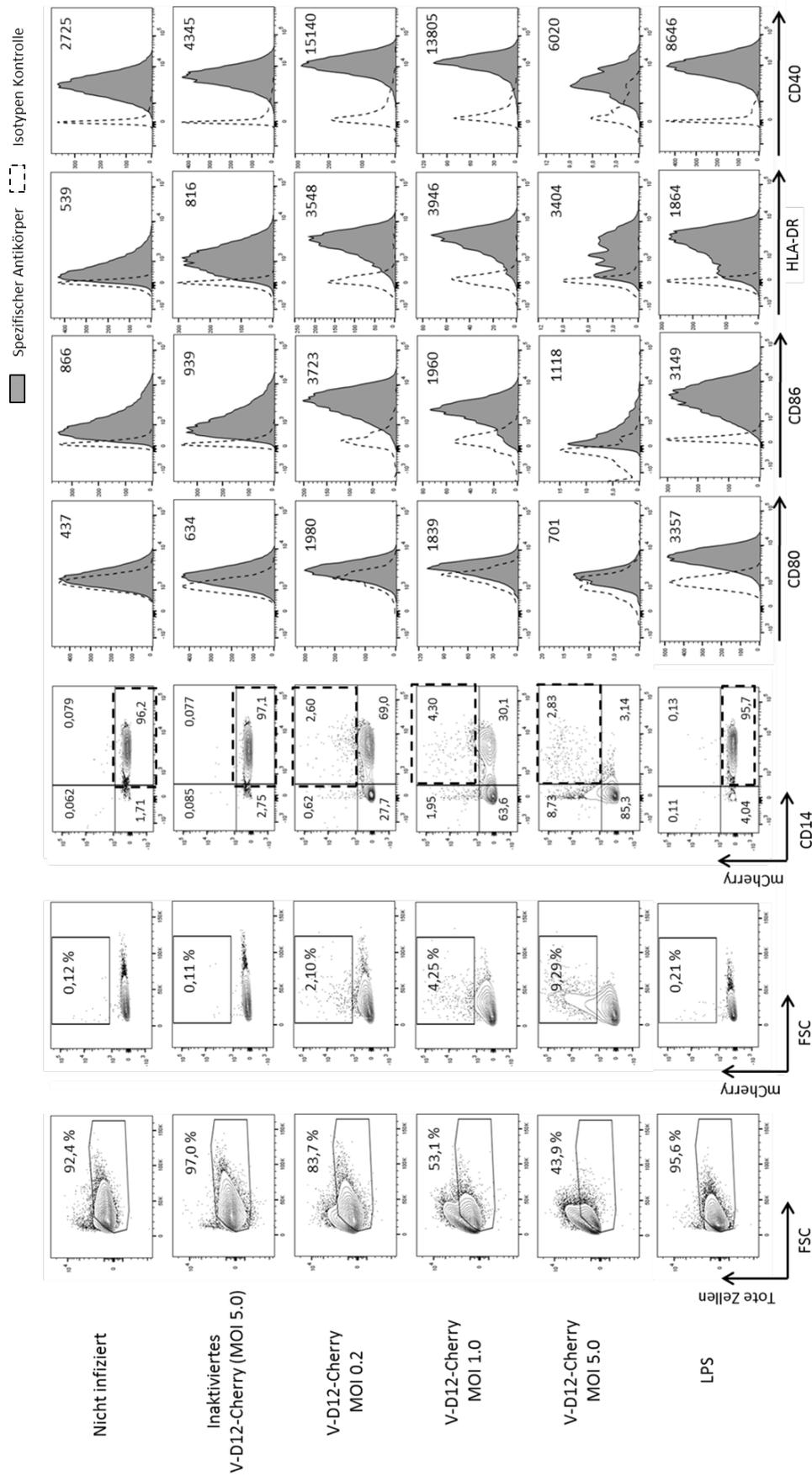
## Ergebnisse

*In vivo* erfolgt die Ausbildung einer adaptiven Immunantwort nicht nur über Monozyten, sondern vor allem über professionelle APCs in den Geweben, wie DCs und Makrophagen. Im Folgenden wurde daher untersucht, ob auch DCs und Makrophagen durch eine Infektion mit V-D12-Cherry aktiviert werden.

Für die Differenzierung zu Makrophagen wurden isolierte Monozyten für 5 Tage mit GM-CSF stimuliert. Nach Infektion mit V-D12-Cherry (MOI 0.2, MOI 1.0 und MOI 5.0) für 24 h wurden die Zellen geerntet und mit Antikörpern spezifisch für den Oberflächenmarker CD14 sowie die Aktivierungsmarker CD80, CD86, HLA-DR und CD40 gefärbt. Als negative Kontrolle dienten nicht infizierte Zellen sowie Zellen, die mit inaktiviertem V-D12-Cherry stimuliert wurden (Virusmenge entsprach MOI 5.0). Zur positiven Kontrolle wurden die Zellen mit LPS stimuliert. Wie zuvor bei der Infektion der Monozyten beobachtet, nimmt auch bei den Makrophagen mit zunehmender Infektionsrate der Anteil lebender Zellen ab. Nach der Infektion mit MOI 0.2 wurden 83,7 % lebende Zellen detektiert, während nach Infektion mit MOI 5.0 der Anteil lebender Zellen bei 43,9 % lag. Die Stimulierung mit inaktiviertem V-D12-Cherry oder LPS hatte keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen, der Anteil lebender Zellen lag bei über 90 %. Der Anteil mCherry+ Zellen nimmt entsprechend der verwendeten MOI zu, von 2,1 % nach Infektion mit MOI 0.2 bis 9,29 % nach Infektion mit MOI 5.0. Jedoch zeigt sich auch hier, dass die Zellen bei einer höheren Infektionsrate kleiner werden und die Expression von CD14 abnimmt. Die Expression der verschiedenen Aktivierungsmarker ist auch bei den Makrophagen abhängig von der eingesetzten Virusmenge. Während die Infektion mit einer MOI 0.2 zu einer 4-6-fachen Expression von CD80, CD86 und CD40 führt, bewirkt die Infektion mit MOI 5.0 eine 1,5-2-fache Expression dieser Marker im Vergleich zu nicht infizierten Zellen. Lediglich HLA-DR wird bei allen getesteten MOIs im Vergleich zu nicht infizierten Zellen 6-mal stärker exprimiert (Abbildung 3.5). Um zu gewährleisten, dass die Ergebnisse mit den Zellen unterschiedlicher Spender möglichst vergleichbar sind und um die Unterschiede bei der Infektionsrate in verschiedenen Experimenten zu berücksichtigen, wurden die Proben analysiert, die unabhängig von der eingesetzten MOI zu vergleichbaren Infektionsraten führten. Bei den infizierten Zellen wurde die Expression der Aktivierungsmarker in der CD14+mCherry+ Population betrachtet, bei nicht infizierten Zellen dagegen die CD14+mCherry- Population.

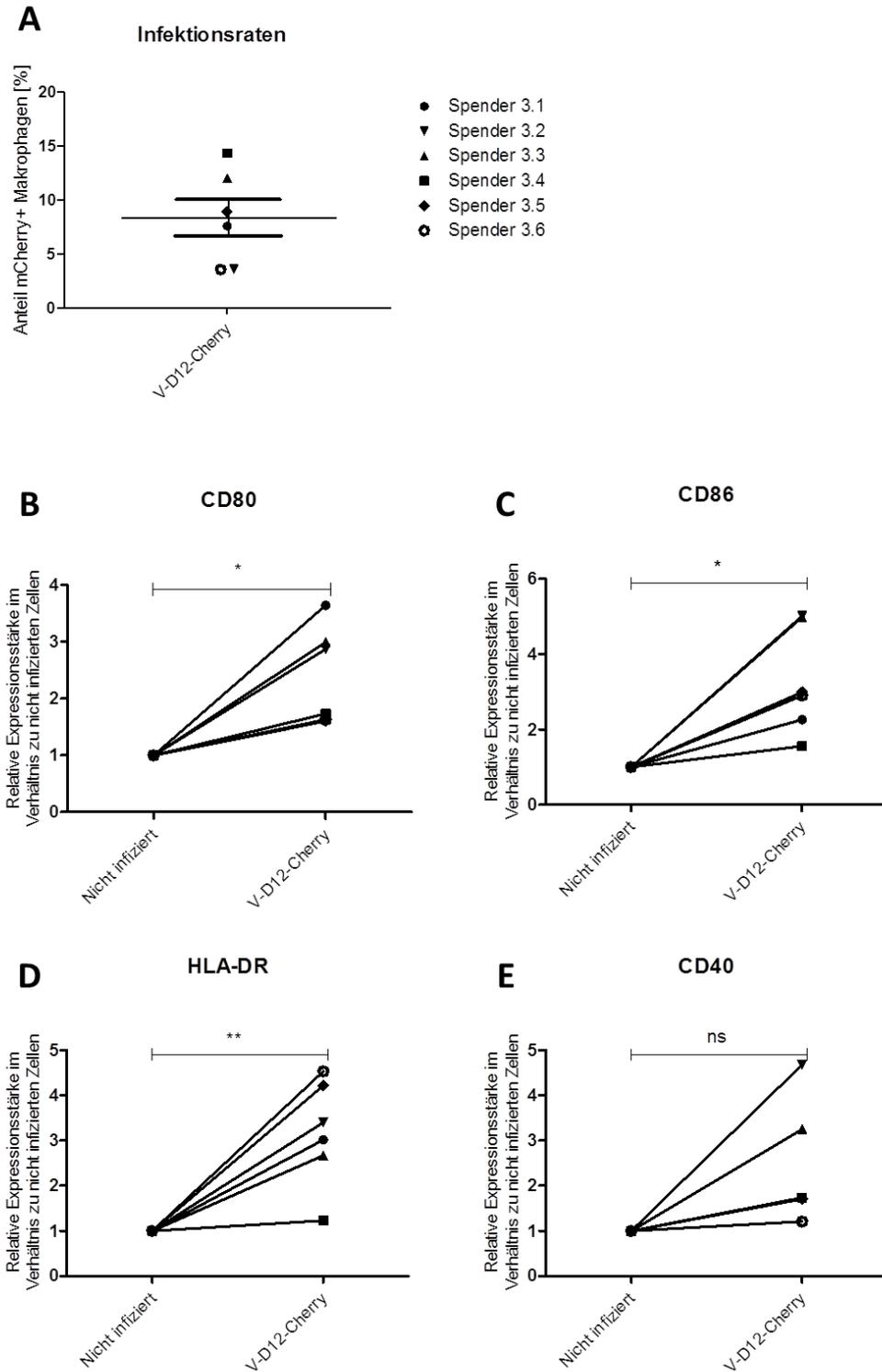
Abbildung 3.6 zeigt die Zusammenfassung der Aktivierung von Makrophagen, analysiert in 6 unabhängigen Experimenten mit den Zellen unterschiedlicher Spender. Die mittlere Infektionsrate der infizierten Makrophagen betrug ca. 10 % (Abbildung 3.6 A). Die Analyse der relativen Expressionsstärke im Vergleich zu nicht infizierten Zellen zeigte eine Hochregulierung der analysierten Aktivierungsmarker. CD80 war bei den Spendern 3.1, 3.2 und 3.3 3-mal stärker exprimiert als auf nicht infizierten Zellen. Bei den Zellen der Spender 3.4, 3.5 und 3.6 wurde eine 1,5-2-fach erhöhte Expression detektiert (Abbildung 3.6 B). Die Expression von CD86 war nach Infektion mit V-D12-Cherry 2-5-mal stärker als in bei nicht infizierten Makrophagen (Abbildung 3.6 C). HLA-DR zeigte bei den Makrophagen von 5 der 6 analysierten Spender nach Infektion eine 3-4-mal stärkere Expression. Bei den Makrophagen von Spender 3.4 war nur eine geringfügig stärkere Expression von HLA-DR zu erkennen (Abbildung 3.6 C). CD40 wurde von den Makrophagen der Spender 3.2 und 3.3 3-4-mal stärker exprimiert. Bei den Makrophagen vier weiterer Spender war eine 1,5-2-fach erhöhte Expression zu sehen (Abbildung 3.6 E). Diese Ergebnisse zeigten, dass Makrophagen durch die Infektion mit V-D12-Cherry aktiviert werden.

# Ergebnisse



**Abbildung 3.5: Analyse der Viabilität, Infektionsrate und Aktivierung von Makrophagen nach Infektion mit V-D12-Cherry.** Aus den PBMCs eines gesunden Spenders wurden Monozyten mittels CD14+ MACS isoliert und zu Makrophagen differenziert. Nach Infektion mit V-D12-Cherry (MOI 0.2, MOI 1.0 und MOI 5.0) oder Stimulierung mit inaktiviertem V-D12-Cherry (Virusmenge entspricht MOI 5.0) für 24 h erfolgte die Bestimmung des Anteils lebender Zellen und des Anteils infizierter mCherry+ Zellen über Durchflusszytometrie. Die Analyse der Expressionsstärke erfolgte für nicht infizierte Zellen und Zellen die mit inaktiviertem V-D12-Cherry oder LPS stimuliert wurden in der CD14+Cherry- Population. Bei den infizierten Zellen wurde die Expressionsstärke in der CD14+Cherry+ Population betrachtet. Die Expressionsstärke ist als mittlere Fluoreszenzintensität dargestellt und wurde über den geometrischen Mittelwert bestimmt. Gefüllte Histogramme: Fluoreszenzintensität nach Färbung mit spezifischen Antikörpern. Gepunktete Linie: Fluoreszenzintensität nach Färbung mit Isotypen-Kontrollen. Das dargestellte Experiment ist repräsentativ für 6 unabhängige Experimente.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.6: Aktivierung von Makrophagen nach Infektion mit V-D12-Cherry.** Nach Isolierung von Monozyten über CD14+ MACS aus den PBMCs gesunder Spender erfolgte die Differenzierung in Makrophagen und Infektion mit V-D12-Cherry. A) Anteil infizierter mCherry+ Makrophagen nach 24 h Infektion. B)-E) Relative Expressionsstärke der Aktivierungsmarker CD80 (B), CD86 (C), HLA-DR (D) und CD40 (E) nach Infektion mit V-D12-Cherry im Verhältnis zur Expressionsstärke auf nicht infizierten Makrophagen. Dargestellt ist die Änderung der Expressionsstärke in jedem der 6 unabhängig durchgeführten Experimente. Die statistische Analyse erfolgte durch einen gepaarten t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %: ns =  $p > 0.05$ , \* =  $p \leq 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ .

## Ergebnisse

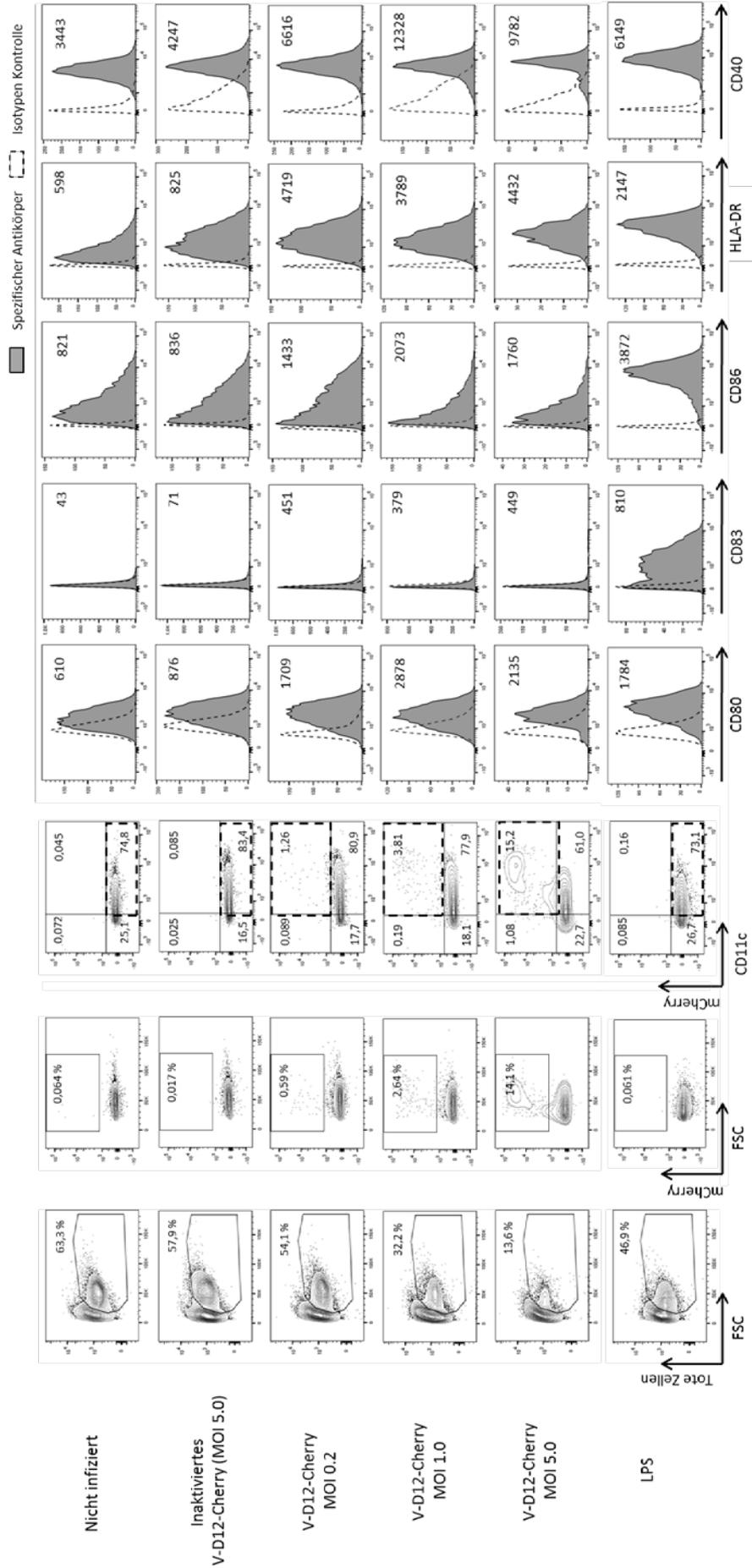
Durch die Stimulierung mit GM-CSF und IL-4 wurden isolierte Monozyten über 5 Tage zu DCs differenziert. Nach Infektion mit V-D12-Cherry (MOI 0.2, MOI 1.0 und MOI 5.0) wurden die Zellen geerntet und mit Antikörpern spezifisch für den Oberflächenmarker CD11c und die Aktivierungsmarker CD80, CD86, HLA-DR und CD40 gefärbt. Zusätzlich wurden DCs auf die Expression von CD83 untersucht, ein Aktivierungsmarker reifer DCs. Als negative Kontrollen dienten Zellen, die mit inaktiviertem V-D12-Cherry stimuliert wurden (eingesetzte Virusmenge entspricht MOI 5.0) und nicht infizierte Zellen. Für die positive Kontrolle wurden die DCs mit LPS stimuliert.

Die nicht infizierten DCs des exemplarisch dargestellten Spenders zeigten eine reduzierte Viabilität von 63,6 % (Abbildung 3.7). Nach Infektion nahm der Anteil lebender Zellen mit zunehmender Infektionsrate von 54,1 % nach Infektion mit MOI 0.2 bis 23,6 % nach Infektion mit MOI 5.0 ab. Analog zu den infizierten Monozyten und Makrophagen, nimmt auch bei den DCs der Anteil kleinerer Zellen zu. Die Expression des Oberflächenmarkers CD11c auf den DCs ist, anders als die CD14-Expression der Monozyten und Makrophagen, nicht so stark reduziert. Auch der Einfluss der eingesetzten Virusmenge auf die Expression der Aktivierungsmarker ist vergleichsweise gering. Die Expression von CD80, CD86 und CD40 ist 2-4-mal stärker nach Infektion mit V-D12-Cherry im Vergleich zu nicht infizierten Zellen, während die Expression von HLA-DR um das 6-8-fache erhöht ist. Die Analyse der Expression von CD83 ergab für die infizierten DCs dieses Spenders eine 8-10-mal stärkere Expression im Vergleich zu nicht infizierten Zellen.

Ähnlich zur Infektion von Monozyten und Makrophagen resultierte auch die Infektion von DCs verschiedener Spender mit derselben MOI in unterschiedlichen Infektionsraten. Um eine möglichst vergleichbare Analyse der Expression von Aktivierungsmarkern in verschiedenen Experimenten zu gewährleisten, wurden die DCs daher mit verschiedenen MOIs infiziert. Für die Zusammenfassung unterschiedlicher Spender wurden die Proben analysiert, die unabhängig von der eingesetzten MOI eine vergleichbare Infektionsrate aufwiesen. Die Expression der Aktivierungsmarker der infizierten Zellen wurde in der CD11c+mCherry+ Population analysiert, die der nicht infizierten Zellen in der CD11c+mCherry- Population.

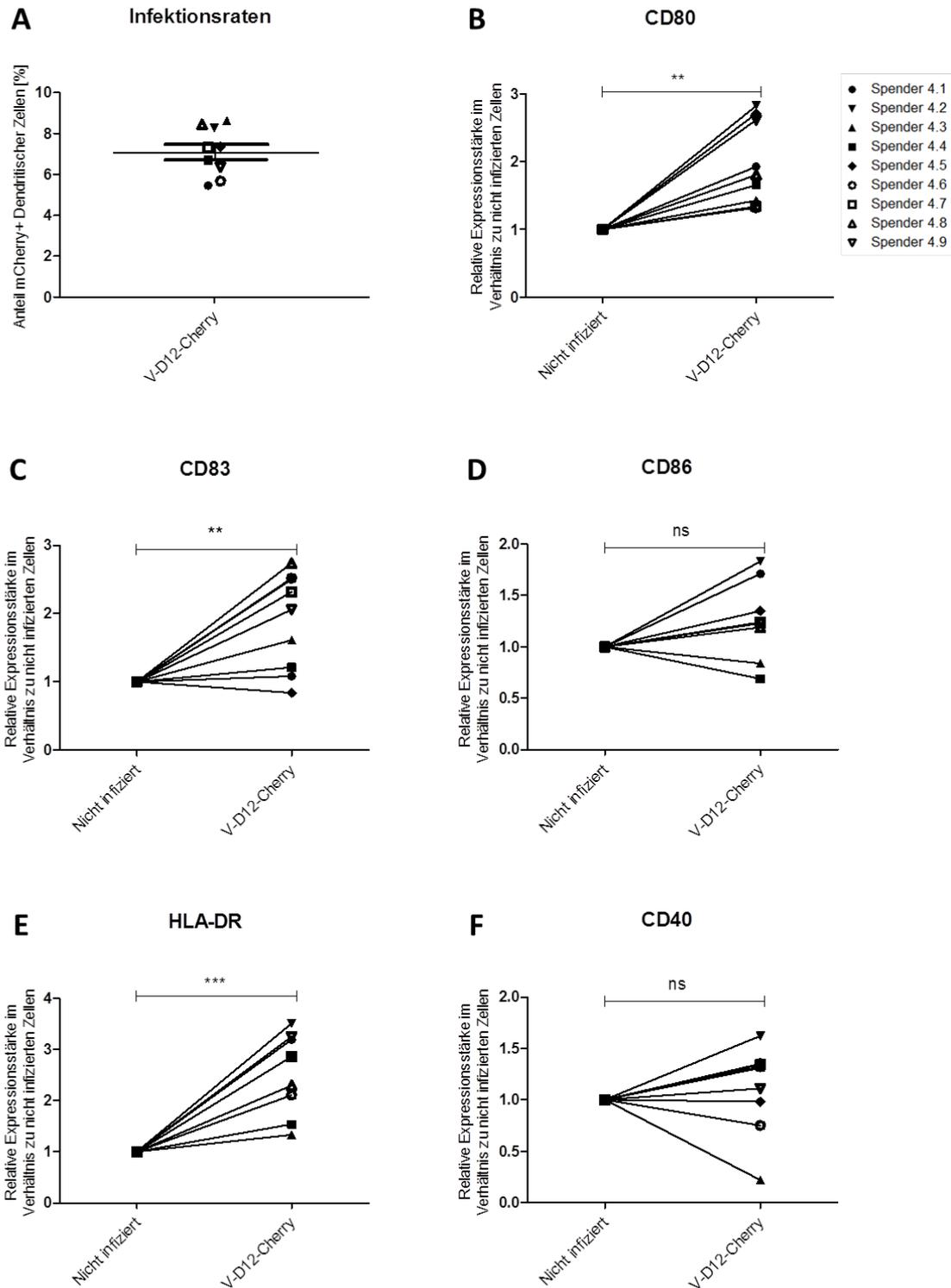
In Abbildung 3.8 ist die DC-Aktivierung von 9 individuellen Spendern zusammengefasst, die in unabhängigen Experimenten ermittelt wurde. Die mittlere Infektionsrate nach Infektion mit V-D12-Cherry für 24 h betrug ca. 7 % (Abbildung 3.8 A). Die relative Expressionsstärke von CD80 erhöhte sich nach Infektion signifikant auf ca. 1,5 - 2,5 (Abbildung 3.8 B). CD83 wurde nach Infektion bei den DCs von 8 Spendern 1,5-2,5-mal stärker exprimiert, bei den DCs von Spender 4.5 wurde CD83 nach Infektion mit V-D12-Cherry weniger stark exprimiert als in der nicht infizierten Kontrolle (Abbildung 3.8 C). HLA-DR wurde nach Infektion signifikant stärker exprimiert und erhöhte sich um das 1,5 - 3-fache (Abbildung 3.8 E). Die Expression von CD86 und CD40 war eher heterogen. Die Infektion resultierte bei den DCs der meisten Spender in einer leicht erhöhten Expression von CD86 um das 1,5-2-fache, bei den DCs der Spender 4.3 und 4.4 wurde dagegen eine reduzierte Expression von CD86 im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle beobachtet (Abbildung 3.8 D). Auch die Expression von CD40 war in den DCs der meisten Spender um das 1,5-fache hochreguliert. Bei den Spendern 4.3, 4.5 und 4.6 führte die Infektion zu einer geringeren Expression von CD40 (Abbildung 3.8 F).

# Ergebnisse



**Abbildung 3.7: Analyse der Viabilität, Infektionsrate und Aktivierung von DCs nach Infektion mit V-D12-Cherry.** Aus den PBMCs eines gesunden Spenders wurden Monozyten mittels CD14+ MACS isoliert und zu DCs differenziert. Nach Infektion mit V-D12-Cherry (MOI 0.2, MOI 1.0 und MOI 5.0) oder Stimulierung mit inaktiviertem V-D12-Cherry (Virusmenge entspricht MOI 5.0) oder LPS für 24 h erfolgte die Bestimmung des Anteils lebender Zellen und des Anteils infizierter mCherry+ Zellen über Durchflusszytometrie. Die Analyse der Expressionsstärke erfolgte für nicht infizierte Zellen und Zellen die mit inaktiviertem V-D12-Cherry oder LPS stimuliert wurden in der CD11c+mCherry- Population. Bei den infizierten Zellen wurde die Expressionsstärke in der CD11c+mCherry+ Population betrachtet. Die Expressionsstärke ist als mittlere Fluoreszenzintensität dargestellt und wurde über den geometrischen Mittelwert bestimmt. Gefüllte Histogramme: Fluoreszenzintensität nach Färbung mit spezifischen Antikörpern. Gepunktete Linie: Fluoreszenzintensität nach Färbung mit Isotypen-Kontrollen. Das dargestellte Experiment ist repräsentativ für 9 unabhängige Experimente.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.8: Aktivierung von DCs nach Infektion mit V-D12-Cherry.** Nach Isolierung von Monozyten über CD14+ MACS aus den PBMCs gesunder Spender erfolgte die Differenzierung in DCs und Infektion mit V-D12-Cherry. A) Anteil infizierter mCherry+ DCs nach 24 h Infektion. B)-F) Relative Expressionsstärke der Aktivierungsmarker CD80 (B), CD83 (C), CD86 (D), HLA-DR (E) und CD40 (F) nach Infektion mit V-D12-Cherry im Verhältnis zur Expressionsstärke auf nicht infizierten DCs. Dargestellt ist die Änderung der Expressionsstärke für jedes der 9 unabhängig durchgeführten Experimente. Die statistische Analyse erfolgte durch einen gepaarten t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %: ns =  $p > 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$ .

## Ergebnisse

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Monozyten, Makrophagen und DCs durch eine Infektion mit V-D12-Cherry aktiviert werden, was sich in einer erhöhten Expression verschiedener ko-stimulatorischer Moleküle widerspiegelte. Bei infizierten Monozyten wurde die Aktivierung vor allem über die signifikant erhöhte Expression von CD86 sichtbar. ORFV-infizierte Makrophagen zeigten eine signifikant verstärkte Expression von CD80, CD86 und HLA-DR. Bei den infizierten DCs wurde die Aktivierung der Zellen über die signifikante Hochregulierung von CD80, CD83 und HLA-DR deutlich.

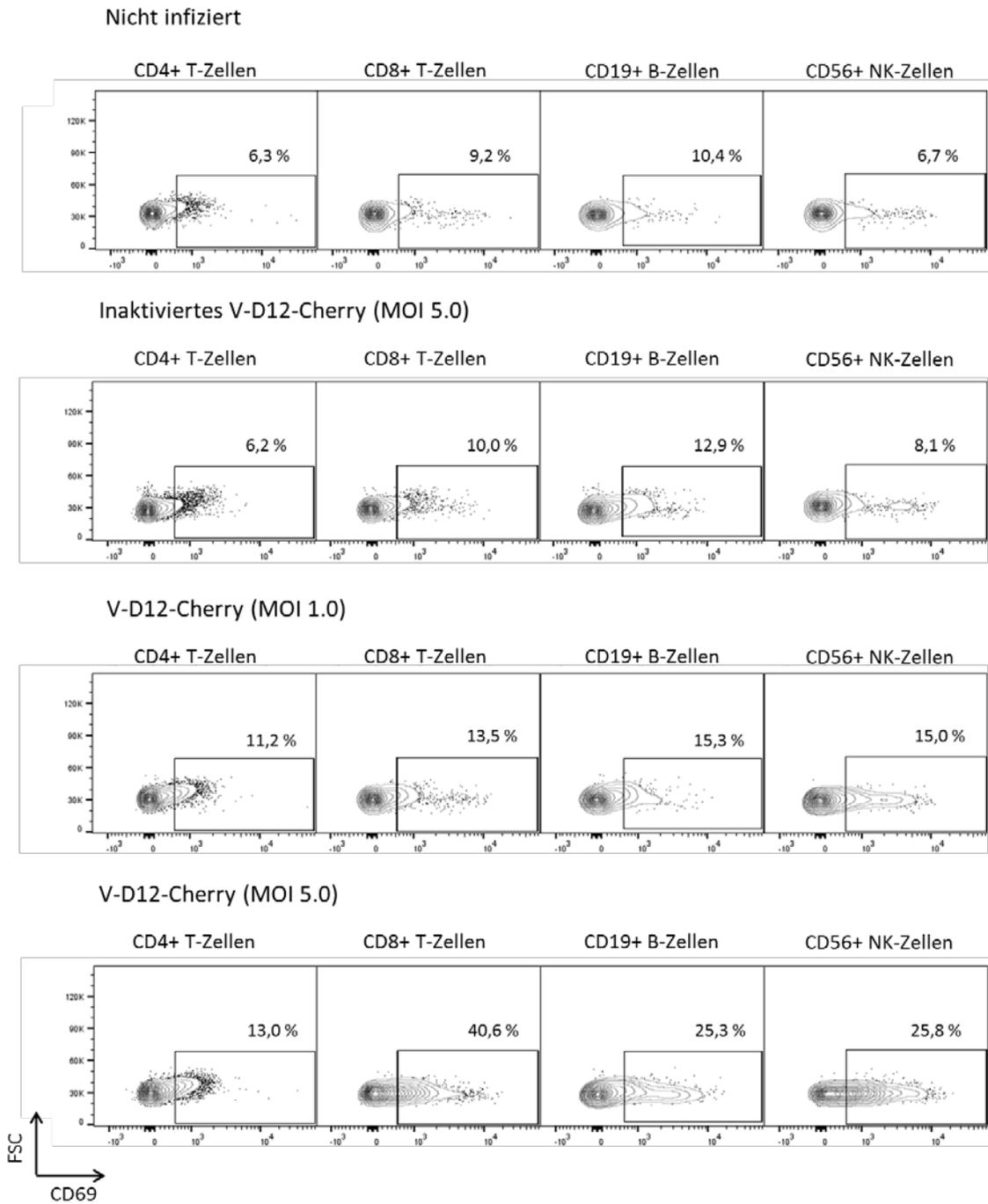
Im nächsten Schritt sollte der Einfluss der Aktivierung der APCs durch ORFV auf die Aktivierung von PBMCs untersucht werden. Hierfür wurden PBMCs aus dem Blut gesunder Spender isoliert und mit V-D12-Cherry infiziert (MOI 1.0 und MOI 5.0). Als Kontrolle dienten nicht infizierte PBMCs und PBMCs die mit inaktiviertem V-D12-Cherry stimuliert wurden (Virusmenge entspricht MOI 5.0). 24 h nach Infektion wurden die Zellen geerntet und die PBMC-Subpopulationen mithilfe von spezifischen Antikörpern für die jeweiligen Oberflächenmarker sowie für den frühen Aktivierungsmarker CD69 gefärbt.

Die nicht infizierten PBMCs eines exemplarisch dargestellten Spenders zeigten je nach Zelltyp einen Anteil von ca. 6 – 10 % CD69+ Zellen (Abbildung 3.9). Der Anteil CD69+ Zellen wurde durch die Stimulierung mit inaktiviertem V-D12-Cherry nicht erhöht. Nach Infektion mit V-D12-Cherry mit MOI 1.0 bzw. 5.0 waren 3,18 % bzw. 7,97 % der Monozyten infiziert (Abbildung 3.1 A). Außerdem wurde ein erhöhter Anteil CD69+ Zellen und somit die Aktivierung der T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen beobachtet. Nach Infektion mit MOI 1.0 bzw. 5.0 exprimierten 11,2 % bzw. 13 % der CD4+ T-Zellen und 13,5 % bzw. 40,6 % der CD8+ T-Zellen den Aktivierungsmarker CD69. Im Vergleich zu nicht infizierten Zellen waren somit 2-mal bzw. 4-mal mehr Zellen aktiviert. Bei B-Zellen exprimierten nach Infektion 15,3 % bzw. 25,3 %, bei NK-Zellen 15,0 % bzw. 25,8 % der Zellen CD69. Auch hier exprimierten im Vergleich zu nicht infizierten Zellen 2,5-mal bzw. 4-mal mehr Zellen den Aktivierungsmarker CD69.

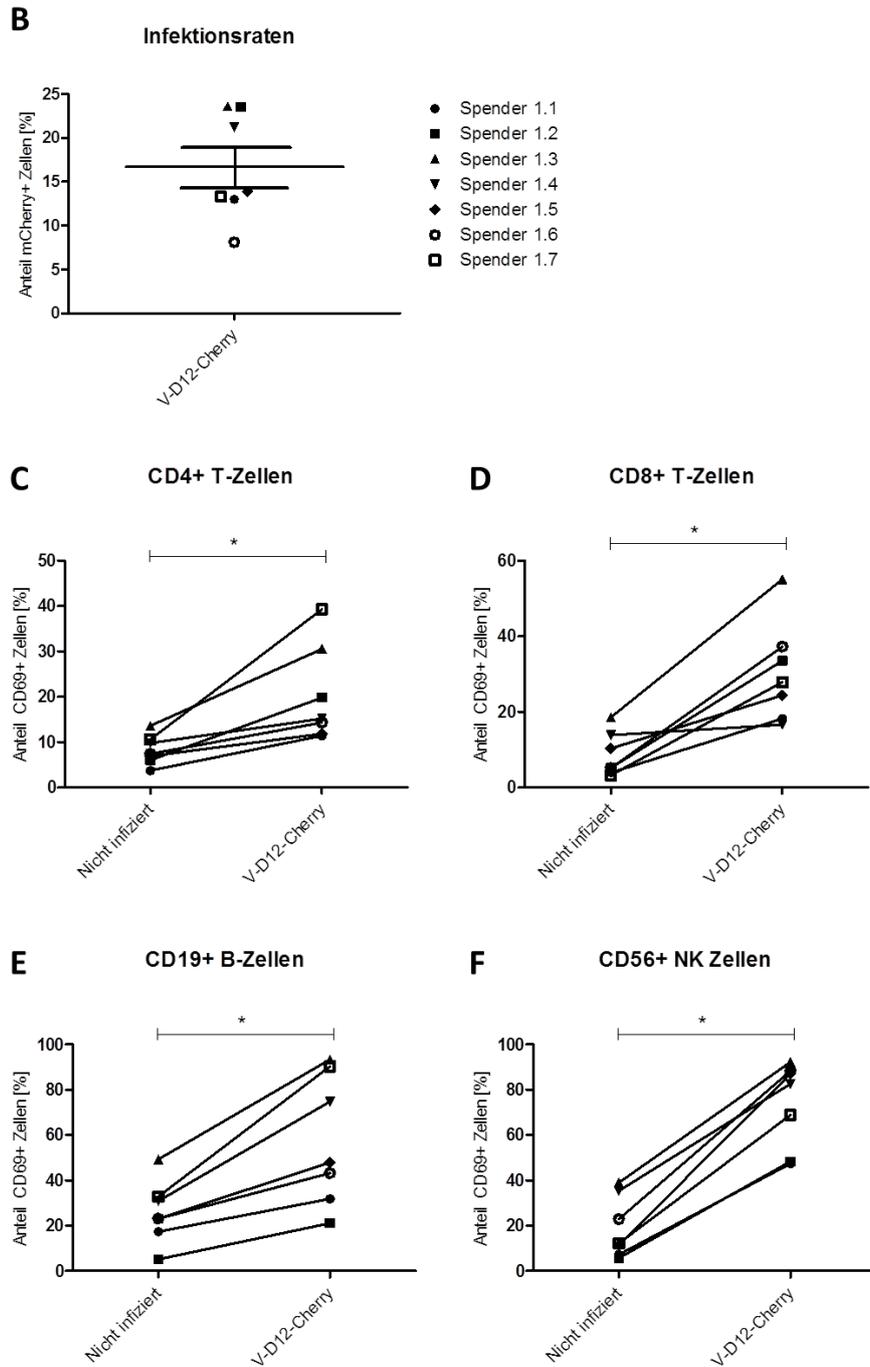
Eine Zusammenfassung der Aktivierung von PBMCs 7 weiterer Spender ist in Abbildung 3.9 dargestellt. Da die Infektion von PBMCs mit derselben Virusmenge bei unterschiedlichen Spendern zu unterschiedlichen Infektionsraten der Monozyten führt, wurden die PBMCs im Folgenden mit verschiedenen MOIs infiziert. Damit die Analyse der Expression von CD69 möglichst vergleichbar ist, wurden die Werte analysiert, die bei einem vergleichbaren Anteil mCherry+ Monozyten beobachtet wurden. Die mittlere Infektionsrate nach Infektion mit V-D12-Cherry betrug ca. 15 % (Abbildung 3.9 B). Die Grundexpression von CD69 auf nicht infizierten CD4+ und CD8+ T-Zellen lag im Mittel bei einem Anteil von ca. 10 % und wurde nach Infektion auf einen Anteil von 15-40 % (Abbildung 3.9 C) bzw. 20-60% (Abbildung 3.9 D) der CD4+ bzw. CD8+ T-Zellen erhöht. Dagegen war die Grundexpression von CD69 auf nicht infizierten B-Zellen und NK-Zellen sehr heterogen und reichte von einem Anteil von 2-50 % der B-Zellen (Abbildung 3.9 E) und 2-40 % der NK-Zellen (Abbildung 3.9 F). Der Anteil an CD69-positiven B-Zellen bzw. NK-Zellen nahm in allen durchgeführten Experimenten nach Infektion mit V-D12-Cherry auf einen Anteil von 20 - 90 % bzw. 40 - 90 % zu. Im Vergleich zu nicht infizierten Zellen wurde CD69 nach ORFV-Infektion auf signifikant mehr T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen exprimiert. Die Infektion von PBMCs mit V-D12-Cherry führt folglich zu deren Aktivierung.

# Ergebnisse

**A**



# Ergebnisse



**Abbildung 3.9: Aktivierung von humanen PBMCs durch Infektion mit V-D12-Cherry.** A) Humane PBMCs wurden aus dem Blut gesunder Spender isoliert. Nach Infektion mit V-D12-Cherry (MOI 1.0 und 5.0) bzw. Stimulierung mit inaktiviertem V-D12-Cherry (Virusmenge entspricht MOI 5.0) wurde die Aktivierung der CD4+ und CD8+ T-Zellen, CD19+ B-Zellen und CD56+ NK-Zellen über den prozentualen Anteil CD69 exprimierender Zellen bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von 7 unabhängigen Experimenten. B)–F) PBMCs wurden aus dem Blut 7 gesunder Spender isoliert und für 24 h mit V-D12-Cherry infiziert. B) Anteil mCherry+ Monozyten nach Infektion. C)–F) Anteil CD69+ Zellen nach Infektion im Vergleich zum Anteil CD69+ Zellen in der nicht infizierten Kontrolle. Analysiert wurde die Aktivierung von CD4+ T-Zellen (C), CD8+ T-Zellen (D), CD19+ B-Zellen (E) und CD56+ NK-Zellen (F). Dargestellt ist die Änderung in der CD69-Expression in jedem durchgeführten Experiment. Die statistische Analyse erfolgte durch den nicht-parametrischen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %: ns =  $p > 0.05$ , \* =  $p \leq 0.05$ .

## Ergebnisse

In vorherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass innerhalb der PBMCs nur Monozyten für ORFV empfänglich sind. Nachfolgend sollte untersucht werden, wie es zur Aktivierung der weiteren Subpopulationen kommt. Die Aktivierung der T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen nach Infektion mit V-D12-Cherry könnte eine indirekte Folge der Aktivierung der Monozyten sein. Im nächsten Schritt wurde daher überprüft, ob die Infektion und Aktivierung der Monozyten erforderlich für die Aktivierung der weiteren PBMC-Subpopulationen ist oder ob ORFV auch unabhängig von APCs eine Aktivierung der weiteren Lymphozyten induzieren kann.

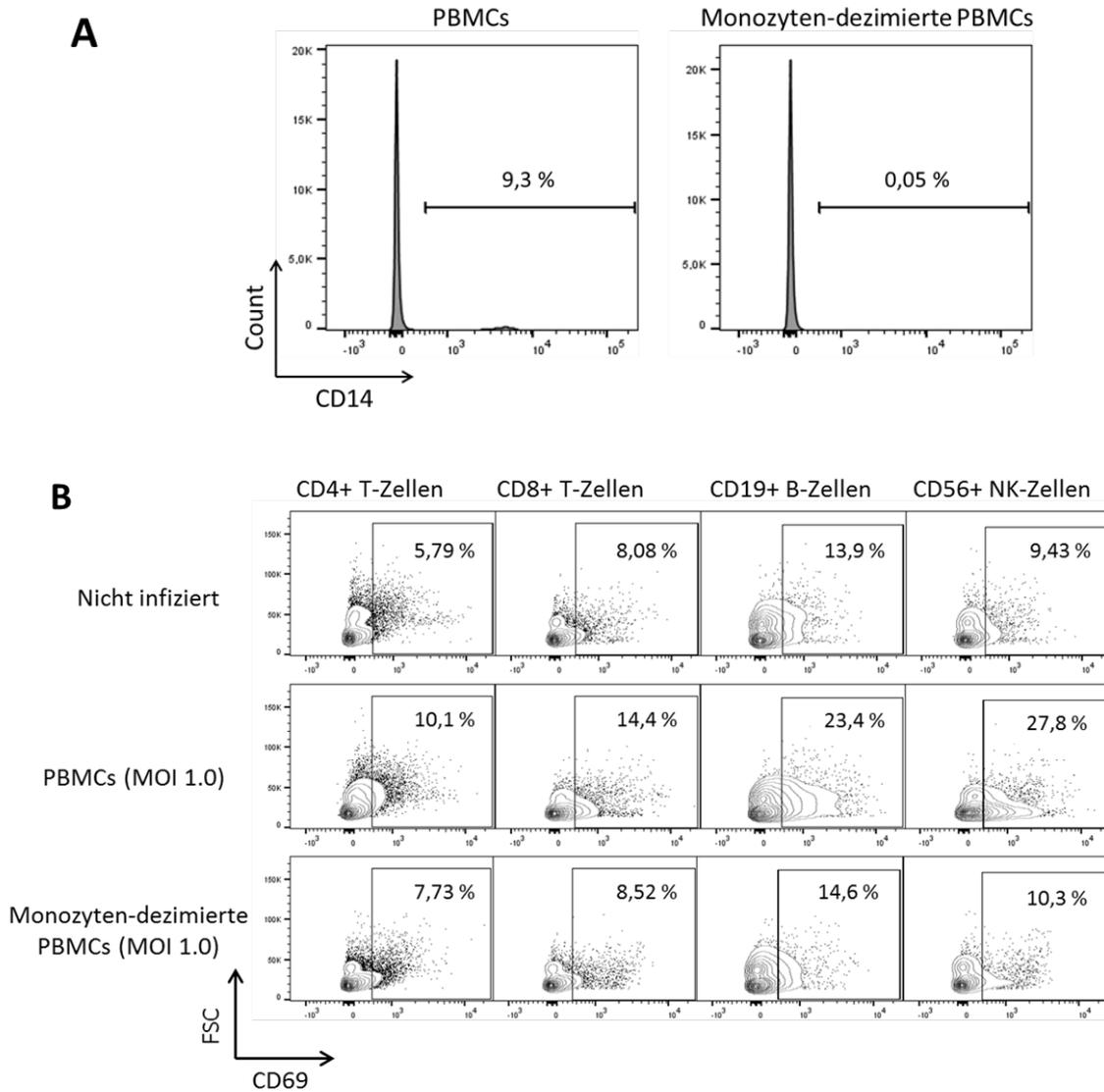
Hierfür wurden PBMCs isoliert und für 24 h mit V-D12-Cherry (MOI 1.0) infiziert. Parallel wurden aus den PBMCs desselben Spenders Monozyten mittels CD14 MACS-Selektion depletiert. Die Monozyten-depletierten PBMCs wurden ebenfalls für 24 h mit V-D12-Cherry (MOI 1.0) infiziert. Für den Nachweis einer erfolgreichen Depletion wurden sowohl PBMCs als auch Monozyten-depletierte PBMCs mit Antikörpern spezifisch für CD14 gefärbt. Mittels Durchflusszytometrie wurde anschließend der Anteil CD14+ Monozyten bestimmt. Während 9,3 % der PBMCs CD14+ waren, konnte nach Depletion der Anteil an CD14+ Zellen auf < 0,05 % verringert werden (Abbildung 3.10 A). Folglich war die Depletion der Monozyten erfolgreich. Nach Infektion der PBMCs und der Monozyten-depletierten PBMCs wurden die Zellen geerntet und mit Antikörpern spezifisch für die Oberflächenmarker und den frühen Aktivierungsmarker CD69 gefärbt.

Abbildung 3.10 B zeigt die Aktivierung von PBMCs bzw. Monozyten-depletierten PBMCs nach ORFV-Infektion beispielhaft für einen Spender. Wie bereits beobachtet (Abbildung 3.9), resultiert die Infektion von PBMCs im Vergleich zu nicht infizierten PBMCs in einem erhöhten Anteil CD69 exprimierender Zellen. Bei nicht infizierten PBMCs lag der Anteil CD69+ CD4+ bzw. CD8+ T-Zellen bei 5,8 % bzw. 8,1 %. Nach Infektion der PBMCs mit V-D12-Cherry erhöhte sich der Anteil auf 10,1 % bzw. 14,4 %. Der Anteil CD69+ CD4+ bzw. CD8+ T-Zellen nach Infektion von Monozyten-depletierten PBMCs war mit 7,7 % bzw. 8,5 % im Vergleich zu nicht infizierten PBMCs nur geringfügig erhöht. Die Anteile CD69+ B-Zellen bzw. NK-Zellen erhöhten sich nach Infektion der PBMCs von 13,9 % auf 23,4 % bzw. von 9,4 % auf 27,8 %. Nach Infektion der Monozyten-depletierten PBMCs konnte diese Aktivierung nicht beobachtet werden. Hier waren 14,6 % bzw. 10,3 % der B-Zellen bzw. NK-Zellen aktiviert was dem Anteil aktivierter Zellen in nicht infizierten PBMCs entspricht.

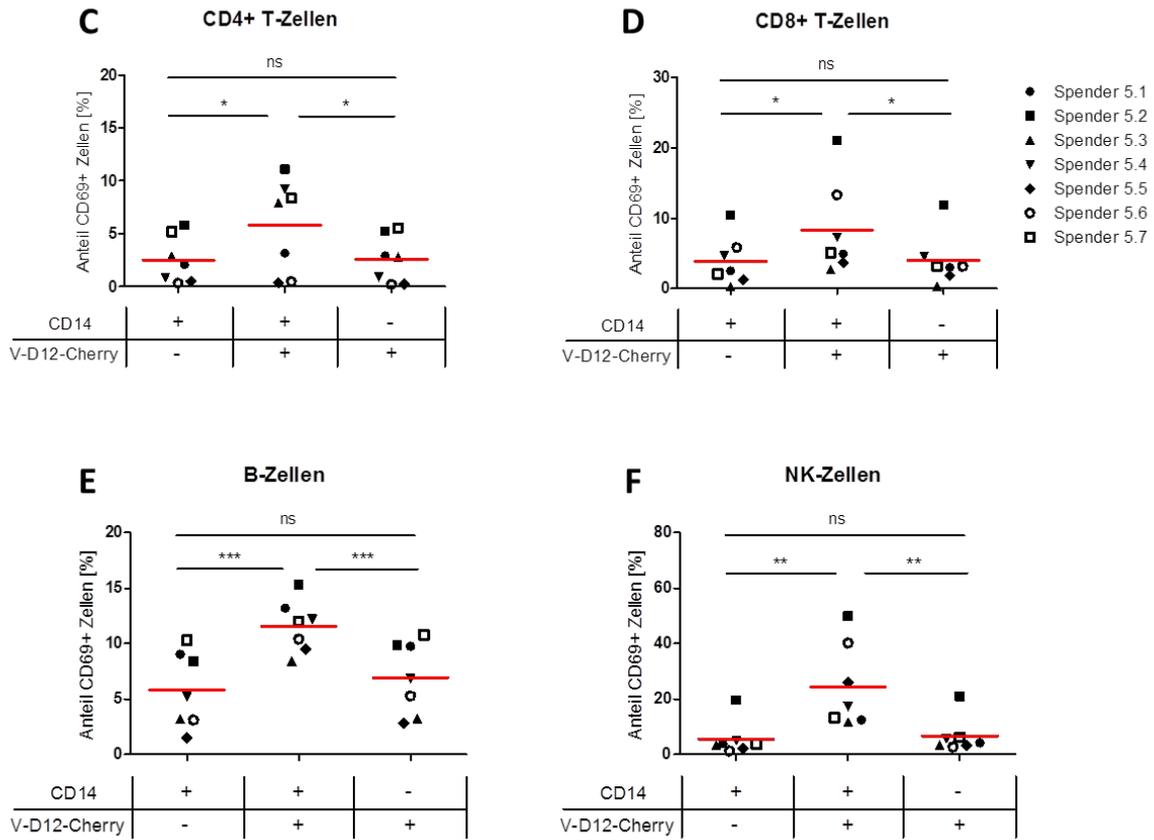
Die Zusammenfassung von 7 unabhängigen Experimenten mit PBMCs von unterschiedlichen Spendern verdeutlicht den signifikant höheren Anteil CD69+ PBMCs nach Infektion mit V-D12-Cherry im Vergleich zu nicht infizierten PBMCs sowie infizierten Monozyten-depletierten PBMCs. Die Grundexpression von CD69 lag bei nicht infizierten CD4+ bzw. CD8+ T-Zellen im Mittel bei einem Anteil von 2,5 % bzw. 5 %. Durch die Infektion von PBMCs erhöhte sich der Anteil an CD69+ Zellen auf ca. 5 % bzw. 10 %. Nach Infektion von Monozyten-depletierten PBMCs blieb der Anteil CD69+ CD4+ und CD8+ T-Zellen hingegen unverändert bei 2,5 % bzw. 5 % und war nicht signifikant erhöht im Vergleich zur Expression in nicht infizierten PBMCs (Abbildung 3.10 C und D). Ca. 5 % der B-Zellen und NK-Zellen exprimierten CD69 in nicht infizierten PBMCs. Nach Infektion der PBMCs mit V-D12-Cherry erhöhte sich der Anteil CD69+ B-Zellen bzw. NK-Zellen signifikant auf 10 % bzw. 20 %. Die Infektion der Monozyten-depletierten PBMCs resultierte mit ca. 5 % CD69+ B-Zellen und NK-Zellen in einem vergleichbaren Anteil CD69+ Zellen wie in nicht infizierten PBMCs (Abbildung 3.10 E und F). Diese Ergebnisse zeigten, dass die Aktivierung von T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen keine

# Ergebnisse

direkte Reaktion auf die Infektion mit ORFV ist, sondern dass die Aktivierung abhängig von der Infektion und Aktivierung der Monozyten ist.



# Ergebnisse



**Abbildung 3.10: Analyse der Aktivierung von Monozyten-depletierten PBMCs.** A) Der Anteil CD14+ Monozyten wurde in PBMCs und Monozyten-depletierten PBMCs durchflusszytometrisch bestimmt. B)–F) Analyse des Anteils CD69+ CD4+ und CD8+ T-Zellen, CD19+ B-Zellen und CD56+ NK-Zellen in nicht infizierten PBMCs, V-D12-Cherry (MOI 1.0) infizierten PBMCs und V-D12-Cherry (MOI 1.0) infizierten Monozyten-depletierten PBMCs. B) Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von 7 unabhängigen Experimenten. C)–F) Zusammenfassung von 7 unabhängig durchgeführten Experimenten. Dargestellt ist die CD69-Expression der Zellen jedes Spenders und die berechneten Mittelwerte (rote Balken). Die statistische Analyse erfolgte durch den nicht-parametrischen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %: ns =  $p > 0.05$ , \* =  $p \leq 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$ .

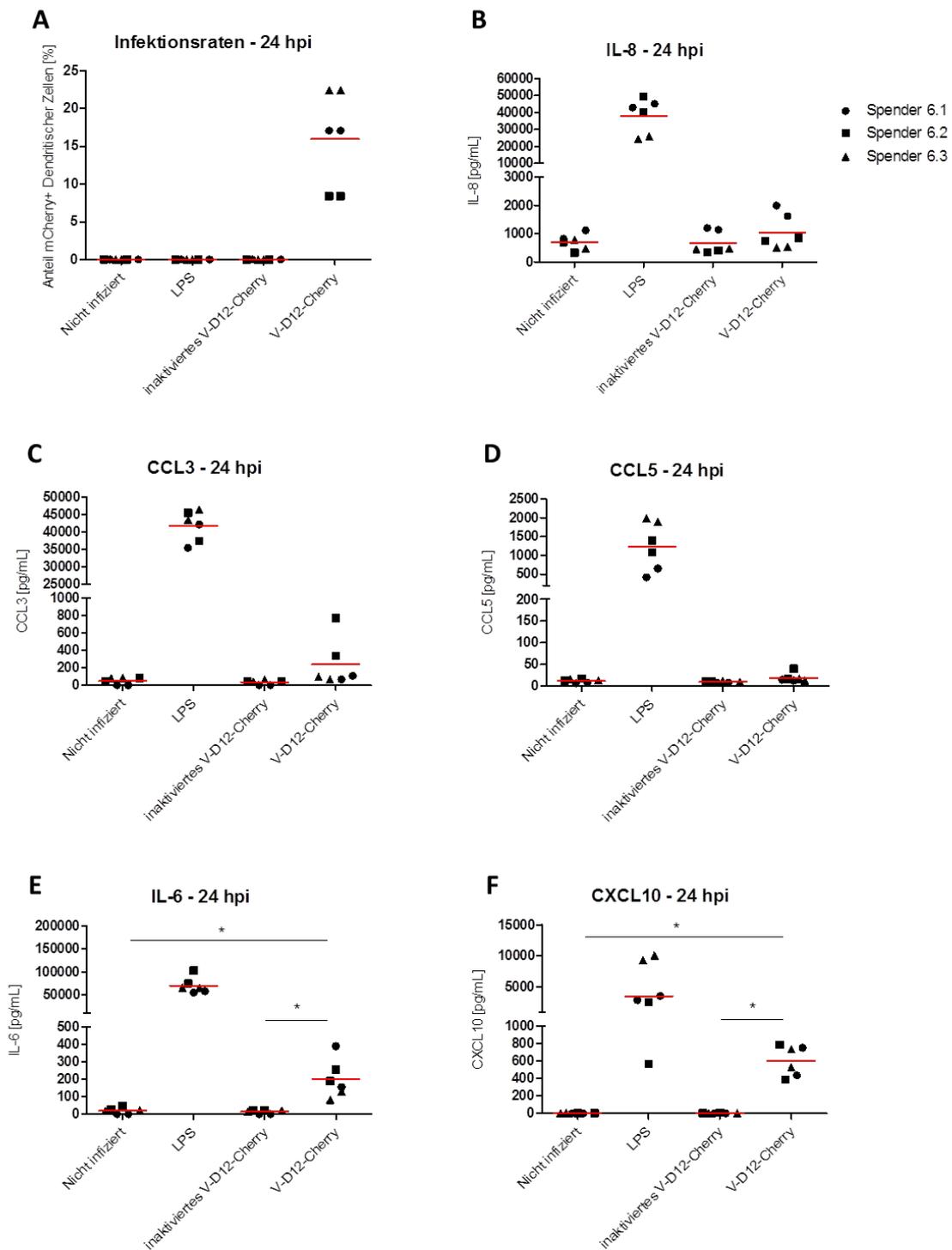
### 3.1.4 Analyse der Zytokinproduktion von ORFV-infizierten DCs und PBMCs

Da die Aktivierung der T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen von infizierten und aktivierten Monozyten abhängig ist, wurde im Folgenden untersucht, ob infizierte APCs und PBMCs nach Infektion Zytokine produzieren, die diese Aktivierung erklären könnten.

Hierfür wurden DCs und PBMCs mit V-D12-Cherry infiziert bzw. mit inaktiviertem V-D12-Cherry stimuliert. Nach 4 h, 8 h, 16 h, 24 h, 48 h und 72 h wurde Zellkultur-Überstand der DCs entnommen. Bei den PBMCs erfolgte die Analyse der Zytokinproduktion nach 24 h. Da für dieses Experiment die Zellen von jeweils 3 verschiedenen Spendern verwendet wurden und die Infektionsraten vergleichbar sein sollten, erfolgte die Infektion mit verschiedenen MOIs. Die Infektionsrate nach 24 h, 48 h und 72 h wurde über die mCherry-Expression durchflusszytometrisch bestimmt. Für die Analyse der Zytokin-Produktion wurden jeweils die Überstände verwendet, bei denen nach 24 h ca. 20 % der Zellen infiziert waren. Als positive Kontrolle wurden die DCs mit LPS stimuliert. Zur Bestimmung der Grund-Produktion der Zellen wurden die Überstände der nicht infizierten Zellen verwendet. Mittels *Cytometric Bead Array* (CBA) wurde die Menge von verschiedenen Zytokinen im Zellkultur-Überstand quantifiziert. Neben den pro-inflammatorischen Zytokinen TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IFN $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 und IL-12 wurde auch die Menge der anti-inflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10 bestimmt. Zudem wurde untersucht, ob die Chemokine CCL2, CCL3, CCL5, IL-8, CXCL9 oder CXCL10 produziert werden. Die Infektion der Zellen sowie die Durchführung des CBA erfolgten jeweils in Duplikaten (biologische bzw. technische Replikate).

Abbildung 3.11 und Abbildung 3.12 zeigen die gemessenen Zytokine in den DC-Überständen nach 24 h Infektion. Von drei Spendern sind jeweils 2 biologische Replikate dargestellt, welche sich aus 2 technischen Replikaten zusammensetzen (Abbildung 3.11). Die mittlere Infektionsrate betrug ca. 15 % (Abbildung 3.11 A). Nach 24 h wurde mit 1200 pg/ml, 300 pg/ml bzw. 25 pg/ml leicht erhöhte Konzentrationen an IL-8, CCL3 und CCL5 gemessen. Ein signifikanter Unterschied zur Produktion von nicht infizierten und mit inaktivierten V-D12-Cherry stimulierten DCs wurde nicht festgestellt (Abbildung 3.11 B-D). Die Konzentrationen an IL-6 bzw. CXCL10 waren nach Infektion mit V-D12-Cherry mit ca. 200 pg/ml bzw. 600 pg/ml signifikant höher als bei nicht infizierten DCs bzw. mit inaktiviertem V-D12-Cherry stimulierten DCs (Abbildung 3.11 E und F). Die Stimulation mit LPS resultierte in den höchsten Zytokin-Konzentrationen. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen hatte die Stimulation mit inaktiviertem V-D12-Cherry keinen Einfluss auf die Produktion der analysierten Zytokine. Nicht infizierte und mit inaktiviertem V-D12-Cherry stimulierte DCs produzieren einzig IL-8, nicht jedoch die anderen gemessenen Zytokine. Ein Zusammenhang zwischen dem Anteil infizierter DCs und der Menge an produzierten Zytokinen wurde nicht festgestellt.

## Ergebnisse

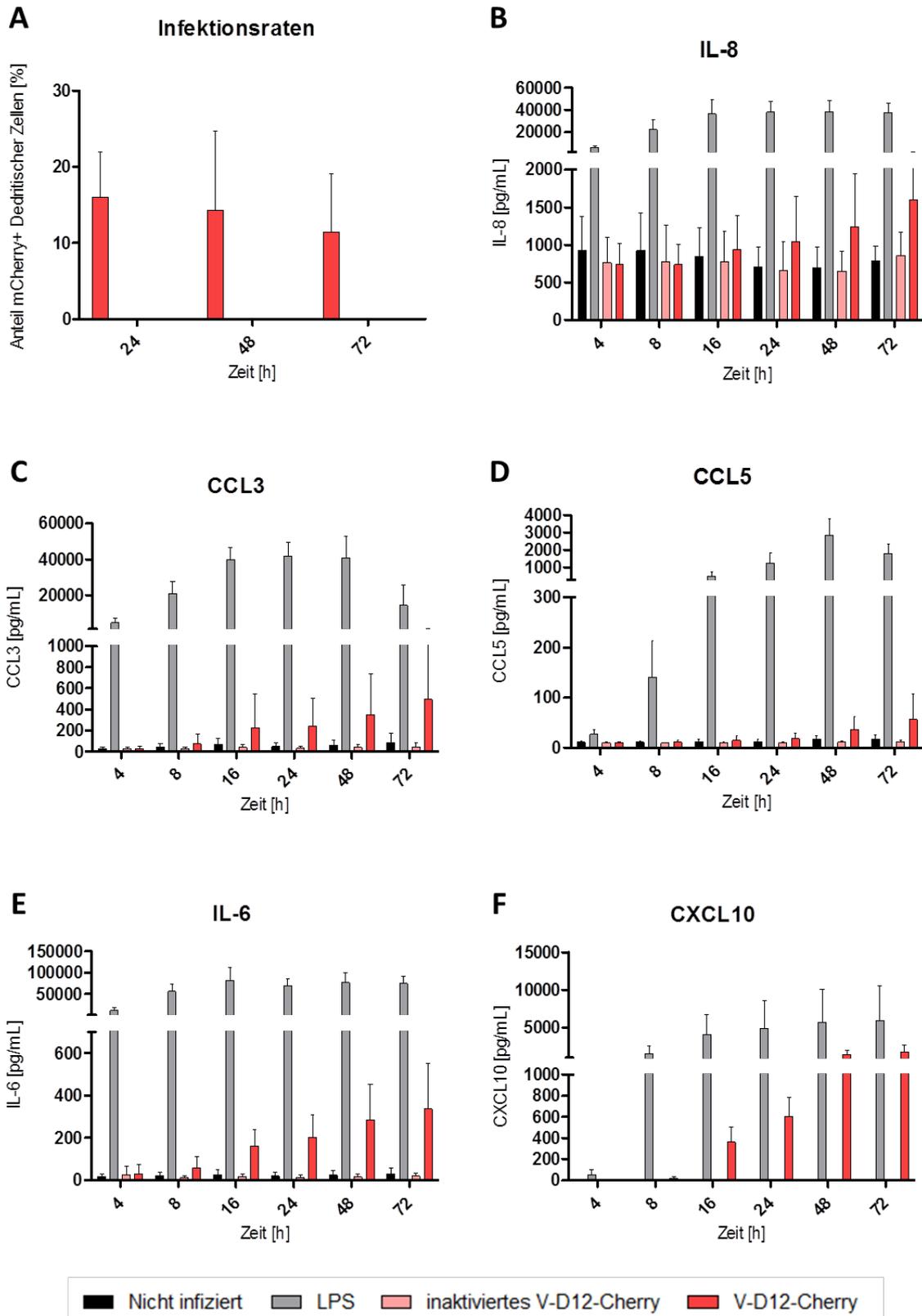


**Abbildung 3.11: Analyse der Zytokin-Produktion von DCs nach 24 h Infektion mit V-D12-Cherry.** A) Anteil mCherry+ infizierter DCs. B)-F) Konzentration der gemessenen Zytokine IL-8 (B), CCL3 (C), CCL5 (D), IL-6 (E) und CXCL10 (F) in nicht infizierten, LPS stimulierten und mit inaktiviertem V-D12-Cherry stimulierten und V-D12-Cherry infizierten DCs. Dargestellt sind die biologischen Replikate von 3 unabhängigen Experimenten und die berechneten Mittelwerte (rote Balken). Die statistische Analyse erfolgte durch den nicht-parametrischen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %: \* =  $p \leq 0.05$ .

## Ergebnisse

Die gemessenen Zytokin-Konzentrationen 4 h – 72 h nach Infektion sind in Abbildung 3.12 dargestellt. Die Infektionsrate der DCs nimmt von 24 h bis 72 h leicht ab (Abbildung 3.12 A). Auch im zeitlichen Verlauf zeigt sich eine leicht erhöhte Produktion an IL-8, CCL3 und CCL5 (Abbildung 3.12 B-D) die jedoch zwischen den Replikaten stark schwankt, was zu einer hohen Standardabweichung führt. Daher ist keine verlässliche Aussage bezüglich der Produktion dieser Chemokine möglich. In den ersten 4 h nach Infektion wurden keine erhöhten Konzentrationen der analysierten Zytokine gemessen. 8 h nach Infektion wurden im Vergleich zu nicht infizierten und mit inaktiviertem V-D12-Cherry stimulierten DCs erhöhte Konzentrationen an IL-6, CCL3 und CXCL10 detektiert. Nach 16 h zeigte sich deutlich die Produktion von IL-6 und CXCL10 bei infizierten, nicht aber bei nicht infizierten und mit inaktiviertem V-D12-Cherry stimulierten DCs. Die Produktion von IL-6 und CXCL10 nimmt über die Dauer der Infektion weiter zu. Nach 72 h wurden ca. 400 pg/ml IL-6 und ca. 2000 pg/ml CXCL10 detektiert (Abbildung 3.12 E und F). In nicht infizierten bzw. mit inaktiviertem V-D12-Cherry stimulierten DCs konnten auch im zeitlichen Verlauf keine der analysierten Zytokine detektiert werden.

# Ergebnisse

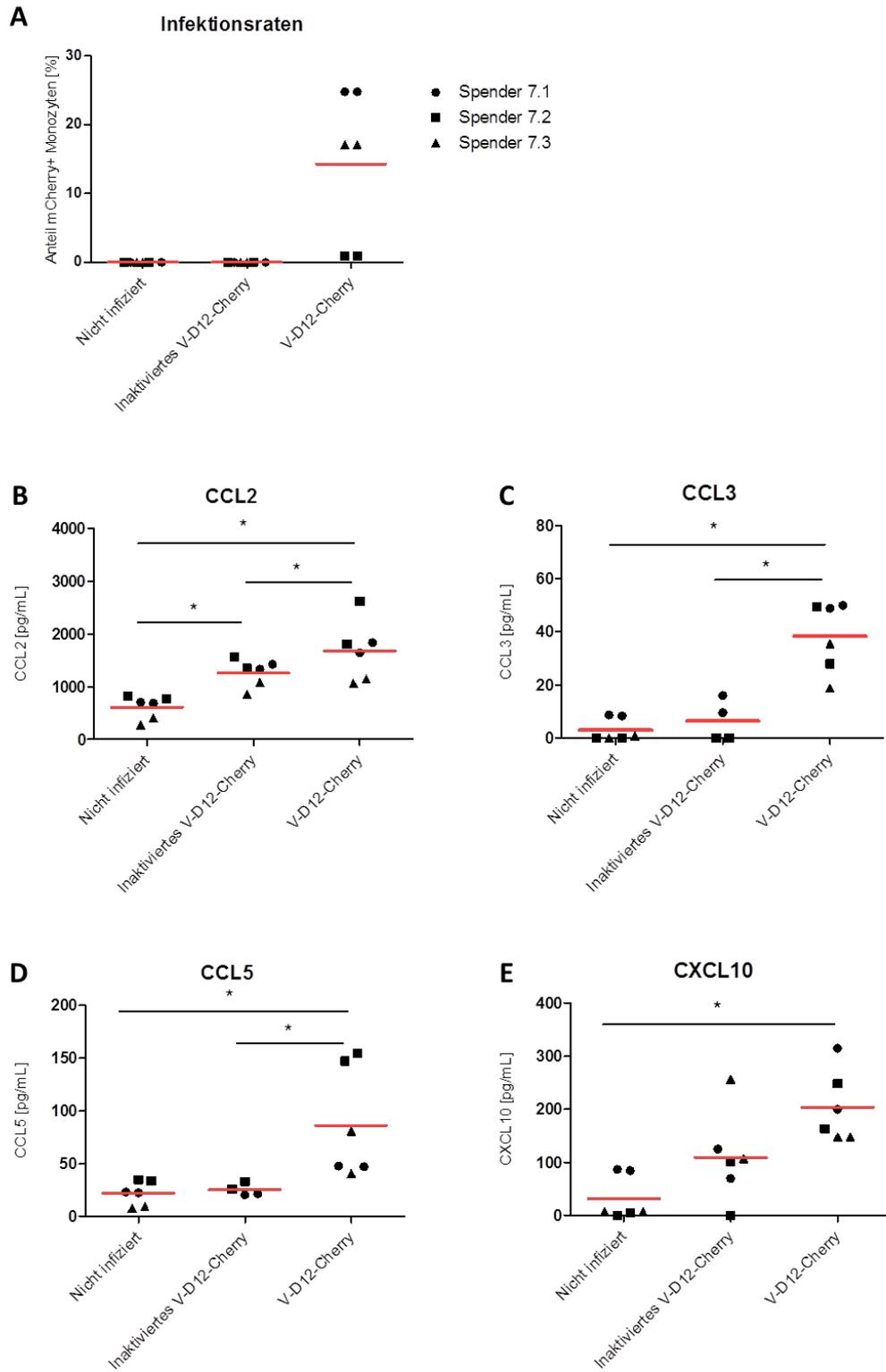


**Abbildung 3.12: Analyse der Zytokin-Produktion von DCs 4 h - 72 h nach Infektion mit V-D12-Cherry.** A) Anteil mCherry+ infizierter DCs nach 24 h, 48 h und 72 h. B)-F) Konzentration der gemessenen Zytokine IL-8 (B), CCL3 (C), CCL5 (D), IL-6 (E) und CXCL10 (F) in nicht infizierten (schwarz), LPS stimulierten (grau) und mit inaktiviertem V-D12-Cherry (hellrot) stimulierten und V-D12-Cherry infizierten (rot) DCs nach 4 h, 8 h, 16 h, 24 h, 48 h und 72 h. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten.

## Ergebnisse

Abbildung 3.13 zeigt die gemessenen Chemokine in den Zellkultur-Überständen infizierter PBMCs nach 24 h Infektion. Von drei Spendern sind jeweils 2 biologische Replikate dargestellt, welche sich aus 2 technischen Replikaten zusammensetzen. Die mittlere Infektionsrate nach 24 h betrug ca. 15 % (Abbildung 3.13 A). Während die Infektionsraten der PBMCs zweier Spender bei 18 % bzw. 25 % lagen, wurde bei den PBMCs von Spender 7.2 nach Infektion mit der höchsten MOI lediglich ein Anteil von 2 % mCherry+ Monozyten detektiert. Um den Einfluss der Infektionsrate auf die Produktion der Zytokine zu untersuchen, wurden die Überstände dieser Zellen ebenfalls analysiert. Nach Infektion mit V-D12-Cherry für 24 h wurde eine erhöhte Produktion von CCL2, CCL3, CCL5 und CXCL10 festgestellt (Abbildung 3.13 B-E). Für alle weiteren analysierten Zytokine bzw. Chemokine wurde keine signifikante Änderung der Konzentration nach Infektion im Vergleich zu nicht infizierten oder mit inaktiviertem V-D12-Cherry stimulierten PBMCs detektiert. Die Konzentration von CCL2 lag bei nicht infizierten PBMCs im Mittel bei ca. 700 pg/ml. Die Stimulierung mit inaktiviertem V-D12-Cherry resultierte im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle in einer signifikant höheren CCL2-Konzentration von ca. 1200 pg/ml. Durch die Infektion mit V-D12-Cherry wurde mit ca. 1800 pg/ml im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle und der Stimulierung mit inaktiviertem V-D12-Cherry eine signifikant höhere CCL2-Konzentration gemessen (Abbildung 3.13 B). Die Konzentration von CCL3 war im Vergleich zu CCL2 in allen getesteten Gruppen deutlich geringer. In den Überständen der nicht infizierten PBMCs war die CCL3-Konzentration kaum messbar. Durch die Stimulierung mit inaktiviertem V-D12-Cherry wurde die CCL3-Konzentration minimal erhöht. Die Infektion mit V-D12-Cherry führte zu einer signifikant höheren Konzentration von CCL3 im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle und mit inaktiviertem V-D12-Cherry stimulierten PBMCs. Nach 24 h Infektion wurden im Mittel 40 pg/ml CCL3 detektiert (Abbildung 3.13 C). Auch die ermittelte Menge an CCL5 und CXCL10 lag in allen getesteten Gruppen unter der gemessenen CCL2-Konzentration. In den Überständen nicht infizierter bzw. mit inaktiviertem V-D12-Cherry stimulierter PBMCs wurde eine CCL5-Konzentration von ca. 25 pg/ml gemessen. Die Infektion mit V-D12-Cherry führte zu einer signifikanten Steigerung der CCL5-Konzentration auf ca. 90 pg/ml (Abbildung 3.13 D). Wie auch schon bei DCs beobachtet, induzierte die Infektion der PBMCs die Produktion von CXCL10. In der nicht infizierten Kontrolle wurde lediglich bei den Zellen von Spender 7.1 eine geringe Konzentration an CXCL10 detektiert. Nach Infektion mit V-D12-Cherry war eine signifikant höhere CXCL10-Konzentration von ca. 200 pg/ml messbar. Die Stimulierung mit inaktiviertem V-D12-Cherry induzierte ebenfalls die Produktion von CXCL10. Die ermittelte Konzentration war jedoch nicht signifikant erhöht im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle (Abbildung 3.13 E).

## Ergebnisse



**Abbildung 3.13: Analyse der Chemokin-Produktion von PBMCs nach 24 h Infektion mit V-D12-Cherry.** A) Anteil mCherry+ Monozyten. B)-E) Konzentration der gemessenen Chemokine CCL2 (B), CCL3 (C), CCL5 (D) und CXCL10 (E) in nicht infizierten, mit inaktiviertem V-D12-Cherry stimulierten und V-D12-Cherry infizierten PBMCs. Dargestellt sind die biologischen Replikate von 3 unabhängigen Experimenten und die berechneten Mittelwerte (rote Balken). Die statistische Analyse erfolgte durch den nicht-parametrischen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %: \* =  $p \leq 0.05$ .

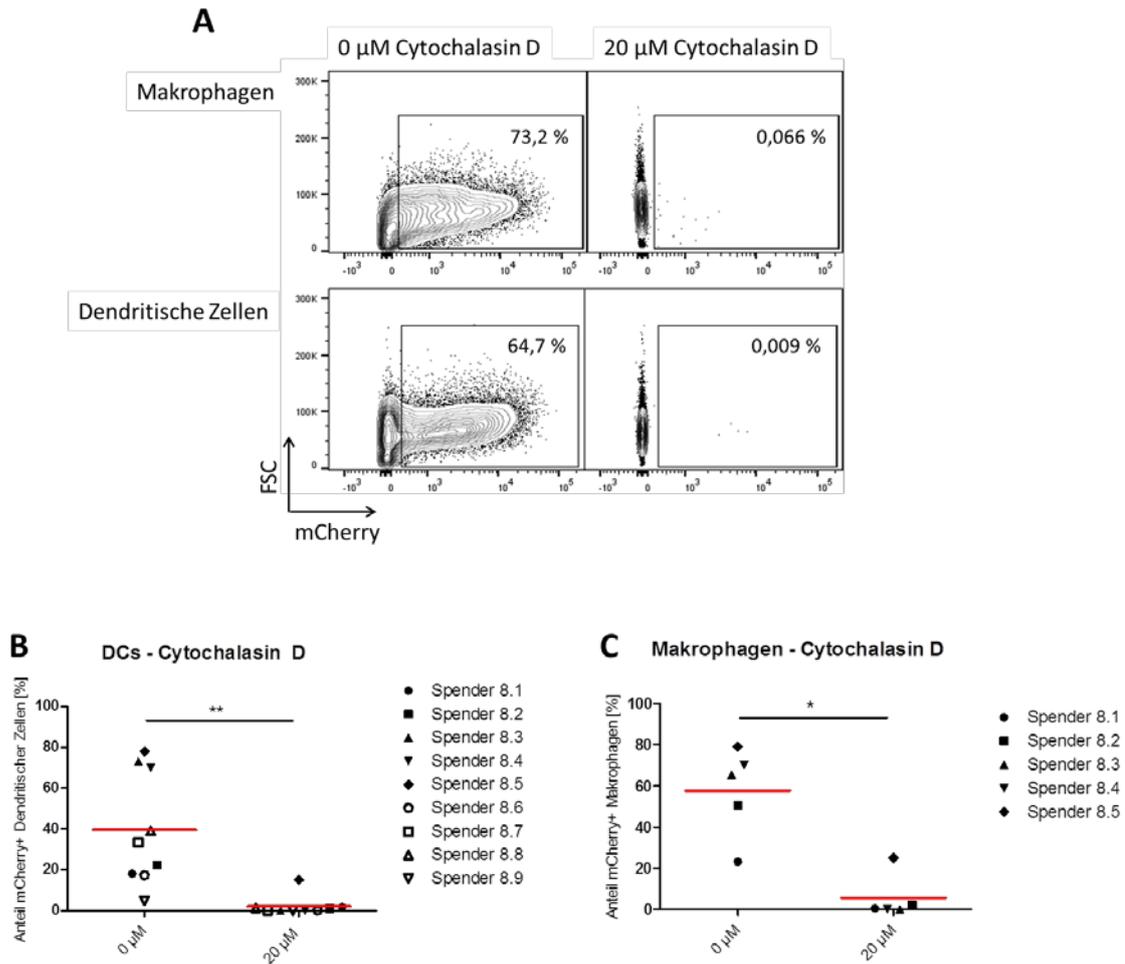
### **3.1.5 Analyse des Aufnahmemechanismus von ORFV durch Antigen-präsentierende Zellen**

Die Analyse des Zelltropismus in humanen Leukozyten ergab, dass APCs empfänglich für ORFV sind. Daher stellte sich die Frage über welchen Mechanismus das ORFV in diese Zellen gelangt. Eine wichtige Aufgabe dieser Zellen besteht in der Aufnahme von Pathogenen über Rezeptor-vermittelte Endozytose wie Phagozytose oder Makropinozytose, eine Rezeptor-unabhängige Aufnahme von extrazellulärem Material. Für diese Aufnahmemechanismen ist eine hohe Zellmotilität unerlässlich, welche durch die Aktin-Polymerisation ermöglicht wird [211]. Cytochalasin D ist ein bekannter Inhibitor der Aktin-Polymerisation. Durch die Bindung an die schnell wachsenden Enden der Aktinfilamente werden der Zusammenbau und die Zerlegung von Aktin-Monomeren blockiert [212, 213].

Im Folgenden sollte analysiert werden, ob durch die Inhibierung der Aktin-Polymerisation eine Aufnahme des ORFV verhindert werden kann. Hierfür wurden Makrophagen und DCs für 30 min mit 20  $\mu$ M Cytochalasin D behandelt. Nach Infektion der Zellen mit V-D12-Cherry (MOI 5.0) wurde mittels Durchflusszytometrie der Anteil infizierter Zellen bestimmt. Die Auswirkung der Stimulierung von Makrophagen und DCs mit Cytochalasin D auf die ORFV-Empfänglichkeit der Zellen ist exemplarisch für einen Spender gezeigt (Abbildung 3.14 A). Während unbehandelte Makrophagen und DCs 24 h nach Infektion mit V-D12-Cherry zu 73,2 % bzw. 64,7 % infiziert waren, verhinderte die Behandlung mit Cytochalasin D die Infektion der Zellen vollständig (Abbildung 3.14 A).

Die Analyse wurde mit DCs und Makrophagen von 9 bzw. 5 weiteren individuellen Spendern in unabhängigen Experimenten wiederholt. Ohne vorangegangene Behandlung mit Cytochalasin D wurde nach Infektion von DCs bzw. Makrophagen eine mittlere Infektionsrate von ca. 40 % (Abbildung 3.14 B) bzw. ca. 60 % ermittelt (Abbildung 3.14 C). Die Behandlung mit 20  $\mu$ M Cytochalasin D führte in den meisten Experimenten zu einer vollständigen Inhibierung der ORFV-Aufnahme durch Makrophagen und DCs. Bei den DCs und Makrophagen des Spenders 8.5 wurde nach Inhibierung der Aktin-Polymerisation eine verringerte Infektionsrate von ca. 20 % detektiert. Durch die Behandlung der APCs mit Cytochalasin D konnte gezeigt werden, dass die Aktin-Polymerisation für den Weg des ORFV in die Zelle essentiell ist.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.14: Analyse der Infektionsrate von APCs nach Behandlung mit Cytochalasin D.** Makrophagen und DCs wurden mit 20  $\mu$ M Cytochalasin D für 30 min behandelt oder unbehandelt belassen. Nach Infektion mit V-D12-Cherry (MOI 5.0) erfolgte die Bestimmung der mCherry+ infizierten Zellen mittels Durchflusszytometrie. A) Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von 5 bzw. 9 unabhängigen Experimenten. B) Anteil infizierter DCs und C) Makrophagen ohne vorangegangene Behandlung und nach Behandlung mit 20  $\mu$ M Cytochalasin D. Dargestellt sind die Anteile mCherry+ Zellen gemessen in 9 bzw. 5 unabhängigen Experimenten und die berechneten Mittelwerte (rote Balken). Die statistische Analyse erfolgte durch den nicht-parametrischen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %: \*\* =  $p \leq 0.01$ .

Da die Aktin-Polymerisation sowohl bei der Phagozytose als auch der Makropinozytose benötigt wird, sollte im nächsten Schritt analysiert werden, durch welchen dieser Mechanismen das Virus in die Zelle gelangt. Rottlerin ist ein spezifischer Inhibitor der *Protein Kinase C Isoform Delta* (PKC $\delta$ ), welche für die Stimulierung der Makropinozytose essentiell ist [214]. Durch die Behandlung der APCs mit Rottlerin wird die Makropinozytose daher spezifisch gehemmt [215, 216].

Makrophagen und DCs wurden für 30 min mit 3  $\mu$ M bzw. 10  $\mu$ M Rottlerin behandelt. Nach Infektion mit V-D12-Cherry (MOI 1.0 und 5.0) wurde der Anteil infizierter Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Wirkung von Rottlerin auf die Infektion von

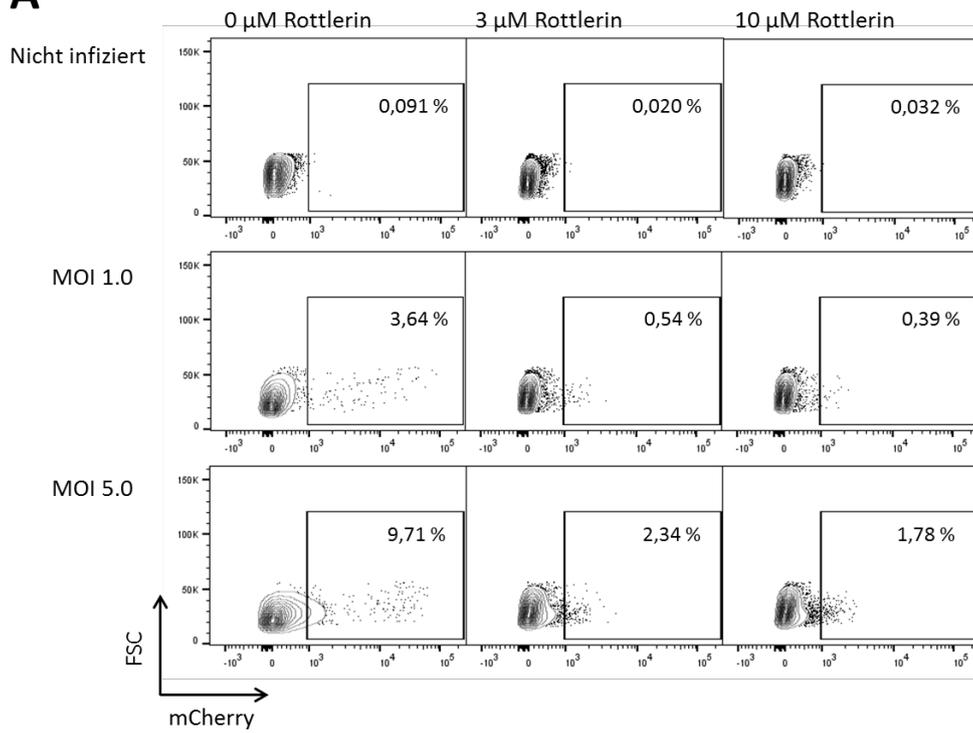
## Ergebnisse

Makrophagen (Abbildung 3.15 A) und DCs (Abbildung 3.15 B) ist beispielhaft für einen Spender abgebildet. Während Makrophagen nach 24 h Infektion mit V-D12-Cherry MOI 1.0 bzw. 5.0 zu 3,64 % bzw. 9,71 % infiziert waren, wurde die Infektion durch Stimulierung mit Rottlerin vermindert, nicht aber komplett inhibiert. So blieb nach einer Infektion mit MOI 5.0 und 10  $\mu$ M Rottlerin noch ein kleiner Anteil von 1,8 % infizierter Zellen (Abbildung 3.15 A). Die Infektion der DCs mit V-D12-Cherry MOI 1.0 bzw. 5.0 führte zu einer Infektionsrate von 1,1 % bzw. 8,7 %. Nach Behandlung der Zellen mit Rottlerin lag die Infektionsrate unter 0,5 % (Abbildung 3.15 B).

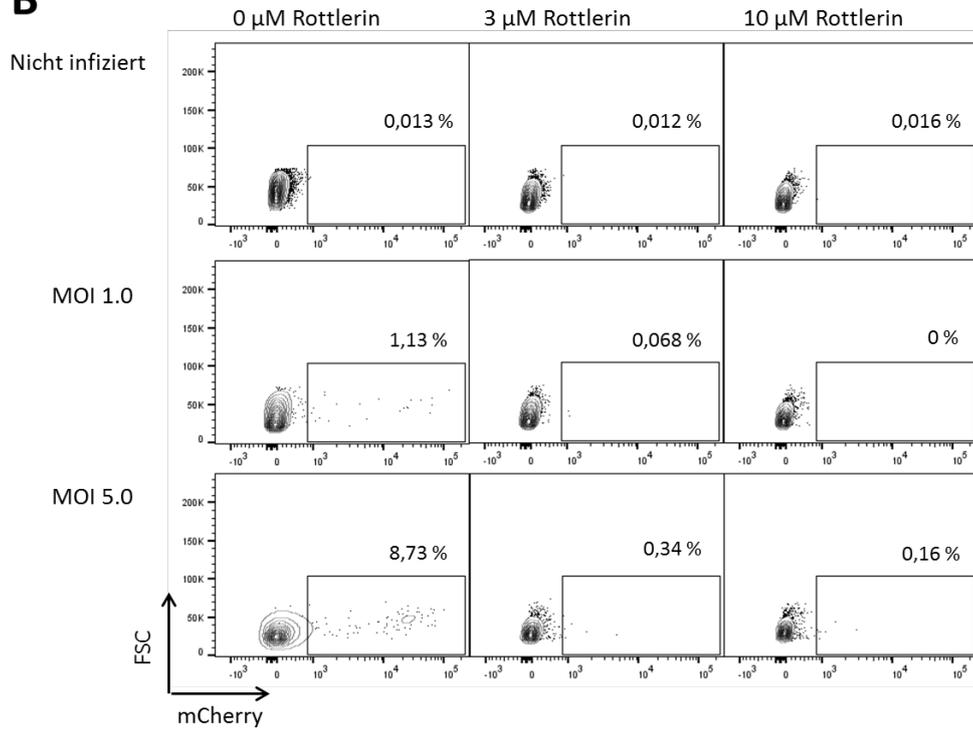
Die Wiederholung des Experiments mit DCs und Makrophagen 9 weiterer Spender zeigte vergleichbare Ergebnisse. Ohne Behandlung mit Rottlerin betrug die mittlere Infektionsrate von DCs bzw. Makrophagen nach Infektion mit V-D12-Cherry 15 % (Abbildung 3.15 C) bzw. 30 % (Abbildung 3.15 D). Der Anteil infizierter DCs reduzierte sich nach Behandlung mit 3  $\mu$ M bzw. 10  $\mu$ M Rottlerin signifikant auf ca. 1-2 %. Ein Unterschied in der Behandlung mit 3  $\mu$ M oder 10  $\mu$ M Rottlerin war nicht zu erkennen (Abbildung 3.15 C). Die Behandlung der Makrophagen mit 3  $\mu$ M bzw. 10  $\mu$ M Rottlerin resultierte in einem reduzierten Anteil infizierter Zellen von ca. 5 % bzw. 1 % (Abbildung 3.15 D). Sowohl in DCs als auch in Makrophagen führte die Inhibierung der Makropinozytose zu einer Reduktion der Infektionsrate.

# Ergebnisse

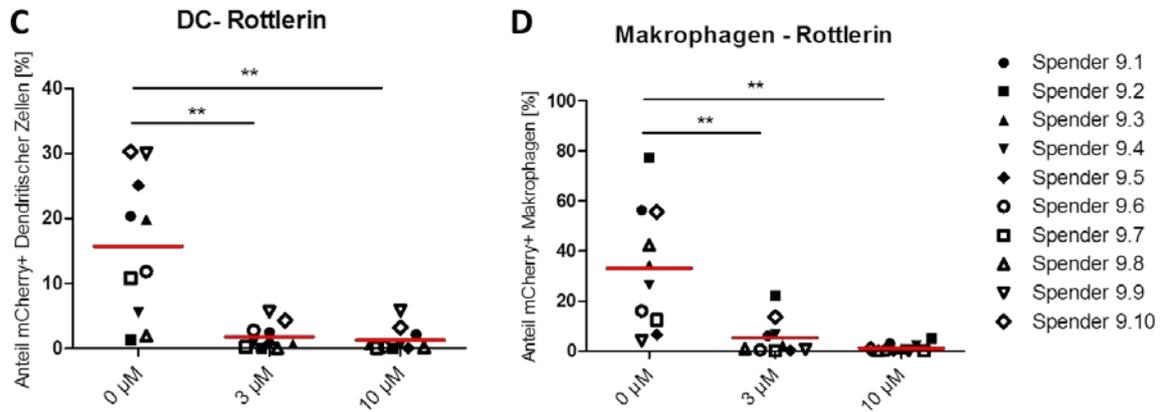
## A



## B



## Ergebnisse

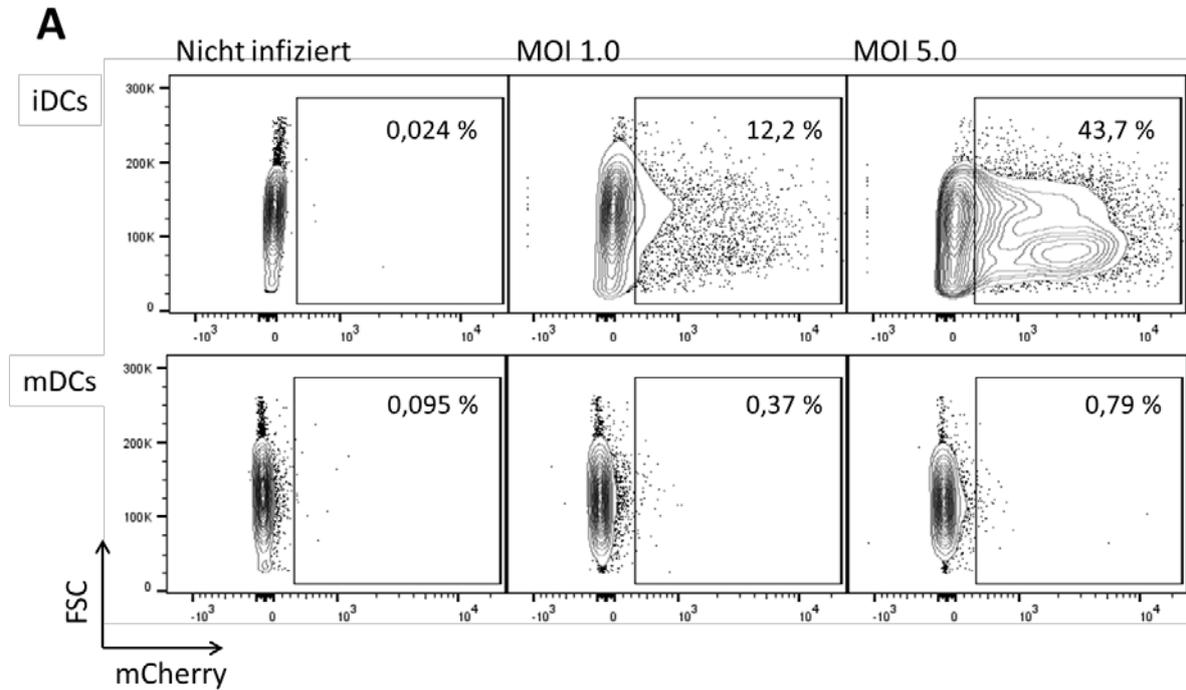


**Abbildung 3.15: Analyse der Infektionsrate von APCs nach Behandlung mit Rottlerin.** Makrophagen und DCs wurden mit 3  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  Rottlerin für 30 min behandelt oder unbehandelt belassen. 24 h nach Infektion mit V-D12-Cherry (MOI 1.0 und MOI 5.0) erfolgte die Bestimmung der mCherry+ Zellen mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Experiment mit infizierten Makrophagen (A) und DCs (B). C) Anteil infizierter DCs und D) Makrophagen ohne vorangegangene Behandlung und mit Behandlung mit 3  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  Rottlerin. Dargestellt sind die Anteile mCherry+ Zellen gemessen in 10 unabhängigen Experimenten und die berechneten Mittelwerte (rote Balken). Die statistische Analyse erfolgte durch den nicht-parametrischen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %: \*\* =  $p \leq 0.01$ .

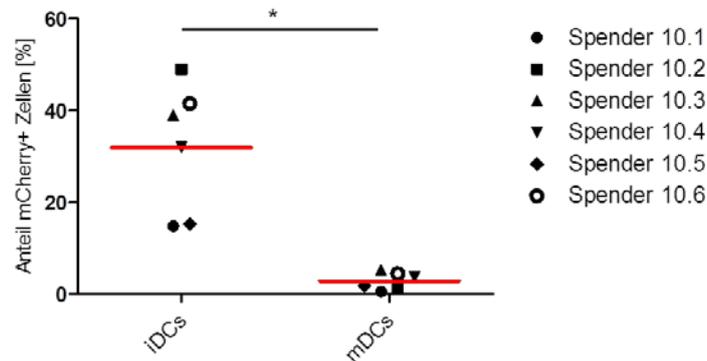
Diese Experimente legen nahe, dass das ORFV vermutlich über Makropinozytose in die Zelle gelangt. Phagozytose und Makropinozytose sind bekannte Aufnahmemechanismen von Makrophagen und unreifen DCs. Durch die Reifung von DCs und deren Aktivierung verlieren sie die Aufnahmefähigkeit von Pathogenen [217]. Im Folgenden sollte geklärt werden, ob durch die Reifung und Aktivierung von DCs die Aufnahme von ORFV verhindert wird, was die Annahme einer Aufnahme des ORFV durch APCs weiter stützen würde.

Unreife DCs wurden für die Reifung und Aktivierung mit LPS für 24 h stimuliert. Sowohl unreife DCs (iDCs) als auch gereifte DCs (mDCs) wurden anschließend mit V-D12-Cherry (MOI 1.0 und 5.0) für 24 h infiziert. Während 12,2 % bzw. 43,7 % der iDCs nach Infektion mit MOI 1.0 bzw. 5.0 infiziert waren, waren nach Infektion der mDCs mit derselben Virusmenge mit 0,37 % bzw. 0,79 % deutlich weniger Zellen infiziert (Abbildung 3.16 A). Auch die Infektion von iDCs und mDCs von 6 weiteren Spendern lieferte ähnliche Ergebnisse (Abbildung 3.16 B). Ca. 30 % der iDCs wurden nach Infektion mit V-D12-Cherry (MOI 5.0) infiziert. Nach Reifung der DCs wurde mit ca. 1-2 % ein signifikant reduzierter Anteil infizierter Zellen detektiert (Abbildung 3.16 B).

## Ergebnisse



## B Infektionsraten iDCs und mDCs



**Abbildung 3.16: Analyse der Infektionsrate von iDCs und mDCs.** DCs wurden mit LPS gereift. Nach Infektion der iDCs und mDCs mit V-D12-Cherry (MOI 1.0 und 5.0) erfolgte die Bestimmung der mCherry+ infizierten Zellen mittels Durchflusszytometrie. A) Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment mit dem prozentualen Anteil infizierter iDCs und mDCs. B) Anteil mCherry-positiver iDCs und mDCs gemessen in 6 unabhängigen Experimenten nach Infektion mit V-D12-Cherry (MOI 5.0). Dargestellt sind die Werte jedes Experiments und die berechneten Mittelwerte (rote Balken). Die statistische Analyse erfolgte durch den nicht-parametrischen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %: \*\* =  $p \leq 0.01$ .

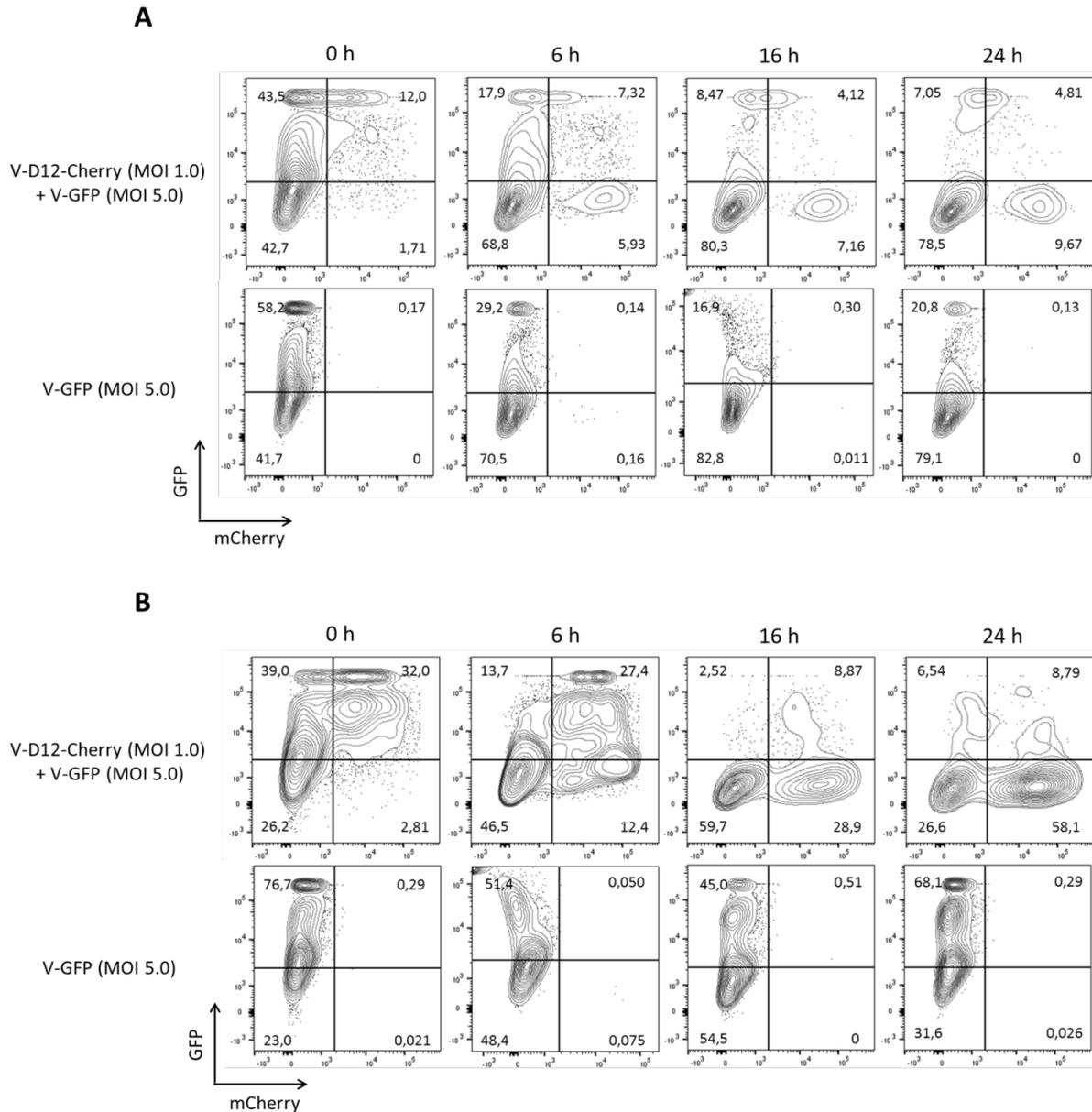
## Ergebnisse

Da DCs und Makrophagen auch durch die Aufnahme von ORFV aktiviert werden, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob diese Aktivierung eine nachfolgende Zweitinfektion mit weiteren ORFV verhindert. Makrophagen und DCs eines Spenders wurden mit V-D12-Cherry infiziert (MOI 1.0). 0 h, 6 h, 16 h und 24 h nach dieser Erstinfektion wurden die Zellen mit einer 5-fach höheren Dosis V-GFP (MOI 5.0) infiziert. Nach weiteren 24 h wurde dann mittels Durchflusszytometrie der Anteil an mCherry+, GFP+ und mCherry+ GFP+ Zellen bestimmt.

Bei gleichzeitiger Infektion von DCs bzw. Makrophagen mit V-D12-Cherry und V-GFP (0 h Wert) lag der Anteil mCherry+ Zellen bei im Mittel bei ca. 2 % während ca. 40 % der Zellen GFP+ waren. Gleichzeitig mit V-D12-Cherry und V-GFP infiziert waren ca. 12 % der DCs und 32 % der Makrophagen (Abbildung 3.17 A bzw. B). Deutlich mehr Zellen wurden folglich mit V-GFP infiziert. Bei zunehmender Dauer der Erstinfektion mit V-D12-Cherry nahm der Anteil GFP+ Zellen ab. Erfolgte die Infektion mit V-GFP 6 h Stunden nach Infektion mit V-D12-Cherry lag der Anteil an GFP+ Zellen bei 18 % der DCs und 14 % der Makrophagen. Auch der Anteil mCherry+ GFP+ Zellen ging zurück und lag bei 7 % bzw. 27 %. Nach 16 h bzw. 24 h Infektion mit V-D12-Cherry waren die DCs und Makrophagen so weit aktiviert, dass die Zweitinfektion mit V-GFP nur noch in wenigen Fällen möglich ist. 8 % bzw. 7 % der DCs und 3 % bzw. 7 % der Makrophagen waren positiv für GFP. Der Anteil der DCs bzw. Makrophagen, die sowohl mit V-D12-Cherry als auch mit V-GFP infiziert waren, lag bei 4 % bzw. 9 %. Während der Anteil mCherry+ Zellen nach Infektion mit 2 % bis 10 % der DCs und 3 % bis 58 % der Makrophagen über die Zeit zunahm, wurden mit zunehmender Dauer der Erstinfektion mit V-D12-Cherry weniger Zellen mit V-GFP infiziert (Abbildung 3.17 A und B). Um herauszufinden, ob die reduzierte Infektion mit V-GFP mit der Dauer der Kultivierung der Zellen zusammenhängt, wurden DCs und Makrophagen ohne vorangegangene Erstinfektion nach 6 h, 16 h und 24 h Kultivierung mit V-GFP infiziert. Ohne Erstinfektion mit V-D12-Cherry zeigten sich ebenfalls Unterschiede im Anteil GFP+ Zellen. Wurden die DCs bzw. Makrophagen direkt infiziert (0 h Wert), waren 58 % bzw. 77 % der Zellen GFP+. Nach 6 h, 16 h und 24 h waren 29 %, 17 % und 21 % der DCs bzw. 51 %, 45 % und 68 % der Makrophagen mit V-GFP infiziert (Abbildung 3.17 A und B). Jedoch führte eine Erstinfektion mit V-D12-Cherry im Vergleich zu deutlich geringeren Infektionsraten mit V-GFP.

Zusätzlich wurde beobachtet, dass bei gleichzeitiger Infektion mit V-D12-Cherry und V-GFP die DCs und Makrophagen, die mCherry exprimierten zu mehr als 80 % auch mit V-GFP infiziert waren (Abbildung 3.17 A und B). Während 20 % der GFP+ DCs bzw. 45 % der GFP+ Makrophagen mCherry exprimierten, waren nur 4 % der GFP- DCs bzw. 10 % der GFP- Makrophagen mit V-D12-Cherry infiziert (Abbildung 3.17 A und B). Demnach scheint ein Teil der APCs empfänglicher für eine ORFV-Infektion zu sein.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.17: Analyse der Aufnahmefähigkeit von V-GFP nach Infektion mit V-D12-Cherry.** A) DCs und B) Makrophagen eines Spenders wurden mit V-D12-Cherry (MOI 1.0) infiziert. 0 h, 6 h, 16 h und 24 h nach Infektion erfolgte die Zweitinfektion mit V-GFP (MOI 5.0). Zur Kontrolle wurden die Zellen ohne Erstinfektion mit V-D12-Cherry nach 0 h, 6 h, 16 h und 24 h Kultivierung infiziert. Mittels Durchflusszytometrie wurde der Anteil mCherry+, GFP+ und mCherry+ GFP+ DCs und Makrophagen bestimmt.

Die Aktivierung und Reifung der Zellen durch die Infektion mit V-D12-Cherry führte folglich nach wenigen Stunden zu einer verminderten Fähigkeit V-GFP aufzunehmen. Dieser Versuch demonstriert, dass die Aktivierung der APCs durch ORFV ausreicht, um die Aufnahme von weiteren ORFV zu reduzieren.

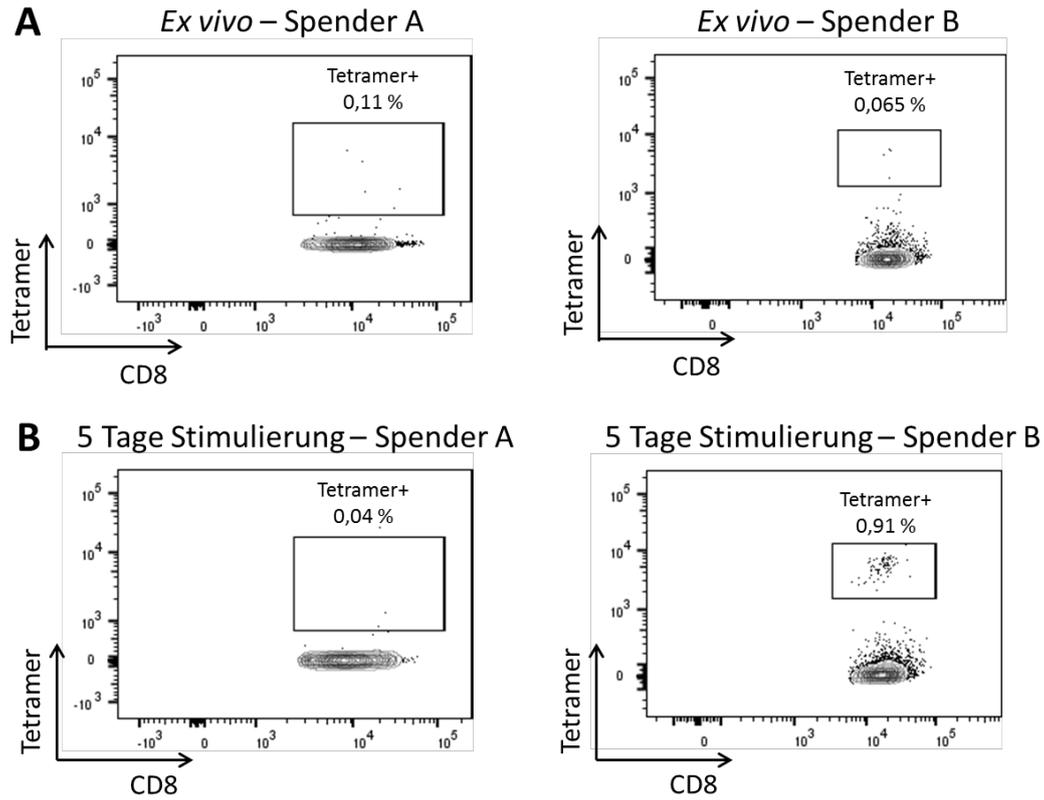
### 3.1.6 Induktion von Antigen-spezifischen T-Zell-Antworten *in vitro*

Für die Analyse der Induktion von Antigen-spezifischen T-Zell-Antworten wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Zum einen sollte die Expansion von T-Gedächtniszellen sowie deren Funktionalität nach Infektion untersucht werden (*Recall*), zum anderen sollte gezeigt werden, dass naive T-Zellen gegen das ORFV-codierte artifizielle Antigen PepTrio aktiviert werden können (*Priming*).

PBMCs von gesunden HLA-A\*02-positiven Spendern wurden isoliert. Um zu überprüfen, ob der Spender HCMV-spezifische T-Gedächtniszellen besitzt, wurde eine Tetramer-Färbung der PBMCs *ex vivo* durchgeführt. Zusätzlich wurden die Zellen für 5 Tage mit NLVPMVATV-Peptid stimuliert und anschließend eine erneute NLVPMVATV-Tetramer-Färbung durchgeführt. Bei Abwesenheit von Gedächtniszellen wurden die Zellen für das *Priming* naiver T-Zellen verwendet. Wurde dagegen eine Expansion Tetramer+ Zellen beobachtet, so weist dies auf die Anwesenheit von T-Gedächtniszellen hin. Diese PBMCs eigneten sich in einem *Recall*-Experiment zur Expansion der NLVPMVATV-spezifischen Gedächtniszellen.

Abbildung 3.18 stellt exemplarisch Zellen zweier Spender dar, die *ex vivo* und 5 Tage nach Peptid-Stimulierung mit NLVPMVATV-Tetrameren gefärbt wurden. *Ex vivo* zeigten sich nur vereinzelt Zellen in den Tetramer+ Populationen (Abbildung 3.18 A). 5 Tage nach Peptid-Stimulierung war bei den Zellen von Spender A keine Expansion der Tetramer+ Population zu beobachten und die anfängliche Population von 0,11 % Tetramer+ CD8+ T-Zellen verringerte sich nach Peptid-Stimulierung auf einen Anteil von 0,04 % Tetramer+ CD8+ T-Zellen (Abbildung 3.18 B). Somit eignen sich die Zellen von Spender A für das *Priming* von naiven T-Zellen. Dagegen wurde bei Spender B durch die Stimulierung mit Peptid für 5 Tage eine Expansion der Tetramer+ CD8+ T-Zellen Population von 0,07 % auf 0,9 % beobachtet (Abbildung 3.18 B). Die Zellen von Spender B wurden demnach für die Aktivierung und Expansion von T-Gedächtniszellen verwendet.

## Ergebnisse



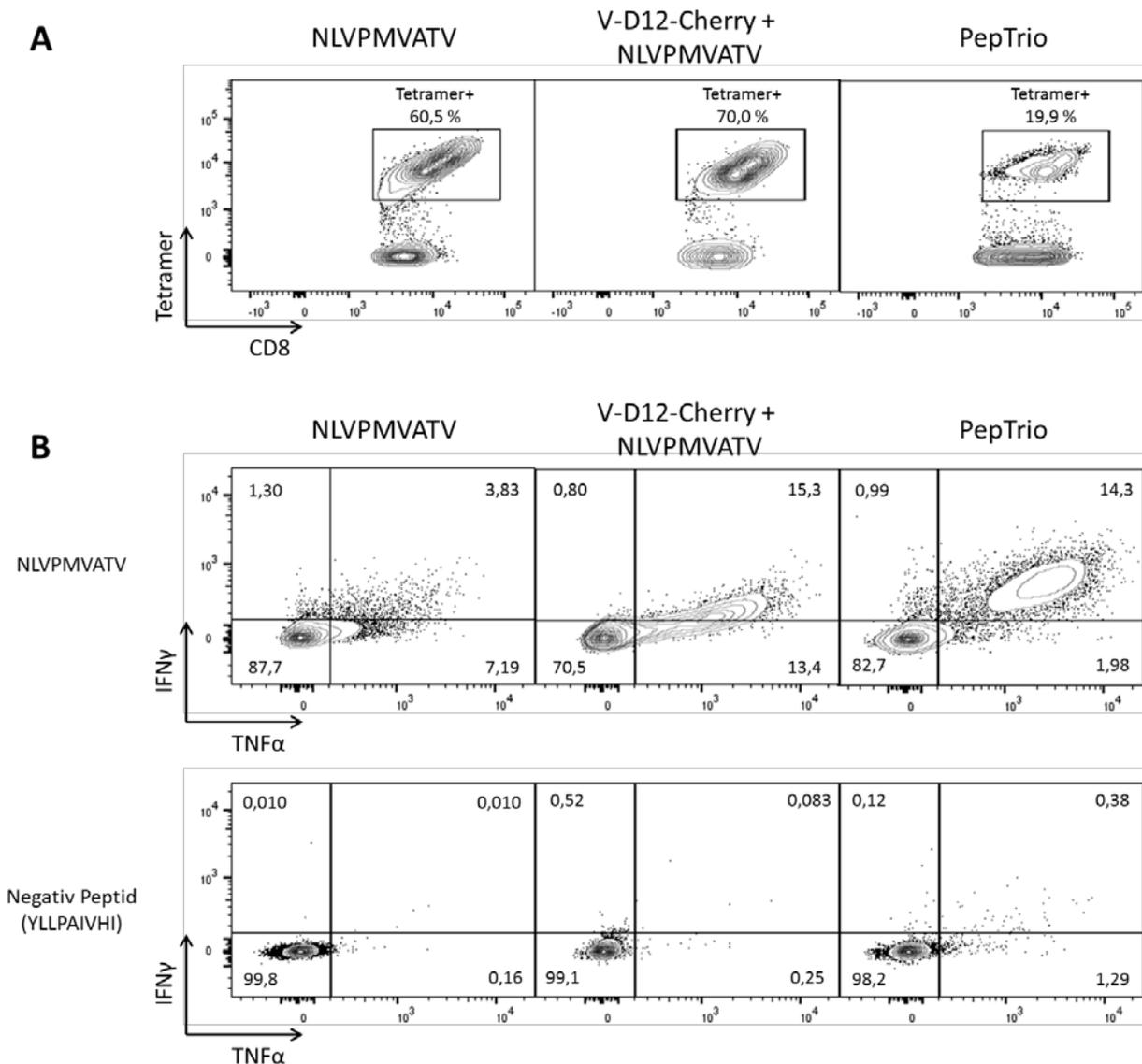
**Abbildung 3.18: Nachweis von NLVPMVATV-spezifischen T-Gedächtniszellen *ex vivo* und 5 Tage nach Peptid-Stimulierung.** PBMCs wurden mittels Tetramer-Färbung auf die Anwesenheit von NLVPMVATV-spezifischen T-Gedächtniszellen untersucht. A) *Ex vivo* wurden PBMCs von Spender A und B mit NLVPMVATV tragenden Tetrameren gefärbt und der Anteil Tetramer+ CD8+ T-Zellen bestimmt. B) Die isolierten PBMCs wurden mit NLVPMVATV stimuliert und nach 5 Tagen erneut mit NLVPMVATV tragenden Tetrameren gefärbt. Mittels Durchflusszytometrie wurde der prozentuale Anteil Tetramer+ CD8+ T-Zellen bestimmt. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Spender mit (Spender B) und ein repräsentativer Spender ohne (Spender A) NLVPMVATV-spezifische T-Gedächtniszellen.

Um zu testen, ob T-Gedächtniszellen gegen das ORFV-codierte Antigen aktiviert werden können, wurden PBMCs eines Spenders mit PepTrio-ORFV (MOI 5.0) infiziert. Als positive Kontrolle wurden die PBMCs mit NLVPMVATV stimuliert. Um den Effekt von ORFV auf die Aktivierung der T-Zellen zu untersuchen, wurden darüber hinaus Zellen mit V-D12-Cherry (MOI 5.0) infiziert und zusätzlich mit NLVPMVATV beladen. 12 Tage nach Infektion oder Peptid-Stimulierung erfolgte eine Tetramer-Färbung sowie eine intrazelluläre Zytokin-Färbung, um die Expansion der T-Gedächtniszellen sowie deren Funktionalität zu analysieren.

In Abbildung 3.19 ist ein Beispiel zur Analyse der Expansion von T-Gedächtniszellen nach Infektion mit PepTrio-ORFV dargestellt. 12 Tage nach Stimulierung mit NLVPMVATV-Peptid wurden 60,5 % der CD8+ T-Zellen als Tetramer+ identifiziert. Die Infektion der PBMCs mit PepTrio-ORFV resultierte in 19,9 % Tetramer+ CD8+ T-Zellen. Auch die Kombination von NLVPMVATV und V-D12-Cherry führte zu einer Expansion der Gedächtniszellen auf 70 % Tetramer+ CD8+ T-Zellen (Abbildung 3.19 A). Die Re-Stimulierung mit NLVPMVATV für die Analyse der Expression von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  resultierte in 3,8 % TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$ +, 1,3 % IFN $\gamma$ + und

## Ergebnisse

7,2 % TNF $\alpha$ + CD8+ T-Zellen nach Stimulierung mit NLVPMVATV. Dagegen waren nach Infektion mit PepTrio-ORFV 14,3 % der CD8+ T-Zellen positiv für TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ , 0,99 % IFN $\gamma$ + und 1,98 % TNF $\alpha$ +. Die Kombination von V-D12-Cherry und NLVPMVATV führte im Vergleich zur alleinigen Peptid-Stimulierung zu einer erhöhten Produktion von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ . 15,3 % der CD8+ T-Zellen waren positiv für TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ , 0,8 % für IFN $\gamma$  und 13,4 % für TNF $\alpha$  (Abbildung 3.19 B).

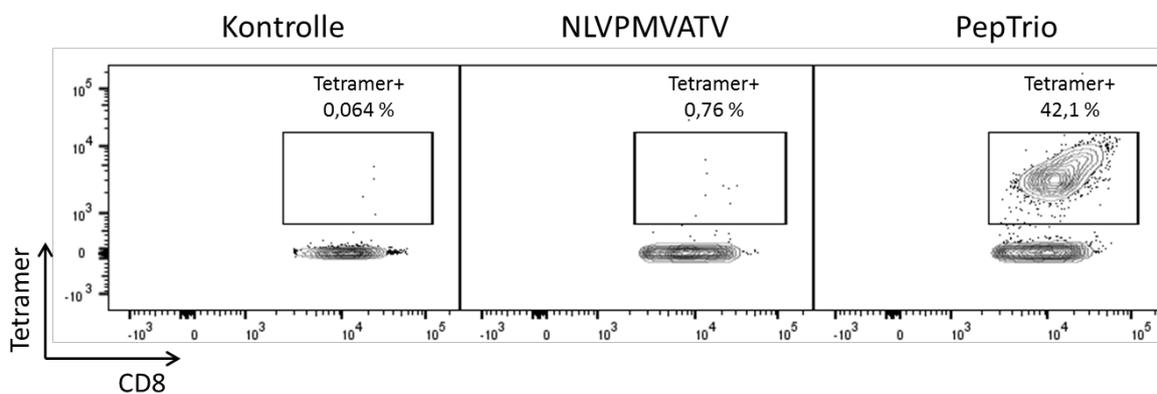


**Abbildung 3.19: Analyse der Expansion und Funktionalität von T-Gedächtniszellen nach Infektion mit PepTrio-ORFV.** PBMCs wurden mit NLVPMVATV stimuliert, mit V-D12-Cherry infiziert (MOI 5.0) und mit NLVPMVATV stimuliert oder mit PepTrio-ORFV (MOI 5.0) infiziert. A) Nach 12 Tagen wurde die Expansion der T-Gedächtniszellen über den Anteil Tetramer+ CD8+ T-Zellen bestimmt. B) Die Analyse der Funktionalität erfolgte nach Re-Stimulierung mit NLVPMVATV durch intrazelluläre Färbung von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  in CD8+ T-Zellen. Die Re-Stimulierung mit negativem Peptid (YLLPAIVHI) verdeutlicht die Grundexpression von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ .

## Ergebnisse

Für das *Priming* von naiven T-Zellen wurden DCs entweder mit Hilfe von Zytokinen aktiviert und mit NLVPMVATV beladen oder mit PepTrio-ORFV (MOI 5.0) infiziert. Anschließend wurden die DCs mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen ko-kultiviert. Das *Priming* mittels Peptid-beladenen DCs diente als positive Kontrolle des Experiments. Nach vierwöchiger Ko-Kultivierung von DCs mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen und wöchentlichen Re-Stimulierungen mittels autologer Peptid-beladener PBMCs erfolgte die Analyse des *Primings* durch Tetramer-Färbung.

Wie in Abbildung 3.20 dargestellt, wurden naive T-Zellen erfolgreich gegen das ORFV-codierte artifizielle Antigen PepTrio bzw. das darin enthaltene Epitop NLVPMVATV aktiviert. Unstimulierte Zellen dienten als negative Kontrolle und zeigten einen Grund-Anteil von 0,064 % Tetramer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Nach Peptid-Stimulierung wurde eine Tetramer<sup>+</sup> Population von 0,76 % detektiert. Die Infektion von DCs mit PepTrio-ORFV führte zu einer starken Aktivierung und Proliferation naiver T-Zellen: 42,1 % der analysierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen waren nach Stimulierung mit PepTrio-ORFV-infizierten DCs Tetramer<sup>+</sup>.



**Abbildung 3.20: Analyse des *in vitro* priming von naiven T-Zellen durch PepTrio-ORFV-infizierte DCs.** Nach Beladung der DCs mit NLVPMVATV oder Infektion mit PepTrio-ORFV erfolgte die Ko-Kultivierung mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Alle 7 Tage wurden die Zellen durch autologe Peptid-beladene PBMCs re-stimuliert. Nach 4 Wochen wurde der Anteil Tetramer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen über Tetramer-Färbung und Durchflusszytometrie bestimmt.

Sowohl die Expansion von T-Gedächtniszellen durch die Infektion von PBMCs als auch das *Priming* von naiven T-Zellen mittels PepTrio-ORFV-infizierter DCs zeigten, dass das ORFV-codierte Antigen in APCs exprimiert und auf deren Zelloberfläche präsentiert wird. Zudem führt die ORFV-Infektion zu einer Aktivierung der APCs, die dadurch zur Induktion einer Antigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort befähigt sind. ORFV-tragende aktivierte APCs sind somit in der Lage, Antigen-spezifische Immunantworten *in vitro* zu induzieren.

### 3.1.7 Induktion von Antigen-spezifischen T-Zell-Antworten *in vivo*

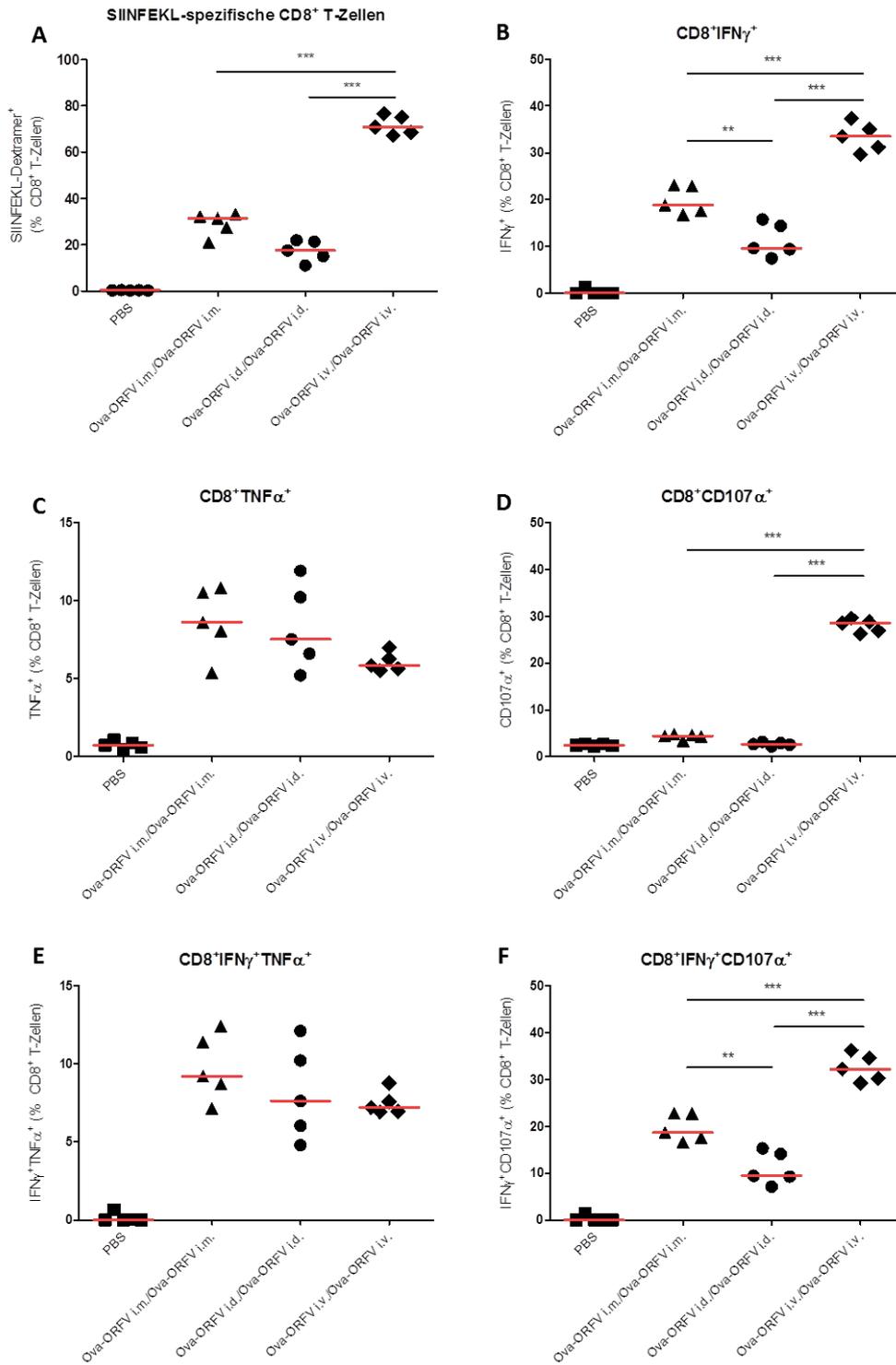
Nachdem die Induktion von Antigen-spezifischen Immunantworten *in vitro* erfolgreich demonstriert werden konnte, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob eine Antigen-spezifische T-Zell-Antwort *in vivo* induziert werden kann. Hierbei sollte zudem der Einfluss unterschiedlicher Immunisierungsrouten auf die Stärke der induzierten Immunantwort betrachtet werden. Sowohl die Durchführung des Experiments als auch die Analyse der Daten erfolgten durch Boehringer Ingelheim.

C57BL/6NTac Mäuse wurden intramuskulär (i.m.), intradermal (i.d.) oder intravenös (i.v.) mit  $10^6$  pfu/ml V12-Ova-D12-GFP (kurz: Ova-ORFV) immunisiert, einer ORFV-Rekombinanten, die das Modellantigen Ovalbumin (Ova) exprimiert. Die erste Immunisierung (*Prime*) erfolgte an Studientag 0 und 14 Tage später folgte eine erneute Immunisierung (*Boost*) über dieselbe Immunisierungsrouten. 5 Tage nach der *Boost*-Immunisierung wurde die Ova-spezifische T-Zell-Antwort analysiert. Der Anteil Ova-spezifischer T-Zellen wurde über Dextramer-Färbung der murinen PBMCs mit einem SIINFEKL-Dextramer bestimmt. SIINFEKL ist ein Epitop von Ova, das auf dem murinen MHC Klasse I-Molekül H2-K<sup>b</sup> präsentiert und von Ova-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkannt wird. Für die Analyse der Funktionalität der Ova-spezifischen T-Zellen erfolgte die intrazelluläre Färbung von Zytokinen. Isolierte Splenozyten wurden hierfür mit SIINFEKL re-stimuliert.

5 Tage nach *Boost*-Immunisierung zeigte die Färbung mit SIINFEKL-Dextramer den Einfluss der verwendeten Immunisierungsrouten auf den Anteil Ova-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 3.21 A). Während die Immunisierung i.m. zu durchschnittlich ca. 35 % SIINFEKL-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen führte, wurde nach i.d. Immunisierung ein geringerer Anteil von ca. 20 % ermittelt. Der signifikant größte Anteil SIINFEKL-spezifischer T-Zellen mit ca. 70 % der CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde nach i.v. Immunisierung gemessen (Abbildung 3.21 A). In der Kontroll-Gruppe wurden nach Immunisierung mit PBS keine SIINFEKL-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen detektiert.

Die Analyse der Produktion von IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und CD107a demonstrierte ebenfalls die Überlegenheit der i.v. Immunisierung im Vergleich zu den Immunisierungen i.d. und i.m. (Abbildung 3.21 B-F). Insbesondere die Produktion von IFN $\gamma$  und CD107a war nach i.v. Immunisierung signifikant erhöht. Die i.m. und i.d. Immunisierungen resultierten in einem Anteil von 20 % bzw. 10 % IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Nach i.v. Immunisierung lag der Anteil IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen dagegen bei über 30 % (Abbildung 3.21 B). Die Produktion von CD107a wurde durch i.m. und i.d. Immunisierung im Vergleich zur Kontroll-Gruppe nicht gesteigert. Nach i.v. Immunisierung wurde ein signifikant erhöhter Anteil von 30 % CD107a<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen detektiert (Abbildung 3.21 D). Auch der Anteil IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde durch i.v. Immunisierung im Vergleich zu den i.m. und i.d. Immunisierungen signifikant gesteigert. Nach i.m. und i.d. Immunisierung lag der Anteil IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei ca. 20 % bzw. 10 %. Die i.v. Immunisierung resultierte in einem Anteil von über 30 % IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 3.21 F). Der Anteil TNF $\alpha$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen und IFN $\gamma$ <sup>+</sup> TNF $\alpha$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen war bei allen verwendeten Immunisierungsrouten vergleichbar und lag im Mittel bei ca. 7-9 % (Abbildung 3.21 C und E). In der PBS-immunisierten Kontrollgruppe war keine Produktion der analysierten Zytokine zu erkennen.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.21:** Die Ova-spezifische T-Zell-Antwort *in vivo* nach Immunisierung mit Ova-ORFV. C57BL/6NTac-Mäuse wurden im Abstand von 14 Tagen zweimalig intramuskulär (i.m.), intradermal (i.d.) oder intravenös (i.v.) mit 10<sup>6</sup> pfu/ml Ova-ORFV immunisiert. 5 Tage nach *Boost*-Immunisierung wurde die Ova-spezifische T-Zell-Antwort in Splenozyten analysiert. A) Anteil SIINFEKL-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen. B)-D) Anteil IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen (B), TNF $\alpha$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen (C), CD107a<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen (D), IFN $\gamma$ <sup>+</sup> TNF $\alpha$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen (E) und IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen (F) nach Re-Stimulierung mit SIINFEKL-Peptid. Dargestellt sind die Werte der einzelnen Tiere sowie die berechneten Mittelwerte (rote Balken). Die statistische Analyse erfolgte durch einen ungepaarten t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %: ns =  $p > 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$ .

Im ersten Teil der Dissertation konnte gezeigt werden, dass ORFV durch APCs aufgenommen wird. Durch die Aufnahme werden Monozyten, Makrophagen und DCs aktiviert, was sich in einer erhöhten Expression verschiedener ko-stimulatorischer Moleküle äußert. Aktivierte APCs können umliegende T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen aktivieren, wobei unter anderem die Produktion verschiedener Zytokine eine Rolle spielt. Des Weiteren wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Induktion von spezifischen Immunantworten gegen ein ORFV-codiertes Antigen nachgewiesen. Zusammenfassend konnte demonstriert werden, dass ORFV ideale Voraussetzungen für den Einsatz als viraler Vektor zur Induktion einer starken adaptiven Immunantwort bietet.

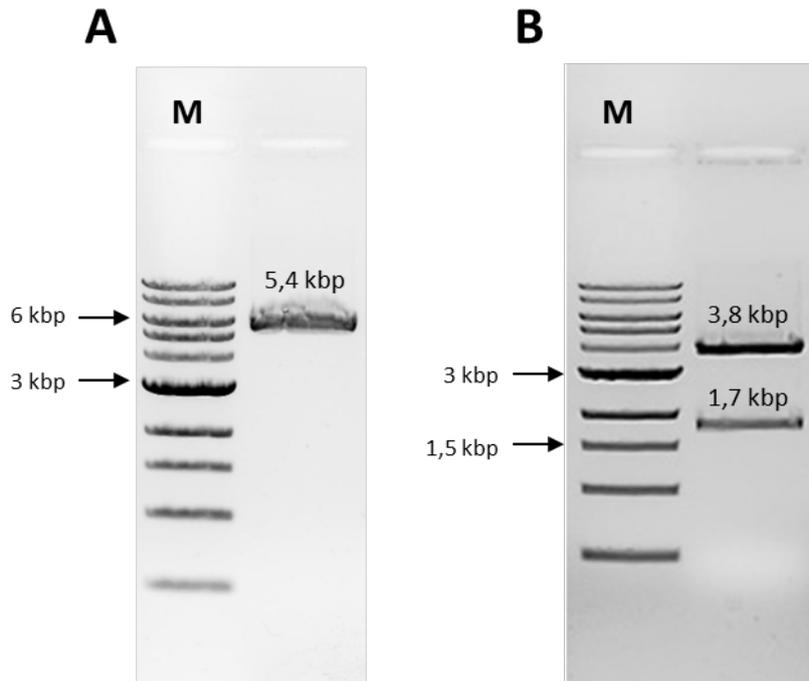
## **3.2 Herstellung und Charakterisierung CD80 und CD40L exprimierender ORFV-Rekombinanten**

### **3.2.1 Herstellung der Transferplasmide**

Für die Herstellung von ORFV-Rekombinanten wurden die benötigten Transgene in Transferplasmide kloniert. Mit Hilfe der Transferplasmide wurden die Transgene im Anschluss über homologe Rekombination in das ORFV-Genom integriert. Für die Herstellung der benötigten ORFV-Rekombinanten erfolgte daher zunächst die Herstellung der Transferplasmide pD12-PepTrio-2-Cherry, pD12-CD80 und pV12-CD80.

#### **3.2.1.1 pD12-PepTrio-2-Cherry**

Als Ausgangsplasmid für die Klonierung von pD12-PepTrio-2-Cherry diente pD12-Cherry. Durch Restriktionsverdau mit den Enzymen *HindIII* und *SpeI* wurde pD12-Cherry linearisiert, was anhand der Größe des entstandenen DNA-Fragments von 5,4 kb nachgewiesen wurde (Abbildung 3.22 A). Mit denselben Restriktionsenzymen wurde der Restriktionsverdau eines synthetisierten DNA-Fragments, das die 3 Minigene des artifiziellen Antigens PepTrio enthält, durchgeführt. Dabei entstanden komplementäre Enden, durch die im nächsten Schritt über Ligation Ausgangsplasmid und Insert miteinander verbunden werden konnten. Da durch den Restriktionsverdau des synthetisierten DNA-Fragments nur wenige Basenpaare entfernt wurden und dies mittels Gelelektrophorese nicht nachweisbar ist, erfolgte für dieses Fragment kein Nachweis einer erfolgreichen Spaltung. Nach erfolgreicher Ligation und Transfer des entstandenen Plasmids in kompetente *E. coli* folgten Plasmidisolierungen mit anschließender Kontroll-Spaltung. Die Kontroll-Spaltung von pD12-PepTrio-2-Cherry wurde mit den Enzymen *BamHI* und *SalI* durchgeführt. Bei erfolgreicher Ligation von Insert und Ausgangsplasmid wurden DNA-Fragmente mit den Größen 3,8 kbp und 1,7 kbp erwartet. Erfolgte dagegen die Religierung des Ausgangsplasmids ohne Ligation mit dem gewünschten Insert, entstand ein DNA-Fragment mit der Größe von 5,4 kbp. Die erfolgreiche Isolierung des gewünschten Transferplasmids pD12-PepTrio-2-Cherry wurde mittels der Kontrollspaltung durch *BamHI* und *SalI* sowie durch Sequenzierung des Plasmids nachgewiesen (Abbildung 3.22 B, siehe Anhang: Abbildung 0.1).

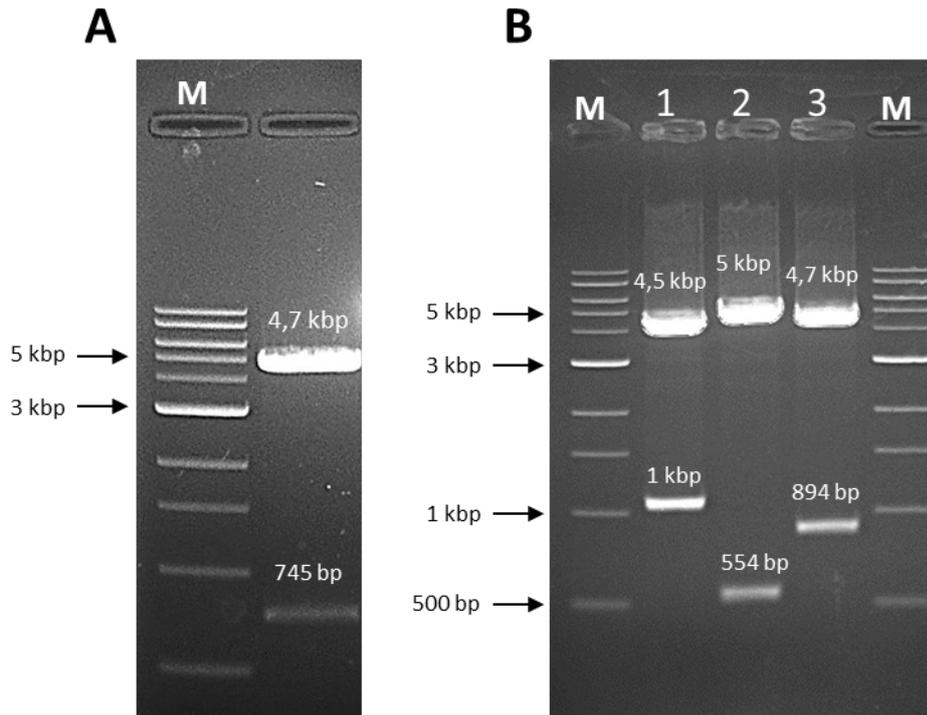


**Abbildung 3.22: Restriktionsverdau von pD12-Cherry und pD12-PepTrio-2-Cherry.** A) Restriktionsverdau von pD12-mCherry mit *HindIII* und *SpeI*. Es entsteht ein DNA-Fragment mit der Größe von 5,4 kbp. B) Kontrollverdau des Transferplasmids pD12-PepTrio-2-Cherry mit *BamHI* und *SalI*. Es entstehen DNA-Fragmente mit den Längen 3,8 kbp und 1,7 kbp. 1 % Agarosegel; M = QuickLoad 1 kb DNA Ladder, NEB.

### 3.2.1.2 pD12-CD80 und pV12-CD80

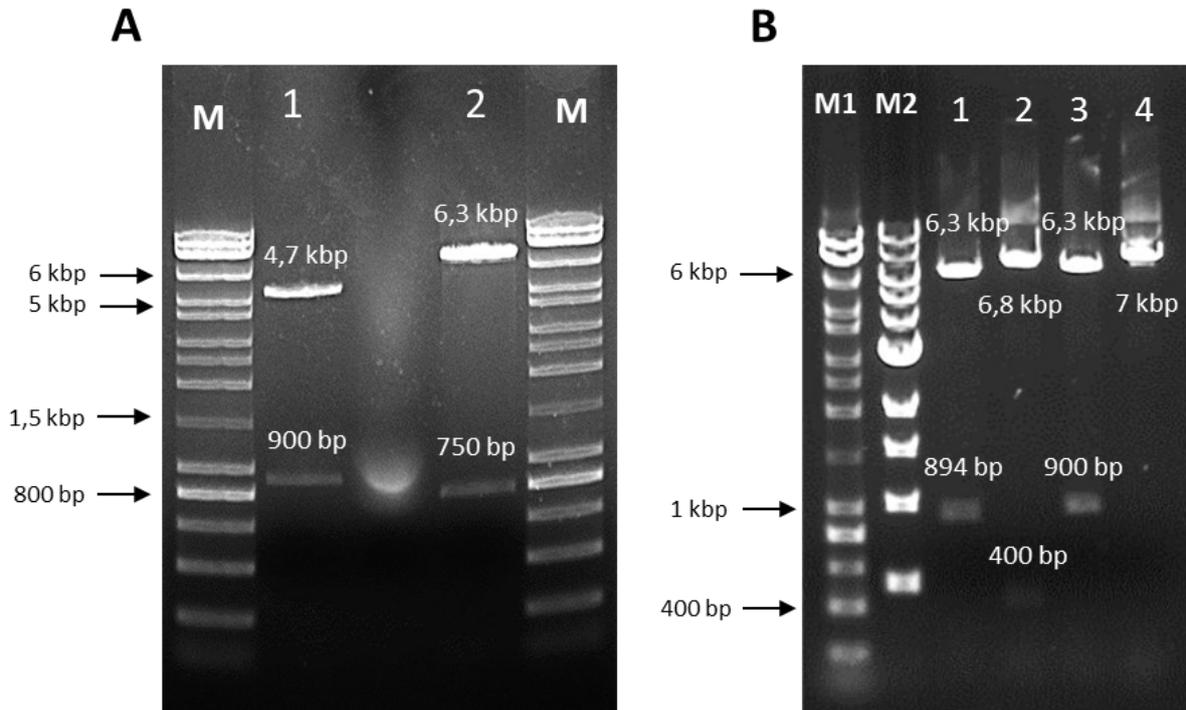
Für die Herstellung des Transferplasmids pV12-CD80 war zunächst die Klonierung von pD12-CD80 notwendig. Hierfür wurde erneut das Ausgangsplasmid pD12-Cherry verwendet. Durch den Restriktionsverdau mittels *BglII* und *MluI* wurde das mCherry-Gen aus dem Ausgangsplasmid herausgeschnitten. Hierbei entstanden DNA-Fragmente mit den Größen von 4,7 kbp und 745 bp. Das DNA-Fragment des Ausgangsplasmids ohne mCherry mit 4,7 kbp wurde anschließend aus dem Agarosegel eluiert (Abbildung 3.23 A). Das Gen CD80 wurde mit denselben Restriktionsenzymen aus einem synthetisierten DNA-Fragment herausgeschnitten. Da hierbei nur wenige Basenpaare entfernt wurden und dies mittels Gelelektrophorese nicht nachweisbar ist, wurde die Ligation des Fragments in das Ausgangsplasmid ohne weiteren Nachweis einer erfolgreichen Restriktion durchgeführt. Nach Ligation von Insert und Ausgangsplasmid erfolgte der Transfer des entstandenen Plasmids in kompetente *E. coli*. Nach Plasmidisolierung erfolgten mehrere Kontrollspaltungen mit verschiedenen Restriktionsenzymen (Abbildung 3.23 B). Die Restriktion mit *HindIII* und *MluI* erbrachte die gewünschten DNA-Fragmente mit den Größen von 4,5 kbp und 1 kbp (Abbildung 3.23 B, Spur 2). Durch die Spaltung mit *PstI* entstanden die gewünschten DNA-Fragmente mit einer Größe von 5 kbp und 554 bp (Abbildung 3.23 B, Spur 3). Die Spaltung mit *EcoRI* und *BamHI* erzeugte die gewünschten Fragmente mit 4,7 kbp und 894 bp (Abbildung 3.23 B, Spur 4, siehe Anhang: Abbildung 0.2).

## Ergebnisse



**Abbildung 3.23: Restriktionsverdau von pD12-Cherry und pD12-CD80.** A) Restriktionsverdau des Ausgangsplasmids pD12-Cherry mit *BglII* und *MluI* resultiert in DNA-Fragmenten mit den Größen 4,7 kbp und 745 bp. B) Kontrollverdau des Transferplasmids pD12-CD80 mit 1) *HindIII* + *MluI* (4,5 kbp + 1 kbp), 2) *PstI* (5 kbp + 554 bp) und 3) *EcoRI* + *BamHI* (4,7 kbp und 894 bp). 1 % Agarosegel; M = QuickLoad 1 kb DNA Ladder, NEB.

Mit Hilfe des erstellten Plasmids pD12-CD80 wurde nachfolgend das Transferplasmid pV12-CD80 hergestellt. Durch die Klonierung von pD12-CD80 war es nun möglich das mCherry-Gen im Ausgangsplasmid pV12-Cherry über eine Restriktion mittels *BglII* und *EcoRI* durch CD80 zu ersetzen. Durch die Spaltung mittels *BglII* und *EcoRI* entstanden für das Plasmid pD12-CD80 DNA-Fragmente mit den Größen 4,7 kbp und 900 bp (Abbildung 3.24 A, Spur 2), für pV12-Cherry entstanden Fragmente mit den Größen 6,3 kbp und 750 bp (Abbildung 3.24 A, Spur 4). Mittels Gelelektion wurden sowohl das Gen CD80 mit 900 bp als auch das Rückgrat des Ausgangsplasmids pV12-Cherry mit 6,3 kbp aus dem Agarosegel aufgereinigt. Nach erfolgreicher Ligation von Insert und Ausgangsplasmid erfolgte der Transfer in kompetente *E. coli*. Aus diesen wurde das generierte Plasmid isoliert und mit Hilfe von mehreren Restriktionsenzymen durch Kontroll-Spaltungen überprüft (Abbildung 3.24 B). Die erfolgreiche Herstellung von pV12-CD80 wurde durch Restriktionen mit *EcoRI* und *BamHI* (6,3 kbp + 894 bp, Abbildung 3.24 B, Spur 1), *FseI* (6,8 kbp + 400 bp, Abbildung 3.24 B, Spur 2), *EcoRI* + *BglII* (6,3 kbp + 900 bp, Abbildung 3.24 B, Spur 3) und *XbaI* (linearisiert mit 7 kbp, Abbildung 3.24 B, Spur 4) sowie durch Sequenzierung des Plasmids nachgewiesen (siehe Anhang: Abbildung 0.3).



**Abbildung 3.24: Restriktionsverdau von pD12-CD80, pV12-Cherry und pV12-CD80.** A) Restriktionsverdau mit *BglII* und *EcoRI* von pD12-CD80 resultiert in DNA-Fragmenten mit den Größen 4,7 kbp und 900 bp (Spur 1), die Spaltung von pV12-Cherry in Fragmenten mit den Größen 6,3 kbp und 750 bp (Spur 2). 1 % Agarosegel, M = Hyperladder 1 kb, Bioline. B) Restriktionsverdau des Transferplasmids pV12-CD80 mit 1) *EcoRI* und *BamHI* (6,3 kbp + 894 bp), 2) *FseI* (6,8 kbp + 400 bp), 3) *EcoRI* und *BglII* (6,3 kbp + 900 bp) und 4) *XbaI* (7 kbp, linearisiert). 1 % Agarosegel; M1 = Hyperladder 1 kb, Bioline; M2 = QuickLoad 1 kb DNA Ladder, NEB.

## 3.2.2 Herstellung der ORFV-Rekombinanten

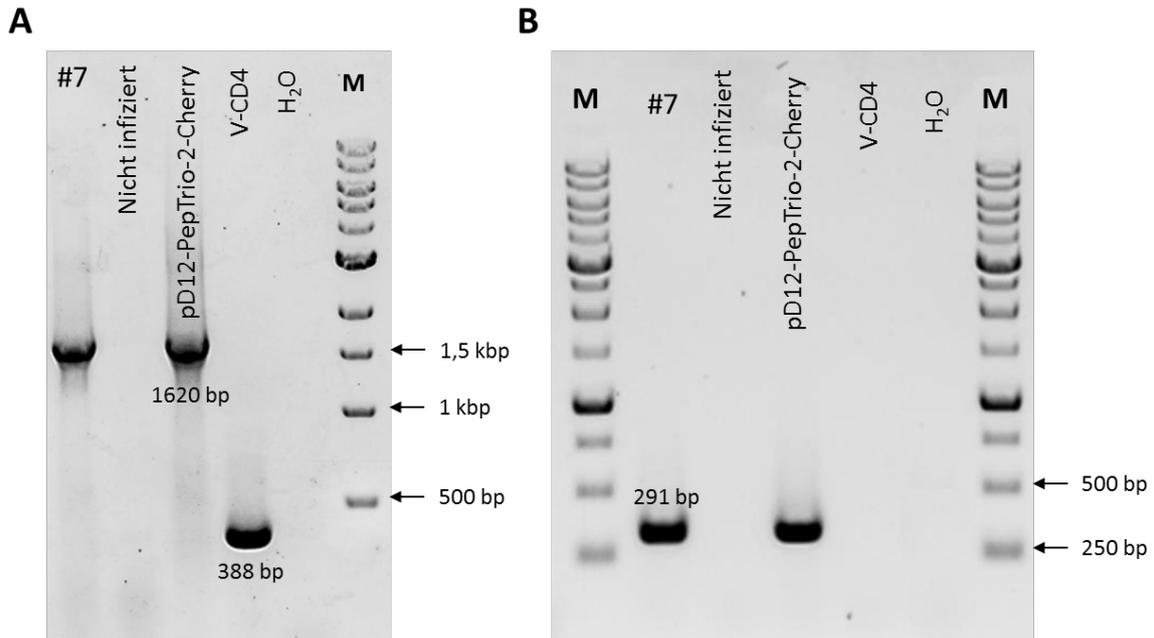
### 3.2.2.1 V-CD4-D12-PepTrio-2-Cherry

Für die Herstellung der Rekombinanten V12-CD80-D12-PepTrio-2-Cherry und V-CD40L-2-CD80-D12-PepTrio-2-Cherry wurde zunächst die Rekombinante V-CD4-D12-PepTrio-2-Cherry generiert. Dieses Virus sollte im Anschluss als Ausgangsvirus dienen, um über die MACS-basierte Selektion weitere Rekombinanten herzustellen.

Hierfür wurde das Transferplasmid pD12-PepTrio-2-Cherry mittels Nukleofektion in mit der ORFV-Rekombinanten D1701-V-CD4 (kurz: V-CD4) infizierten Vero-Zellen transferiert. Über homologe Rekombination erfolgt die Integration von PepTrio und mCherry in den Del2-Lokus von V-CD4. Die Expression von mCherry ermöglichte die Selektion der neuen ORFV-Rekombinanten. Mit Hilfe von FACS-basierter Selektion und Selektion mittels limitierender Verdünnungsreihe wurde die ORFV-Rekombinante V-CD4-D12-PepTrio-2-Cherry aus einzelnen Virusplaques aufgereinigt. Um die genomische Homogenität der Rekombinante zu überprüfen, erfolgte nach Isolierung von DNA aus Virus-infizierten Vero-Zellen eine PCR-Typisierung. Durch Amplifikation des Del2-Lokus mit spezifischen Primern wurde hierbei die Integration von PepTrio und mCherry nachgewiesen. Während die Amplifikation des Del2-Lokus ohne Transgen in der V-CD4 Rekombinante ein DNA-Fragment mit einer Größe von 388 bp erzeugt (Abbildung

## Ergebnisse

3.25 A, Spur 4), wurde nach Integration von PepTrio und mCherry ein DNA-Fragment mit einer Größe von 1620 bp amplifiziert (Abbildung 3.25 A, Spur 1 und 3, Rekombinante #7). Auch die PCR mit PepTrio-spezifischen Primern amplifizierte im analysierten Virusklon #7 ein DNA-Fragment mit der erwarteten Größe von 291 bp (Abbildung 3.25 B, Spur 2). Im Anschluss an die Aufreinigung von V-CD4-D12-PepTrio-2-Cherry erfolgte die Anzucht der Rekombinanten im großen Maßstab.

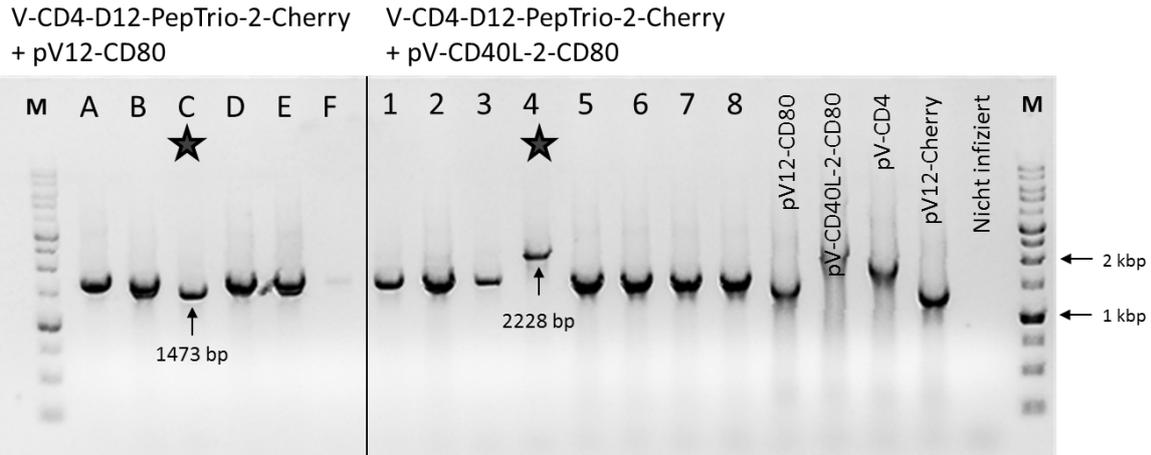


**Abbildung 3.25: Nachweis-PCRs zur genomischen Typisierung von V-CD4-D12-PepTrio-2-Cherry.** A) Mit den spezifischen Primern Del2F und Del2R2 wurde der Locus Del2 amplifiziert. Die Amplifikation der DNA von Klon #7 sowie der Plasmid-Kontrolle pD12-PepTrio-2-Cherry resultierte in einem DNA-Fragment der Länge 1620 bp. Das DNA-Fragment in der negativen Kontrolle, V-CD4 zeigte eine Größe von 388 bp. 1 % Agarosegel; M = QuickLoad 1 kb DNA Ladder, NEB. B) Die Amplifikation von PepTrio mit den spezifischen Primern 123-F und VPepR resultierte in einem DNA-Fragment mit der Größe von 291 bp mit der analysierten Virus-DNA und in der positiven Plasmid-Kontrolle pD12-PepTrio-2-Cherry. 1 % Agarosegel; M = Ready-to-Use 1 kb ladder, Nippon Genetics.

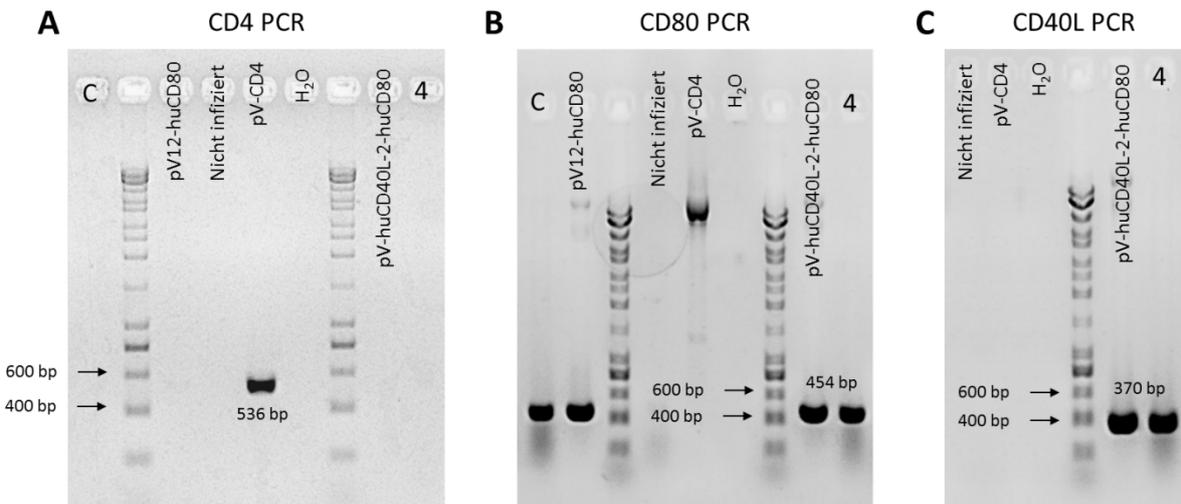
### 3.2.2.2 V12-CD80-D12-PepTrio-2-Cherry und V-CD40L-2-CD80-D12-PepTrio-2-Cherry

Für die Herstellung der Rekombinanten V12-CD80-D12-PepTrio-2-Cherry und V-CD40L-2-CD80-D12-PepTrio-2-Cherry diente V-CD4-D12-PepTrio-2-Cherry als parentales Ausgangsvirus. Durch Nukleofektion wurden die Plasmide pV12-CD80 bzw. pV-CD40L-2-CD80 in Vero-Zellen transferiert, die mit V-CD4-D12-PepTrio-2-Cherry infiziert waren. Über homologe Rekombination erfolgte in einem geringen Anteil der Orf-Viren der Austausch von CD4 gegen CD80 oder CD40L-CD80. Die Anreicherung der ORFV-Rekombinanten erfolgte mittels MACS-basierter Selektion. Für die FACS-basierte Selektion wurden die Vero-Zell-Lysate mit einem Antikörper spezifisch für CD80 gefärbt. Dies ermöglichte die Detektion sowie Selektion mittels Durchflusszytometrie. Über limitierende Verdünnung entstanden einzelne Virusplaques, die anschließend mit Hilfe von PCR auf ihre genomische Homogenität untersucht wurden. Durch Amplifikation des *vegf*-Lokus mit spezifischen Primern (374 und pdV-R) wurden die Virusklone auf die erfolgreiche und korrekte Integration der Transgene und die Abwesenheit des Selektionsmarker-Gens untersucht. Die Amplifikation des *vegf*-Lokus mit integriertem CD4-Gen ergab ein DNA-Fragment mit einer Größe von 1621 bp (Abbildung 3.26, „pV-CD4“). Dagegen wurden durch die Integration von CD80 oder CD40L-CD80 DNA-Fragmente mit den Größen 1473 bp (Abbildung 3.26, „pV12-CD80“) bzw. 2228 bp (Abbildung 3.26, „pV-CD40L-2-CD80“) amplifiziert. Wie in Abbildung 3.26 zu sehen ist, zeigte Virusklon C ein Fragment mit einer Größe von ca. 1500 bp, was auf die Integration von CD80 hinweist, die Amplifikation der DNA von Virusklon 4 resultierte in einem DNA-Fragment mit einer Größe von ca. 2200 bp, was der Größe des CD40L-CD80 DNA-Fragments entspricht (Abbildung 3.26, Rekombinante „C“ und „4“). Durch die Amplifikation der Transgene mit spezifischen Primern wurde anschließend die Anwesenheit von CD40L und CD80 sowie die Abwesenheit des parentalen Transgens CD4 in den beiden ausgewählten Virusklonen C und 4 verifiziert. Die Amplifikation des 454 bp großen DNA-Fragments mit CD80-spezifischen Primern bewies die erfolgreiche Integration von CD80 in beiden Virusklonen (Abbildung 3.27 B, Rekombinante „C“ und „4“). Die PCR mit CD4 spezifischen Primern amplifizierte lediglich in der positiven Kontrolle ein DNA-Fragment mit der erwarteten Größe von 536 bp (Abbildung 3.27 A, „pV-CD4“). Auch die PCR mit CD40L-spezifischen Primern amplifizierte im Virusklon 4 der Rekombinante V-CD40L-2-CD80-D12-PepTrio-2-Cherry ein DNA-Fragment mit der erwarteten Größe von 370 bp (Abbildung 3.27 C, Rekombinante „4“). Die beiden Rekombinanten V12-CD80-D12-PepTrio-2-Cherry (kurz: CD80-PepTrio-ORFV) und V-CD40L-2-CD80-D12-PepTrio-2-Cherry (kurz: CD40L-CD80-PepTrio-ORFV) konnten somit erfolgreich hergestellt werden.

## Ergebnisse



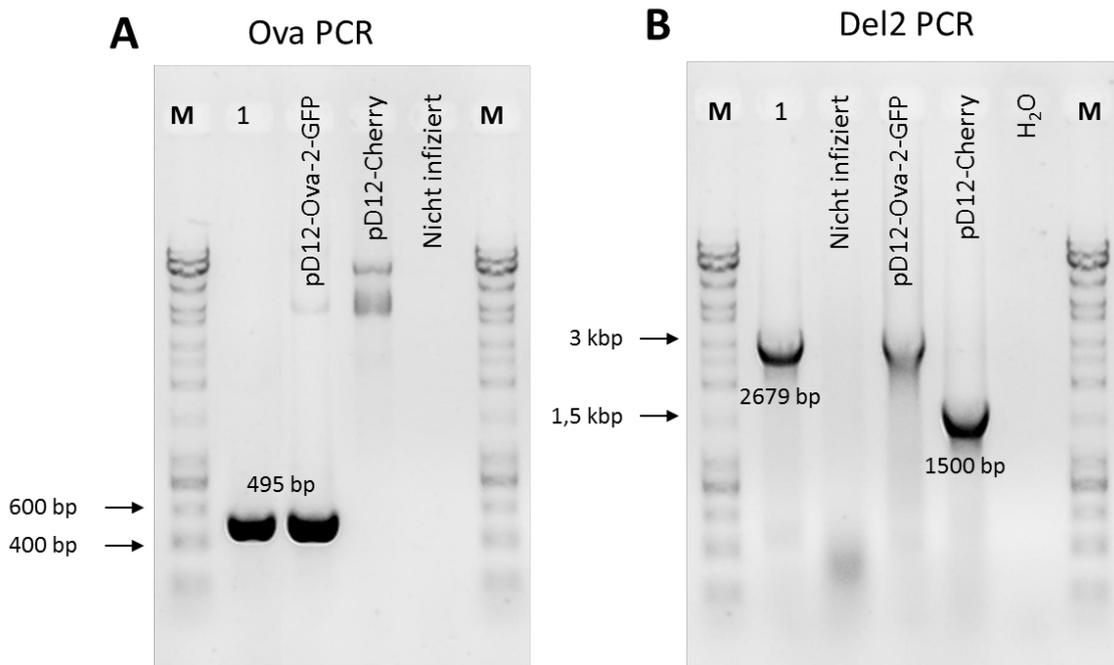
**Abbildung 3.26: 374/R PCR zur Verifikation von V12-CD80-D12-PepTrio-2-Cherry und V-CD40L-2-CD80-D12-PepTrio-2-Cherry.** Mit den spezifischen Primern 374 und pdV-R wurde der *vegf*-Lokus ORFV-infizierter Vero-Zellen amplifiziert. Die Amplifikation des *vegf*-Lokus im parentalen Virus mit integriertem CD4 Gen ergab ein DNA-Fragment mit einer Größe von 1621 bp (pV-CD4). Durch die Integration von CD80 bzw. CD40L-CD80 entstanden DNA-Fragmente mit den Größen 1473 bp (C) bzw. 2228 bp (4) in jeweils einem Virusklon (★). 1 % Agarosegel; M = Ready-to-Use 1 kb ladder, Nippon Genetics.



**Abbildung 3.27: Nachweis-PCRs zur genomischen Typisierung von V12-CD80-D12-PepTrio-2-Cherry und V-CD40L-2-CD80-D12-PepTrio-2-Cherry.** A) Die Amplifikation von CD4 mit den spezifischen Primern CD4-F3 und CD4-R3 zeigte nur in der positiven Plasmid-Kontrolle pV-CD4 ein DNA-Fragment der Größe 536 bp, nicht in den Virusklonen C und 4. B) Amplifikation von CD80 mit den spezifischen Primern huCD80-Fn und huCD80-Rn resultierte in einem DNA-Fragment der Größe 454 bp in den Virusklonen C und 4 sowie in den positiven Plasmid-Kontrollen pV12-CD80 und pV-CD40L-2-CD80. C) Die PCR mit den spezifischen Primern huCD40L-F und huCD40L-R amplifizierten in Virus-infizierten Vero-Zellen und der positiven Plasmid-Kontrolle pV-CD40L-2-CD80 ein DNA-Fragment mit der Größe von 370 bp. 1 % Agarosegel; M = Hyperladder 1 kb, Bioline.

### 3.2.2.3 V-mCD40L-D12-Ova-2-GFP

Die Herstellung von V-mCD40L-D12-Ova-2-GFP erfolgte mit Hilfe des Transferplasmids pD12-Ova-2-GFP und dem parentalen Virus V-mCD40L-D12-Cherry. Durch Nukleofektion wurde das Transferplasmid in V-mCD40L-D12-Cherry-infizierte Vero-Zellen transferiert. Über homologe Rekombination erfolgte der Austausch des Gens mCherry im Lokus Del2 durch Ova und GFP. Anschließend wurde die Rekombinante über ein FACS-basiertes Selektionsverfahren vom parentalen Virus gereinigt. Nach limitierender Verdünnung wurden einzelne Virusplaques auf ihre genomische Homogenität analysiert. Hierfür wurde die DNA von Virus-infizierten Vero-Zellen isoliert. Die PCR mit spezifischen Primern für Ova bestätigte die Integration des Transgens in das virale Genom. Sowohl in der positiven Kontrolle als auch in der isolierten DNA wurde ein DNA-Fragment von 495 bp detektiert (Abbildung 3.28 A, Spur 2 und 3). Durch Amplifikation des Lokus Del2 sollte die korrekte Integration von Ova und GFP überprüft werden. Während das amplifizierte DNA-Fragment des parentalen Virus eine Größe von 1500 bp aufwies (Abbildung 3.28 B, Spur 5), wurde in der isolierten DNA ein Fragment mit der erwarteten Größe von 2679 bp nachgewiesen (Abbildung 3.28 B, Spur 2, Rekombinante „1“). Die erfolgreiche Herstellung von V-mCD40L-D12-Ova-2-GFP (kurz: mCD40L-Ova-ORFV) konnte somit bestätigt werden.



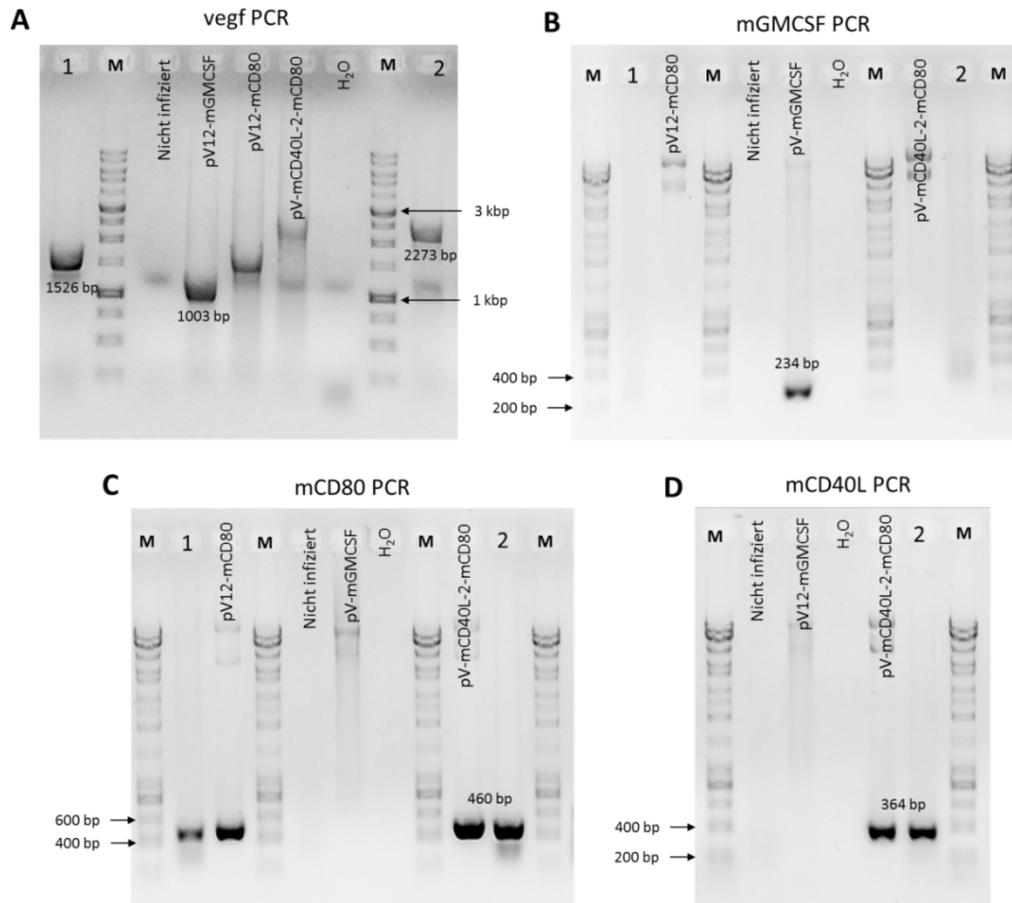
**Abbildung 3.28: Nachweis-PCRs zur genomischen Typisierung von V-mCD40L-D12-Ova-2-GFP.** A) Die Amplifikation von Ova mit den spezifischen Primern Ova-F und Ova-R resultierte in einem DNA-Fragment mit der Größe von 495 bp mit der analysierten Virus-DNA und in der positiven Plasmid-Kontrolle pD12-Ova-2-GFP. B) In einer PCR mit den spezifischen Primern Del2-F und Del2-R2 wurde der Del2-Lokus amplifiziert. Durch Integration von pD12-Ova-2-GFP konnte nach Amplifikation ein DNA-Fragment mit der Größe von 2,7 kbp detektiert werden. Die Amplifikation des Lokus Del2 mit der DNA des parentalen Virus resultierte in einem DNA-Fragment mit einer Größe von 1,5 kbp. 1 % Agarosegel; M = Hyperladder 1 kb, Bioline.

### 3.2.2.4 V12-mCD80-D12-Ova-2-GFP und V-mCD40L-2-mCD80-D12-Ova-2-GFP

Die Herstellung von V12-mCD80-D12-Ova-2-GFP und V-mCD40L-2-mCD80-D12-Ova-2-GFP erfolgte mit Hilfe der Transferplasmide pV12-mCD80 und pV-mCD40L-2-mCD80. Als parentales Virus diente V12-mGMCSF-D12-Ova-2-GFP.

Durch Nukleofektion wurden die Plasmide pV12-mCD80 und pV-mCD40L-2-mCD80 in V12-mGMCSF-D12-Ova-2-GFP-infizierte Vero-Zellen transferiert. Für die FACS-basierte Selektion wurde das Vero-Zell-Lysat nach Transfektion mit Antikörpern spezifisch für mCD80 gefärbt. Vero-Zellen, die mit den Rekombinanten infiziert waren konnten somit von Zellen, die mit dem parentalen Virus infiziert waren, im Durchflusszytometer unterschieden und selektiert werden. Die Analyse von einzelnen Virusplaques erfolgte nach limitierender Verdünnungsreihe mittels PCR. Die Amplifikation mit den Primern 374 und pdV-R diente zum Nachweis der korrekten Insertion der Transgene in den Locus *vegf* und ergab für V12-mCD80-D12-Ova-2-GFP ein DNA-Fragment mit der erwarteten Größe von 1526 bp (Abbildung 3.29 A, Spur 1, Rekombinante „1“) und für V-mCD40L-2-mCD80-D12-Ova-2-GFP ein DNA-Fragment mit der Größe von 2273 bp (Abbildung 3.29 A, Spur 9, Rekombinante „2“). Als negative Kontrolle wurde der *vegf*-Lokus des parentalen Virus pV12-mGMCSF amplifiziert. Hierbei entstand ein DNA-Fragment mit der Größe von 1003 bp (Abbildung 3.29 A, Spur 4). Durch Amplifikation der Transgene der Rekombinanten und des parentalen Virus mit spezifischen Primern für mCD80, mCD40L und mGMCSF wurde die Reinheit der Rekombinanten überprüft. Die PCR mit spezifischen Primern für mCD80 erzeugte mit der DNA beider Rekombinanten #1 und #2 ein DNA-Fragment mit der erwarteten Größe von 460 bp (Abbildung 3.29 C, Spur 2 und 10). Auch die Amplifikation von mCD40L war für die Rekombinante V-mCD40L-2-mCD80-D12-Ova-2-GFP erfolgreich (Abbildung 3.29 D, Spur 6). Das DNA-Fragment von mGMCSF mit einer Größe von 234 bp wurde dagegen nur in der positiven Plasmid-Kontrolle amplifiziert (Abbildung 3.29 B, Spur 6). Die beiden Rekombinanten V12-mCD80-D12-Ova-2-GFP (kurz: mCD80-Ova-ORFV) und V-mCD40L-2-mCD80-D12-Ova-2-GFP (kurz: mCD40L-mCD80-Ova-ORFV) wurden erfolgreich hergestellt.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.29: Nachweis-PCRs zur genomischen Typisierung von V12-mCD80-D12-Ova-2-GFP und V-mCD40L-2-mCD80-D12-Ova-2-GFP.** A) Die Amplifikation des *vegf*-Lokus im parentalen Virus mit integriertem mGMCSF ergab ein DNA-Fragment mit einer Größe von 1 kbp. Durch die Integration von CD80 bzw. CD40L-CD80 entstanden DNA-Fragmente mit den Größen 1526 bp (1) bzw. 2273 bp (2). 1 % Agarosegel; M = Ready-to-Use 1 kb ladder, Nippon Genetics. B) Die PCR mit spezifischen Primern mGMCSF-F und mGMCSF-R zur Amplifikation des parentalen Inserts resultierte mit dem positiven Kontroll-Plasmid pV12-mGMCSF in einem DNA-Fragment mit der Größe von 234 bp. C) Mit den spezifischen Primern mCD80-F und mCD80-R wurde aus der DNA beider Rekombinanten und den positiven Kontroll-Plasmiden pV12-mCD80 und pV-mCD40L-2-mCD80 ein DNA-Fragment mit der Größe von 460 bp amplifiziert. D) Die Amplifikation von mCD40L mit den spezifischen Primern mCD40L-F und mCD40L-R aus der viralen DNA von V-mCD40L-2-mCD80-D12-Ova-2-GFP resultierte in einem DNA-Fragment mit einer Größe von 364 bp. B) – D) 1 % Agarosegel; M = Hyperladder 1 kb, Bioline.

### **3.2.3 Charakterisierung CD80 und CD40L exprimierender ORFV-Rekombinanten *in vitro***

Neben den im Zuge dieser Arbeit hergestellten Rekombinanten wurden die ORFV-Rekombinante V-CD40L-D12-PepTrio-2-Cherry (kurz: CD40L-PepTrio-ORFV) charakterisiert. Für die Charakterisierung wurden zum Vergleich ORFV-Rekombinanten verwendet, die das entsprechende Antigen ohne ko-stimulatorische Moleküle exprimieren. Als Kontrolle der Rekombinanten mit humanen Transgenen diente V12-PepTrio-D12-Cherry (kurz: PepTrio-ORFV). Für die Kontrolle der Rekombinanten mit murinen Antigenen wurde V12-Ova-D12-GFP (kurz: Ova-ORFV) verwendet.

Für die Charakterisierung der Rekombinanten wurde zunächst die Expression der inserierten Transgene mittels Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz nachgewiesen. Danach erfolgte die Analyse der Aktivierung von APCs und PBMCs sowie der Einfluss der humanen Transgene CD40L und CD80 auf die Aktivierung dieser Zellen. Abschließend wurden CD40L-PepTrio-ORFV, CD80-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV auf die Fähigkeit zur Induktion Antigen-spezifischer Immunantworten *in vitro* getestet. Die Rekombinanten mit murinen Transgenen wurden an den Kooperationspartner Boehringer Ingelheim übergeben, die die *in vivo*-Maus-Versuche durchgeführt haben.

#### **3.2.3.1 Analyse der Transgen-Expression mittels Durchflusszytometrie**

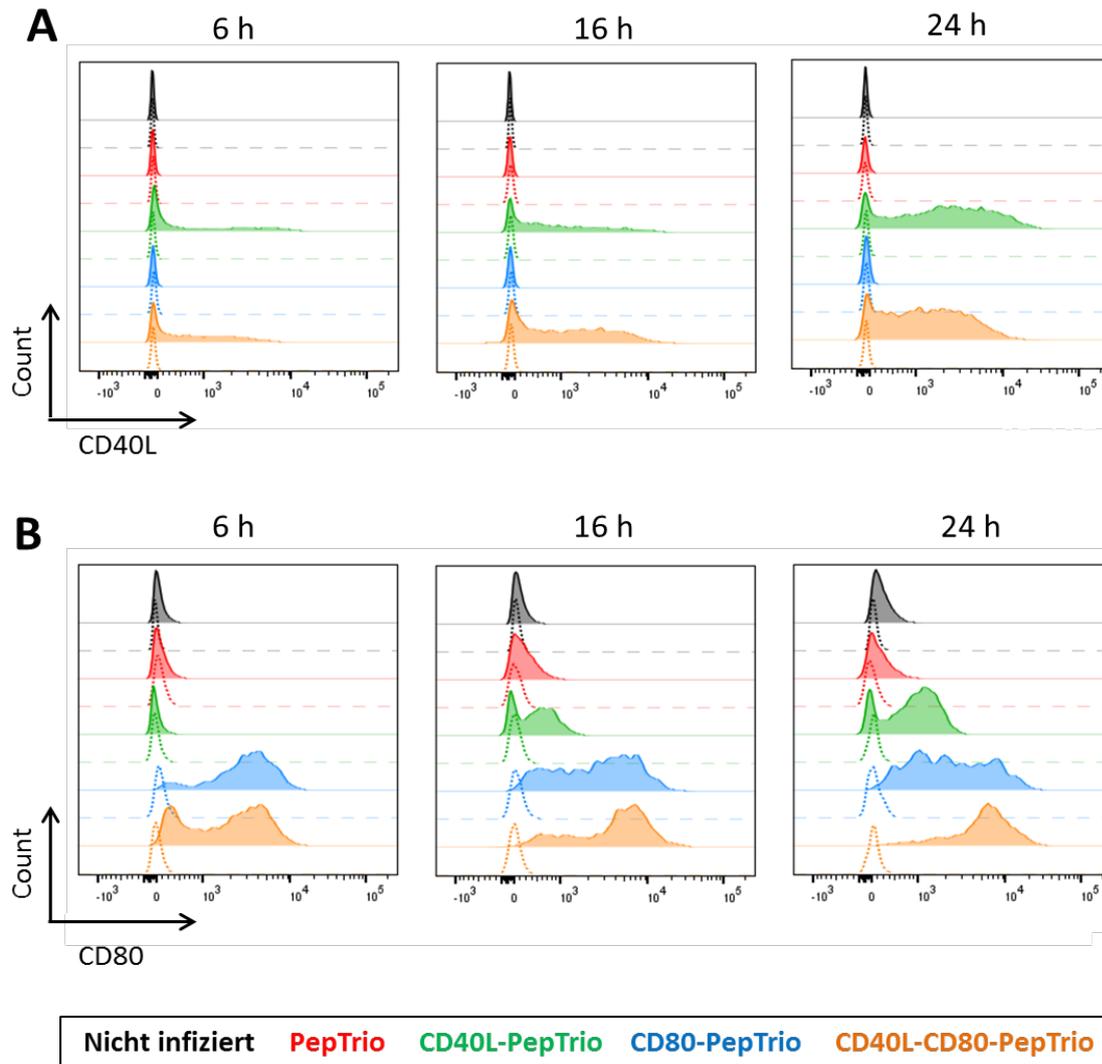
Für den Nachweis der Expression der inserierten humanen Transgene wurden DCs mit PepTrio-ORFV, CD40L-PepTrio-ORFV, CD80-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV (jeweils MOI 1.0) infiziert. Nach 6 h, 16 h und 24 h wurden die Zellen geerntet und mit Antikörpern spezifisch für die Oberflächenmarker CD40L und CD80 gefärbt. Mittels Durchflusszytometrie wurde anschließend der Anteil infizierter Zellen bestimmt und die Expression von CD40L und CD80 analysiert. Nach Infektion erfolgte die Analyse in der mCherry+ Population, bei nicht infizierten Zellen dagegen in allen Zellen.

Mit zunehmender Dauer der Infektion (von 6 h bis 24 h) nahm der Anteil infizierter Zellen von 5,5 % - 23,7 % auf 9,9 - 48,4 % zu (Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2). Nach Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV wurde die Expression von CD40L auf der Oberfläche der infizierten DCs detektiert (Abbildung 3.30 A). Der Anteil CD40L+ mCherry+ Zellen und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CD40L waren nach 24 h Infektion am Größten. Die MFI von CD40L nach Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV war im Vergleich zur MFI nach Infektion mit CD40L-CD80-PepTrio-ORFV nach 24 h um das 1,5-fache höher (Tabelle 3.1). Da CD40L natürlicherweise nicht auf DCs exprimiert wird, wurde auf nicht infizierten DCs sowie nach Infektion mit PepTrio-ORFV und CD80-PepTrio-ORFV keine Expression von CD40L nachgewiesen (Abbildung 3.30 A, Tabelle 3.1).

Die Expression von CD80 wurde sowohl auf infizierten wie auch nicht infizierten DCs detektiert. Die Infektion mit CD80-PepTrio-ORFV bzw. CD40L-CD80-PepTrio-ORFV resultierte in einer verstärkten Expression von CD80. Nach 24 h Infektion exprimierten 89,7 % bzw. 97,7 % der CD80-PepTrio-ORFV bzw. CD40L-CD80-PepTrio-ORFV infizierten DCs CD80. Die Fluoreszenzintensität war dabei 20-40-mal höher als auf nicht infizierten DCs. Auch die Infektion mit PepTrio-ORFV bzw. CD40L-PepTrio-ORFV erhöhte die Expression von CD80 im Vergleich zu nicht infizierten Zellen um das 3- bzw. 7-fache (Abbildung 3.30 B, Tabelle 3.2).

## Ergebnisse

Lediglich auf 5,2 % der nicht infizierten DCs wird CD80 in geringen Mengen exprimiert. Die ORFV-Infektion führt zu einer Aktivierung der DCs, was sich in der Hochregulierung von CD80 äußert. Somit aktiviert CD40L-PepTrio-ORFV die DCs im Vergleich zu PepTrio-ORFV deutlich stärker (Tabelle 3.2). Während die Expression von CD80 nach Infektion mit PepTrio-ORFV und CD40L-PepTrio-ORFV erst nach 16-24 h stark ansteigt, führt die Infektion mit den CD80 exprimierenden ORFV-Rekombinanten CD80-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV bereits 6 h nach Infektion zu einer verstärkten Expression von CD80 auf nahezu allen infizierten Zellen (Tabelle 3.2, Abbildung 3.30 B).



**Abbildung 3.30: Analyse ORFV-infizierter DCs auf Expression der humanen Transgene**. Für den Nachweis der Transgen-Expression wurden DCs mit PepTrio-ORFV (rot), CD40L-PepTrio-ORFV (grün), CD80-PepTrio-ORFV (blau) und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV (orange) infiziert (MOI 1.0). Nach 6 h, 16 h und 24 h wurden der Anteil infizierter Zellen und die Expression von CD40L und CD80 nach Färbung mit spezifischen Antikörpern über Durchflusszytometrie bestimmt. Die Expression der Transgene wurde bei nicht infizierten Zellen (schwarz) auf allen Zellen, bei infizierten Zellen in der mCherry-positiven Population betrachtet. A) Expression von CD40L auf der Oberfläche infizierter DCs. B) Expression von CD80 auf der Oberfläche infizierter DCs. Gepunktete Linie: Fluoreszenzintensität nach Färbung mit Isotypen-Kontrollen. Gefüllte Histogramme: Fluoreszenzintensität nach Färbung mit spezifischen Antikörpern. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von 3 unabhängig durchgeführten Experimenten.

## Ergebnisse

**Tabelle 3.1: Anteil CD40L exprimierender DCs und MFI von CD40L nach Infektion.** Dargestellt sind der Anteil infizierter (mCherry+) DCs, der Anteil CD40L+ DCs und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CD40L in infizierten DCs.

	% mCherry-positiv			% CD40L-positiv (von mCherry+)			MFI CD40L		
	6 h	16 h	24 h	6 h	16 h	24 h	6 h	16 h	24 h
<b>Nicht infiziert</b>	0	0,1	0,1	0	0	0	0	0	0
<b>PepTrio</b>	17,9	20,0	28,9	0	0	0	0	0	0
<b>CD40L- PepTrio</b>	23,7	27,7	36,1	50,1	66,7	84,8	742	895	1846
<b>CD80-PepTrio</b>	5,5	6,3	9,9	0,1	0,1	0,3	0	0	0
<b>CD40L-CD80- PepTrio</b>	14,4	21,7	48,8	60,6	71,0	82,0	693	1069	1214

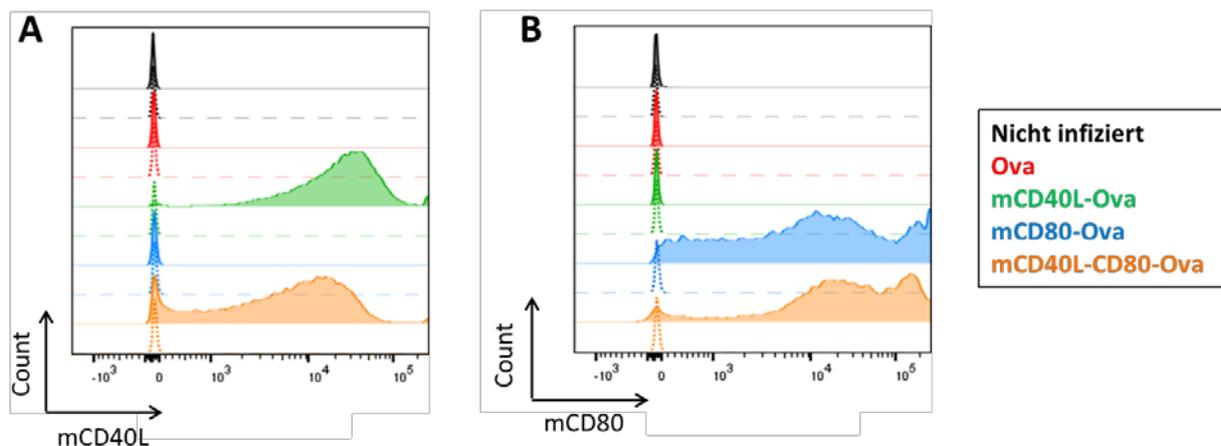
**Tabelle 3.2: Anteil CD80 exprimierender DCs und MFI von CD80 nach Infektion.** Dargestellt sind der Anteil infizierter (mCherry+) DCs, der Anteil CD80+ DCs und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CD80 in infizierten DCs.

	% mCherry-positiv			% CD80-positiv (von mCherry+)			MFI CD80		
	6 h	16 h	24 h	6 h	16 h	24 h	6 h	16 h	24 h
<b>Nicht infiziert</b>	0	0,1	0,1	0,4	1,0	5,2	60	44	128
<b>PepTrio</b>	17,9	20,0	28,9	0,8	8,7	6,0	11	138	131
<b>CD40L- PepTrio</b>	23,7	27,7	36,1	0,2	40,4	69,7	68	335	701
<b>CD80-PepTrio</b>	5,5	6,3	9,9	92,3	86,6	89,7	2551	2206	2049
<b>CD40L-CD80- PepTrio</b>	14,4	21,7	48,8	76,8	92,4	97,7	1623	3348	4738

Für den Nachweis der Expression der murinen Transgene wurden Vero-Zellen mit Ova-ORFV, CD40L-Ova-ORFV, CD80-Ova-ORFV und CD40L-CD80-Ova-ORFV infiziert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und mit Antikörpern spezifisch für mCD40L und mCD80 gefärbt. Anschließend wurde durchflusszytometrisch die Infektionsrate sowie der Anteil mCD40L+ GFP+ und mCD80+ GFP+ Zellen bestimmt und die Expressionsstärke anhand der MFI ermittelt. Nach Infektion mit allen getesteten Rekombinanten wurde ein Anteil von 31,1 – 78,7 % GFP+ Zellen detektiert (Tabelle 3.3 und Tabelle 3.4). 97,8 % der mCD40L-Ova-ORFV bzw. 87,9 % der mCD40L-mCD80-Ova-ORFV-infizierten Vero-Zellen zeigten eine starke Expression von mCD40L auf der Zelloberfläche. Sowohl Ova-ORFV- und mCD80-Ova-ORFV-infizierte Zellen als auch nicht infizierte Zellen zeigten dagegen keine Expression von mCD40L (Abbildung 3.31 A, Tabelle 3.3).

## Ergebnisse

Die Expressionsstärke von mCD40L war nach Infektion mit mCD40L-Ova-ORFV 4-mal höher als in Zellen, die mit mCD40L-mCD80-Ova-ORFV infiziert wurden. Allerdings wurden mit mCD40L-Ova-ORFV auch deutlich mehr Vero-Zellen infiziert (Tabelle 3.3). Die Infektion mit mCD80-Ova-ORFV und mCD40L-mCD80-Ova-ORFV resultierte in einer mCD80-Expression in 86,7 % bzw. 91,7 % der infizierten Zellen. Die Expression von mCD80 war nach Infektion mit mCD40L-mCD80-Ova-ORFV 2-mal stärker als nach Infektion mit mCD80-Ova-ORFV. Auch hier könnte die stärkere Expression über einen größeren Anteil infizierter Zellen erklärt werden (Tabelle 3.4). Keine mCD80-Expression war nach Infektion mit Ova-ORFV und CD40L-Ova-ORFV zu erkennen. Auch auf nicht infizierten Zellen wurde wie erwartet keine mCD80-Expression detektiert (Abbildung 3.31 B, Tabelle 3.4).



**Abbildung 3.31: Analyse ORFV-infizierter Vero-Zellen auf Expression der murinen Transgene.** Für den Nachweis der Transgen-Expression wurden Vero-Zellen mit Ova-ORFV (rot), mCD40L-Ova-ORFV (grün), mCD80-Ova-ORFV (blau) und mCD40L-mCD80-Ova-ORFV (orange) infiziert. Nach 24 h wurden der Anteil infizierter Zellen und die Expression von mCD40L und mCD80 nach Färbung mit spezifischen Antikörpern über Durchflusszytometrie bestimmt. Die Expression der Transgene wurde bei nicht infizierten Zellen (schwarz) in der GFP-negativen Population, bei infizierten Zellen in der GFP-positiven Population betrachtet. A) Expression von mCD40L auf der Oberfläche infizierter Vero-Zellen. B) Expression von mCD80 auf der Oberfläche infizierter Vero-Zellen. Gepunktete Linie: Fluoreszenzintensität nach Färbung mit Isotypen-Kontrollen. Gefüllte Histogramme: Fluoreszenzintensität nach Färbung mit spezifischen Antikörpern. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von 2 unabhängig durchgeführten Experimenten.

## Ergebnisse

**Tabelle 3.3: Anteil mCD40L exprimierender Vero-Zellen und MFI von mCD40L nach Infektion.** Dargestellt sind der Anteil infizierter (GFP+) Vero-Zellen, der Anteil mCD40L+ Vero-Zellen und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von mCD40L in infizierten Vero-Zellen.

	<b>% GFP-positiv</b>	<b>% CD40L-positiv (von GFP+)</b>	<b>MFI CD40L</b>
<b>Nicht infiziert</b>	0,1	0,5	13
<b>Ova-GFP</b>	69,9	2,3	63
<b>CD40L-Ova</b>	78,7	97,8	19418
<b>CD80-Ova</b>	31,1	1,8	30
<b>CD40L-CD80-Ova</b>	41,9	87,9	4699

**Tabelle 3.4: Anteil mCD80 exprimierender Vero-Zellen und MFI von mCD80 nach Infektion.** Dargestellt sind der Anteil infizierter (GFP+) Vero-Zellen, der Anteil mCD80+ Vero-Zellen und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von mCD80 in infizierten Vero-Zellen.

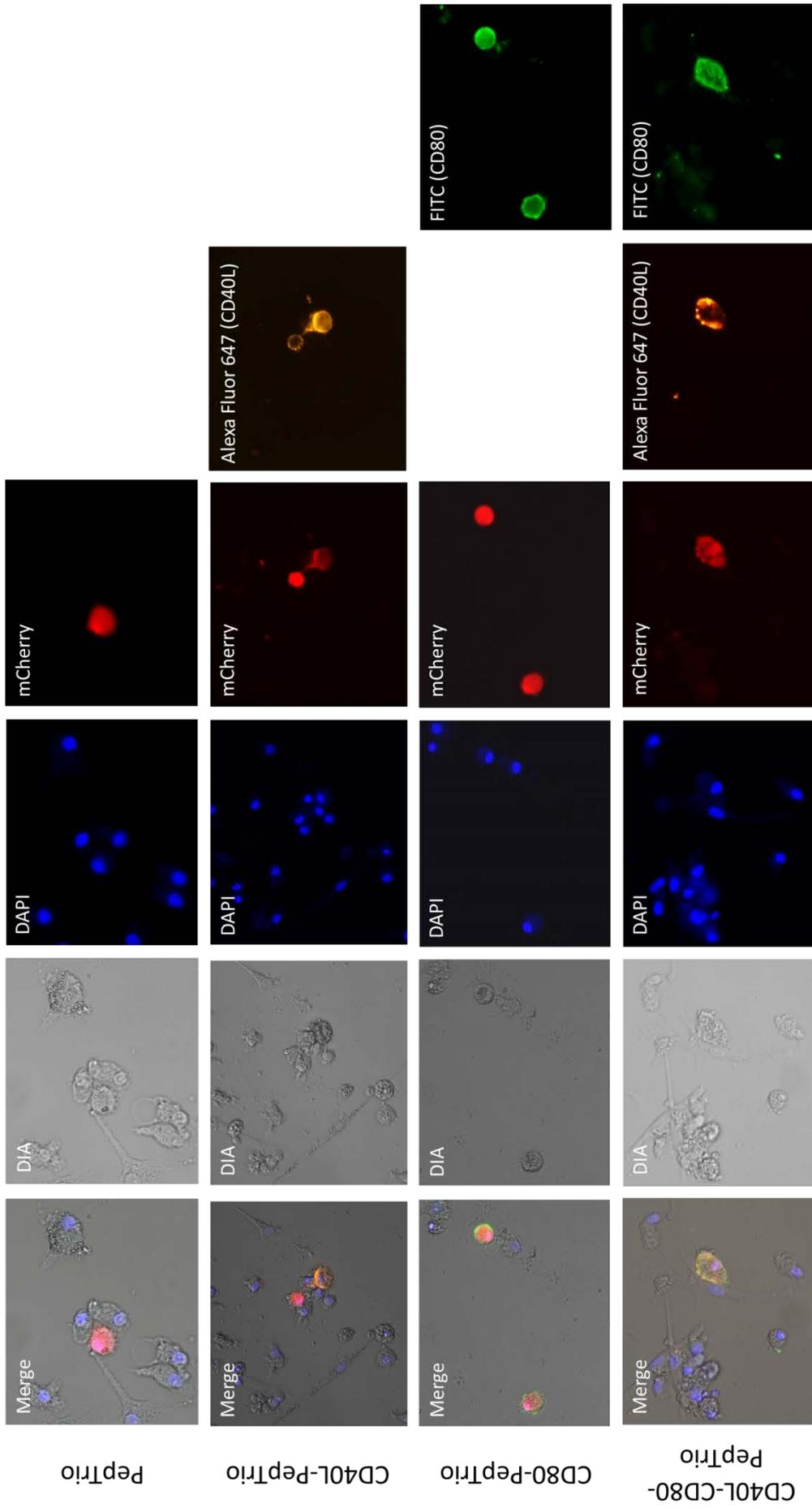
	<b>% GFP-positiv</b>	<b>% CD80-positiv (von GFP+)</b>	<b>MFI CD80</b>
<b>Nicht infiziert</b>	0,1	0,4	20
<b>Ova-GFP</b>	69,9	0	2
<b>CD40L-Ova</b>	78,7	0,3	10
<b>CD80-Ova</b>	31,1	86,7	8547
<b>CD40L-CD80-Ova</b>	41,9	91,7	19672

### **3.2.3.2 Analyse der Transgen-Expression mittels Immunfluoreszenz**

Die Immunfluoreszenzaufnahmen zur Analyse der Expression der humanen Transgene wurden in humanen DCs durchgeführt. Die Zellen wurden hierfür mit PepTrio-ORFV, CD40L-PepTrio-ORFV, CD80-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV infiziert (MOI 0.5). Nach 24 h wurden die Zellen mit Antikörpern spezifisch für CD40L und CD80 gefärbt. Zur Visualisierung des Zellkerns wurde die darin enthaltene DNA mit NucBlue gefärbt.

Nach Infektion der DCs mit allen getesteten Rekombinanten wurde die mCherry-Expression in infizierten Zellen detektiert. Die Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV führte zusätzlich zu einer Expression von CD40L auf der Oberfläche infizierter Zellen und bestätigte somit die Ergebnisse der Durchflusszytometrie. Nach Infektion mit PepTrio-ORFV und CD80-PepTrio-ORFV konnte dagegen keine Expression von CD40L festgestellt werden. Das Expressionsmuster von CD40L erschien auf den meisten Zellen sehr punktuell und auf bestimmte Bereiche auf der Zelloberfläche beschränkt, wie es exemplarisch in Abbildung 3.32 nach Infektion mit CD40L-CD80-PepTrio-ORFV zu sehen ist. Des Weiteren wurde nach Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV die CD40L-Expression in der Verbindung zweier infizierter DCs gezeigt, wobei CD40L sehr stark auf der Seite der Zelle exprimiert wird, die der zweiten Zelle zugewandt ist (Abbildung 3.32). Die Expression von CD80 konnte mittels Immunfluoreszenz nur nach Infektion mit CD80-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV nachgewiesen werden. Nach Infektion mit PepTrio-ORFV und CD40L-PepTrio-ORFV wurde mittels Durchflusszytometrie zwar eine verstärkte CD80-Expression gemessen, diese war in der Immunfluoreszenz jedoch nicht sichtbar. Die Expression von CD80 ist auf den CD80-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV infizierten DCs homogen auf der Zelloberfläche verteilt und äußert sich in einer Ring-ähnlichen Struktur um die Zelle (Abbildung 3.32). Die Expression von CD40L und CD80 an der Oberfläche von ORFV infizierten DCs wurde somit erfolgreich mittels Immunfluoreszenz bestätigt.

## Ergebnisse



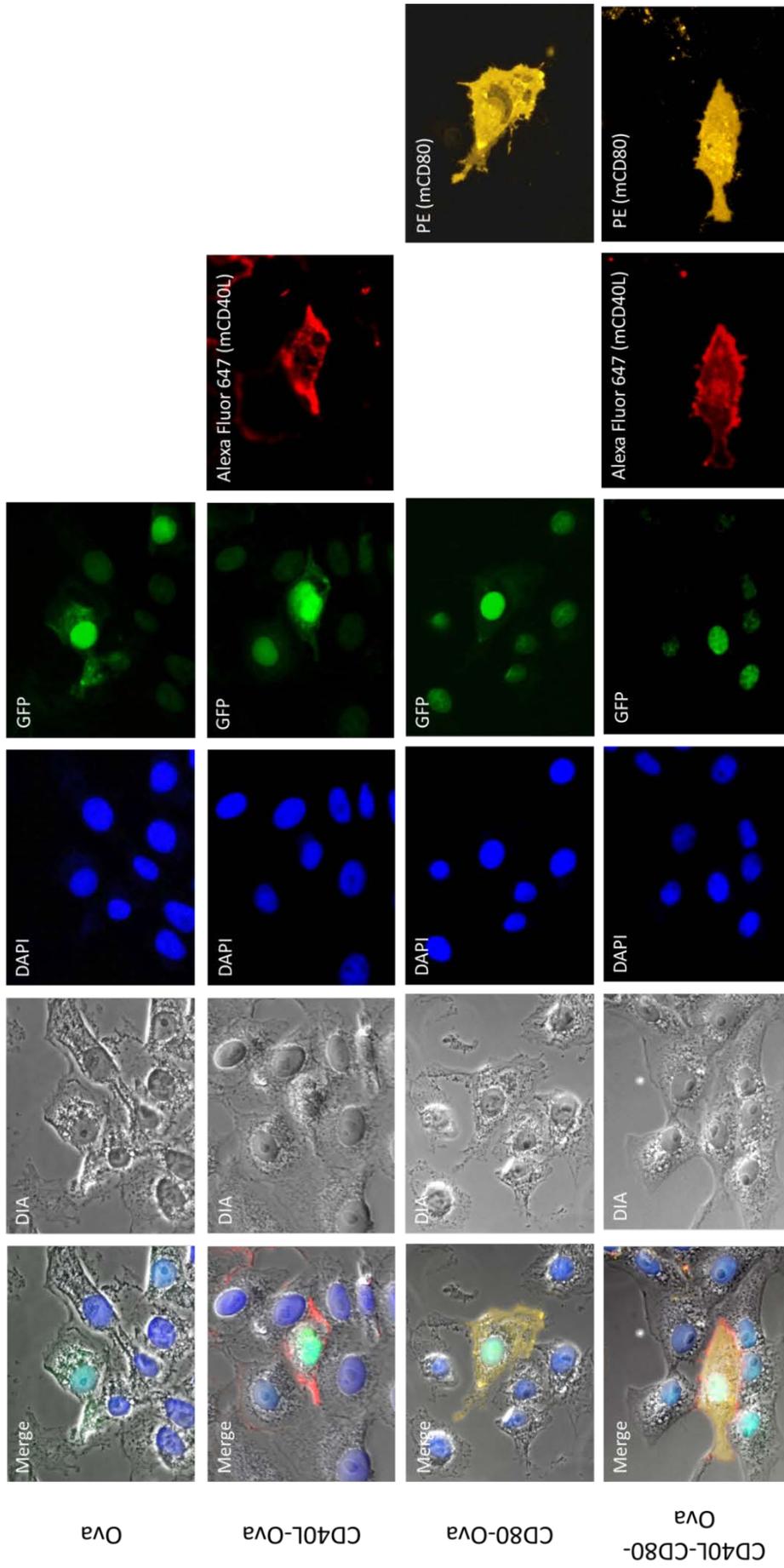
**Abbildung 3.32: Analyse der Expression humaner Transgene auf infizierten DCs mittels Immunfluoreszenz.** Für den Nachweis der Transgen-Expression wurden DCs mit PepTrio-ORFV, CD40L-PepTrio-ORFV, CD80-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV infiziert (MOI 0.5). Nach 24 h wurden die Zellen mit spezifischen Antikörpern für CD40L und CD80 gefärbt. Der Nukleus wurde durch Färbung der DNA mit DAPI (NucBlue) sichtbar gemacht. Infizierte DCs wurden über die Expression von mCherry detektiert. Dargestellt sind die einzelnen Fluoreszenz-Aufnahmen, eine Aufnahme mit Phasenkontrast (DIA) und die überlappende Aufnahme (merged).

## Ergebnisse

Für den Nachweis der Expression der murinen Transgene mittels Immunfluoreszenz wurden Vero-Zellen mit Ova-ORFV, mCD40L-Ova-ORFV, mCD80-Ova-ORFV und mCD40L-mCD80-Ova-ORFV (MOI 0.2) infiziert. Nach 24 h wurden die adhärennten Zellen mit Antikörpern spezifisch für mCD40L und mCD80 gefärbt. Die Färbung der DNA mittels NucBlue diente der Visualisierung des Zellkerns.

Nach Infektion mit allen getesteten Rekombinanten wurde die GFP-Expression in den infizierten Zellen detektiert. Anhand der umliegenden nicht infizierten Vero-Zellen ist zu erkennen, dass das NucBlue-Signal der Zellkern-Färbung in den GFP-Kanal streut. Daher scheint die GFP-Expression hauptsächlich im Zellkern zu sein. Nach Infektion mit mCD40L-Ova-ORFV und mCD40L-mCD80-Ova-ORFV wurde eine starke mCD40L-Expression auf der Oberfläche infizierter Vero-Zellen detektiert. Wie nach Infektion mit mCD40L-Ova-ORFV exemplarisch zu sehen, wird mCD40L auf der Zelloberfläche ungleichmäßig stark exprimiert. Die Infektion mit Ova-ORFV und mCD80-Ova-ORFV resultierte in keiner mCD40L-Expression auf Vero-Zellen. Die Färbung mit einem spezifischen Antikörper konnte die starke Expression von mCD80 auf der Zelloberfläche von mCD80-Ova-ORFV- und mCD40L-mCD80-Ova-ORFV-infizierten Vero-Zellen demonstrieren. Wie schon zuvor mit CD80 auf DCs gesehen, ist auch die mCD80-Expression auf Vero-Zellen im Vergleich zur mCD40L-Expression homogen über die Zelloberfläche verteilt (Abbildung 3.33). Auch die Expression von mCD40L und mCD80 auf der Oberfläche infizierter Zellen wurde mittels Immunfluoreszenzaufnahmen erfolgreich bestätigt.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.33: Analyse der Expression der murinen Transgene auf infizierten Vero-Zellen mittels Immunfluoreszenz.** Für den Nachweis der Transgen-Expression wurden Vero-Zellen mit Ova-ORFV, mCD40L-Ova-ORFV, mCD80-Ova-ORFV und mCD40L-mCD80-Ova-ORFV infiziert (MOI 0.2). Nach 24 h wurden die Zellen mit spezifischen Antikörpern für mCD40L und mCD80 gefärbt. Der Nukleus wurde durch Färbung der DNA mit DAPI (NucBlue) sichtbar gemacht. Infizierte Vero-Zellen wurden über die Expression von GFP detektiert. Dargestellt sind die einzelnen Fluoreszenz-Aufnahmen, eine Aufnahme mit Phasenkontrast (DIA) und die überlappende Aufnahme (merged).

### 3.2.3.3 Analyse der Aktivierung von humanen DCs durch ORFV-Infektion

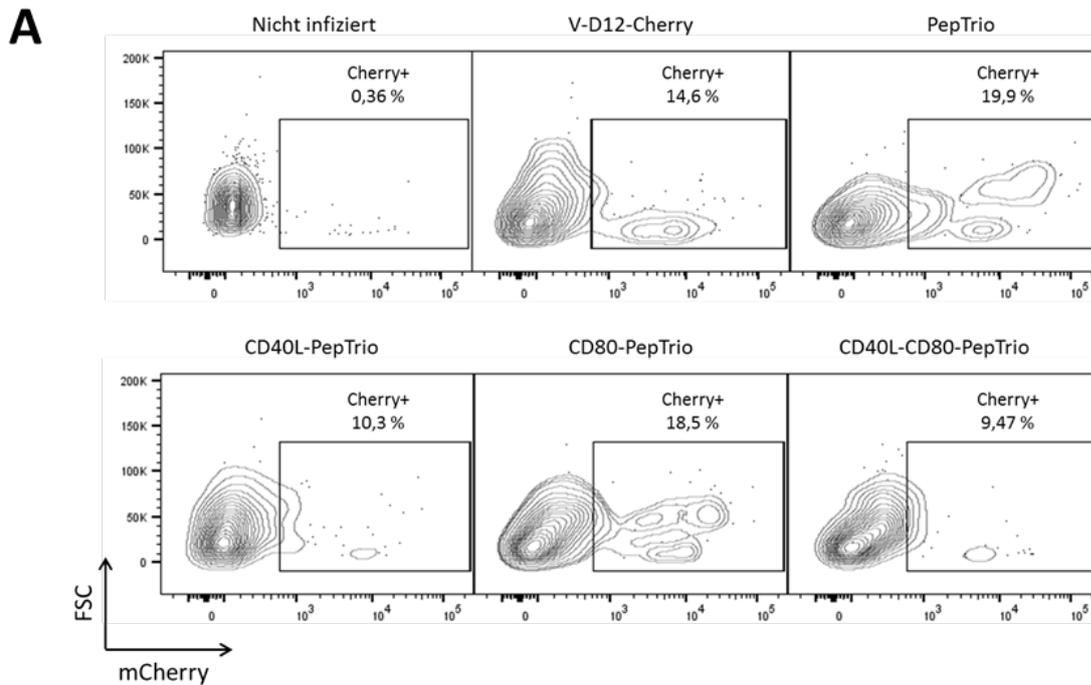
Im Folgenden sollte analysiert werden, ob durch die zusätzliche Expression von CD40L und CD80 in den neu hergestellten Rekombinanten verstärkte Immunantworten induziert werden. Hierfür wurde im ersten Schritt die Aktivierung von APCs durch Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV, CD80-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV im Vergleich zur Aktivierung durch Infektion mit PepTrio-ORFV betrachtet. Da die bisher gezeigten Experimente zur Expression der Aktivierungsmarker auf APCs lediglich mit V-D12-Cherry durchgeführt wurden, diente diese Rekombinante als Referenz in den weiteren Experimenten.

DCs wurden mit V-D12-Cherry, PepTrio-ORFV, CD40L-PepTrio-ORFV, CD80-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV infiziert. Als negative Kontrolle dienten nicht infizierte Zellen. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und mit Antikörpern spezifisch für die Aktivierungsmarker CD80, CD83, CD86, CD40 und HLA-DR gefärbt. Die Analyse der Expression der Aktivierungsmarker erfolgte bei infizierten Zellen in der mCherry+ Population, bei nicht infizierten Zellen in der mCherry- Population. Wie im ersten Teil der Dissertation dargestellt, hat der Anteil infizierter Zellen Auswirkungen auf die Expressionsstärke der analysierten Aktivierungsmarker. Daher wurden DCs mit unterschiedlichen Mengen der verschiedenen Rekombinanten infiziert. Analysiert wurden die Werte, die eine vergleichbare Infektionsrate aufwiesen.

Die ausführliche Analyse ist exemplarisch für einen Spender in Abbildung 3.34 dargestellt. Der Anteil infizierter Zellen betrug nach Infektion mit den unterschiedlichen Rekombinanten 9,5 % bis 19,9 % (Tabelle 3.5, Abbildung 3.34 A). Die Expression der analysierten Aktivierungsmarker nach Infektion mit V-D12-Cherry war im Vergleich zu nicht infizierten Zellen um das 1,5 bis 4 fache erhöht und bestätigte die Ergebnisse aus vorangegangenen Untersuchungen (siehe Abbildung 3.7 und Abbildung 3.8). Die zusätzliche Expression des Antigens in PepTrio-ORFV hatte nur geringfügigen Einfluss auf die Expression dieser Marker: Während die Expressionsstärke von CD80, HLA-DR und CD40 nach Infektion mit PepTrio-ORFV oder V-D12-Cherry vergleichbar hoch ist (Tabelle 3.5, Abbildung 3.34 B, E und F), ist die Expression von CD83 nach Infektion mit PepTrio-ORFV leicht verringert (Tabelle 3.5, Abbildung 3.34 C). Die Expression von CD86 war hingegen fast zweimal so hoch wie nach V-D12-Cherry Infektion (Tabelle 3.5, Abbildung 3.34 D). Die zusätzliche Expression von CD40L nach Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV führte im Vergleich mit V-D12-Cherry oder PepTrio-ORFV zu einer 1,2-fachen bis 1,6-fach stärkeren Expression von CD80, HLA-DR und CD40 (Tabelle 3.5, Abbildung 3.34 B, E und F). Der Reifungsmarker CD83 war nach Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV 2,4-mal bzw. 5-mal stärker exprimiert als nach Infektion mit V-D12-Cherry bzw. PepTrio-ORFV (Tabelle 3.5, Abbildung 3.34 C). Die Expression von CD86 war durch die zusätzliche Expression von CD40L vergleichbar hoch wie nach Infektion mit PepTrio-ORFV und entsprechend fast zweimal so stark wie nach Infektion mit V-D12-Cherry (Tabelle 3.5, Abbildung 3.34 D). Die Infektion mit CD80-PepTrio-ORFV induzierte nach Infektion eine deutlich erhöhte Expression von CD80 auf der Zelloberfläche infizierter Zellen. Diese war 10-mal höher als nach Infektion mit V-D12-Cherry oder PepTrio-ORFV (Tabelle 3.5, Abbildung 3.34 B). Hingegen war die Expressionsstärke von CD83, CD86, HLA-DR und CD40 im Vergleich zu V-D12-Cherry und PepTrio-ORFV infizierten DCs teilweise sogar verringert (Tabelle 3.5, Abbildung 3.34 C, D, E und F). Die Kombination der beiden Transgene in CD40L-CD80-PepTrio-ORFV führte in infizierten DCs im Vergleich zu V-D12-Cherry und PepTrio-ORFV infizierten Zellen zu einer 12-fachen Expression von CD80 (Tabelle 3.5, Abbildung 3.34 B). CD83 wurde durch die Infektion mit

## Ergebnisse

CD40L-CD80-PepTrio-ORFV 6,3-mal bzw. 1,7-mal stärker exprimiert als nach Infektion mit PepTrio-ORFV bzw. mit V-D12-Cherry (Tabelle 3.5, Abbildung 3.34 C). Verglichen zu V-D12-Cherry-infizierten DCs wurde keine merkliche Änderung in der Expression von CD86 und CD40 detektiert (Tabelle 3.5, Abbildung 3.34 D und F), jedoch steigerte sich die Expression des MHC Klasse II-Moleküls HLA-DR um das 1,3-fache (Tabelle 3.5, Abbildung 3.34 E).





## Ergebnisse

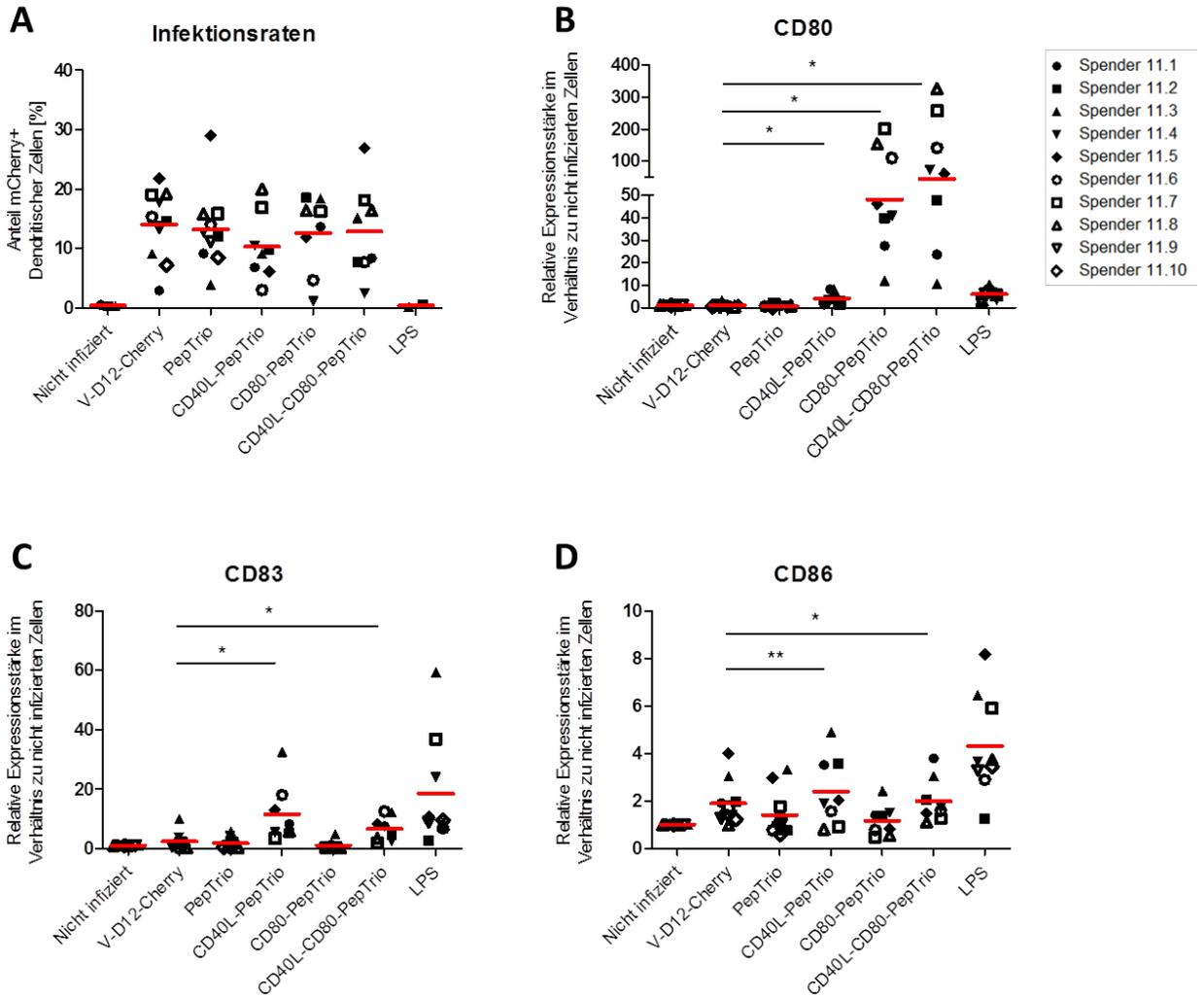
**Tabelle 3.5: Anteil infizierter DCs und MFI der Aktivierungsmarker.** Die MFI ist das geometrische Mittel der Fluoreszenzintensität der infizierten DCs.

	% mCherry+	MFI Aktivierungsmarker				
		CD80	CD83	CD86	HLA DR	CD40
<b>Nicht infiziert</b>	0,4	456	126	3619	4212	4468
<b>V-D12-Cherry</b>	14,6	1905	318	8049	8070	6431
<b>PepTrio</b>	19,9	1889	152	14615	7710	5622
<b>CD40L-PepTrio</b>	10,3	2464	766	13596	12668	7800
<b>CD80-PepTrio</b>	18,5	18894	179	5361	7726	4134
<b>CD40L-CD80-PepTrio</b>	9,5	22991	557	8418	10399	5079

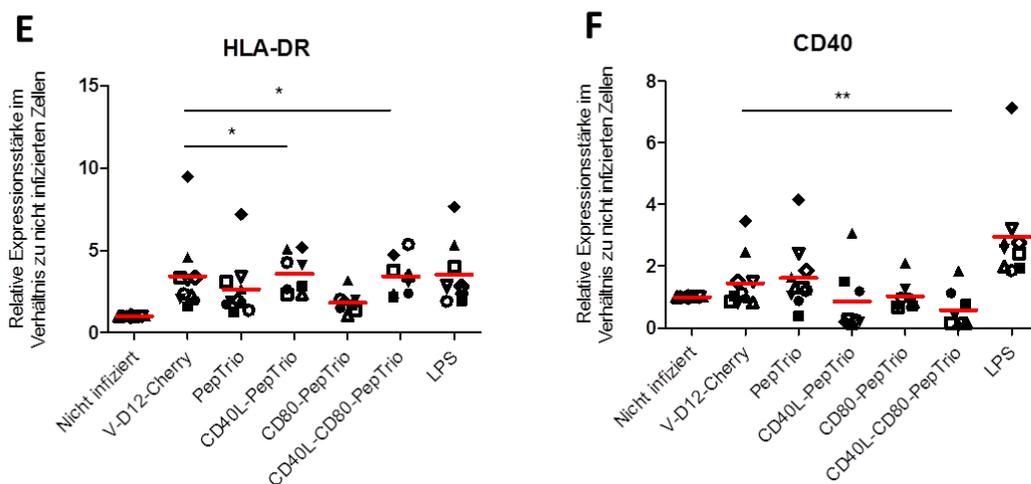
Die Zusammenfassung der Expression der Aktivierungsmarker auf infizierten DCs von 10 verschiedenen Spendern ist in Abbildung 3.35 veranschaulicht. Als positive Kontrolle wurden die DCs für 24 h mit LPS stimuliert. Die mittlere Infektionsrate nach Infektion mit den 5 verschiedenen Rekombinanten lag bei ca. 10-15 %. Eine deutliche Variation des Anteils an infizierten Zellen zwischen den verschiedenen Spendern ist zu erkennen (Abbildung 3.35 A). Die Expression der Aktivierungsmarker ist als die relative Expressionsstärke im Vergleich zu nicht infizierten Zellen dargestellt. Im Vergleich zu der Expression der Aktivierungsmarker nach Infektion mit V-D12-Cherry führte die Infektion mit PepTrio-ORFV zu keinen signifikanten Änderungen der Expressionsstärke aller analysierten Marker (Abbildung 3.35, B-F). CD80 war nach Infektion mit CD40L-PepTrio 5-mal stärker, nach Infektion mit CD80-PepTrio bzw. CD40L-CD80-PepTrio 100- bzw. 150-fach stärker exprimiert als nach Infektion mit V-D12-Cherry. Die relative Expressionsstärke von CD80 nach Infektion mit den CD80-exprimierenden Rekombinanten war weit gestreut (Abbildung 3.35 B). Der Reifungsmarker CD83 wurde nach Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV bzw. CD40L-CD80-PepTrio-ORFV 10- bzw. 7-mal stärker exprimiert als nach Infektion mit V-D12-Cherry. Keine signifikanten Änderungen in der Expression der beider Marker waren nach Infektion mit den anderen Rekombinanten zu erkennen (Abbildung 3.35 C). Die Expression von CD86 stieg nach Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV bzw. CD40L-CD80-PepTrio-ORFV im Vergleich zur Infektion mit V-D12-Cherry um das 2-fache an. Die Infektion mit CD80-PepTrio-ORFV hatte keinen Effekt auf die Expression dieses Markers (Abbildung 3.35 D). Die Expression von HLA-DR wurde durch die Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV im Vergleich zur Infektion mit V-D12-Cherry signifikant gesteigert und war 4-mal höher als auf nicht infizierten DCs (Abbildung 3.35 E). Interessanterweise führte die Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV zu einer verringerten Expression von CD40 auf der Oberfläche von infizierten DCs. Die Expression von CD40 war im Mittel geringer als auf nicht infizierten DCs. Nach Infektion mit CD80-PepTrio-ORFV war dagegen keine signifikante Änderung in der Expression von CD40 zu erkennen (Abbildung 3.35 F). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass durch die Infektion der DCs mit CD40L-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV eine gesteigerte Expression der analysierten Aktivierungsmarker induziert wird. Die DCs wurden durch Infektion mit diesen Rekombinanten im Vergleich zu V-D12-Cherry- und PepTrio-ORFV-infizierten Zellen folglich stärker aktiviert. Die Infektion mit CD80-PepTrio-ORFV resultierte in einer sehr starken Expression von CD80 auf der Oberfläche infizierter DCs, die Expression

## Ergebnisse

weiterer Aktivierungsmarker wurde jedoch nicht gesteigert. Ein Zusammenhang zwischen der Expression der Marker und dem Anteil infizierter Zellen war nicht zu erkennen.



## Ergebnisse



**Abbildung 3.35: Aktivierung von DCs 10 verschiedener Spender nach Infektion mit ORFV-Rekombinanten.** DCs wurden mit V-D12-Cherry, PepTrio-ORFV, CD40L-PepTrio-ORFV, CD80-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV infiziert und nach 24 h mit spezifischen Antikörpern für die Aktivierungsmarker gefärbt. A) Mittels Durchflusszytometrie wurde über die Expression von mCherry der Anteil infizierter DCs bestimmt. B)-F) Relative Expressionsstärke der Aktivierungsmarker CD80 (B), CD83 (C), CD86 (D), HLA-DR (E) und CD40 (F) nach Infektion mit den ORFV-Rekombinanten im Verhältnis zur Expressionsstärke auf nicht infizierten DCs. Dargestellt ist die Änderung der Expressionsstärke für jedes der 10 unabhängig durchgeführten Experimente und die berechneten Mittelwerte (rote Balken). Die statistische Analyse erfolgte durch einen gepaarten t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %: ns =  $p > 0,05$ , \* =  $p \leq 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ .

### 3.2.3.4 Analyse der Aktivierung von humanen PBMCs durch ORFV-Infektion

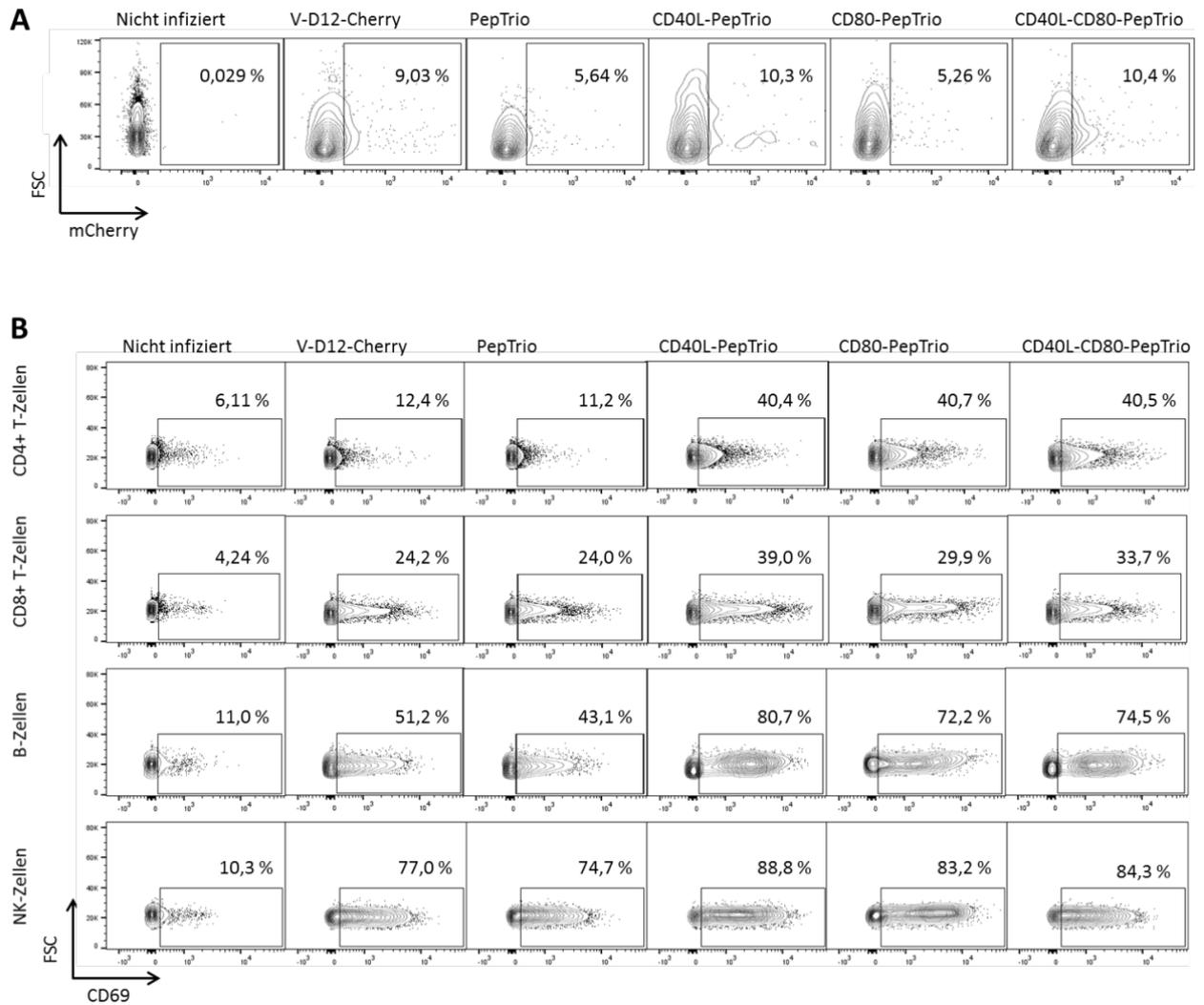
Da die Infektion mit CD40L- und CD80-exprimierenden ORFV-Rekombinanten zu einer verstärkten Aktivierung von APCs führte, wurde im nächsten Schritt analysiert, ob auch die Aktivierung der PBMCs durch die zusätzliche Expression von CD40L und/oder CD80 gesteigert werden kann. Hierfür wurden PBMCs aus dem Blut gesunder Spender isoliert und für 24 h mit den ORFV-Rekombinanten V-D12-Cherry, PepTrio-ORFV, CD40L-PepTrio-ORFV, CD80-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV infiziert. Die Infektion erfolgte mit verschiedenen Virusmengen und die PBMCs die einen vergleichbaren Anteil an infizierten Monozyten aufwiesen wurden analysiert. Hierfür wurden die Zellen nach Infektion mit Antikörpern spezifisch für die Oberflächenmarker CD4, CD8, CD14, CD19 und CD56 und den Aktivierungsmarker CD69 gefärbt. Die Infektionsrate wurde anhand der mCherry-Expression in der CD14+ Population bestimmt.

Die Analyse der CD69-Expression auf PBMCs ist exemplarisch für einen Spender in Abbildung 3.36 dargestellt. Nach Infektion lag der Anteil an infizierten Monozyten bei 5,3 - 10,4 % (Abbildung 3.36 A). Die Infektion mit V-D12-Cherry führte zu einer erhöhten Population CD69+ Zellen: Der Anteil an CD69+ CD4+ T-Zellen verdoppelte sich von 6,1 % auf 12,4 %, der Anteil an CD69+ CD8+ T-Zellen versechsfachte sich sogar von 4,2 % auf 24,2 %. Auch der Anteil CD69+ B-Zellen bzw. NK-Zellen wurde von 11% auf 51,2 % bzw. 10,3 % auf 77 % um das 5- bzw. 7-fache gesteigert (Abbildung 3.36 B). Die zusätzliche Expression des Antigens in PepTrio-ORFV hatte keine Auswirkung auf die Aktivierung der PBMCs. In allen getesteten Zellpopulationen war die CD69-Expression vergleichbar zur Expression nach Infektion mit V-D12-Cherry. Die zusätzliche Expression von CD40L und/oder CD80 führte zu einer 4-fachen Erhöhung des Anteils an CD69+

## Ergebnisse

CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf ca. 40 % (Abbildung 3.36 B). Der Anteil an CD69<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen bzw. B-Zellen wurde durch Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV im Vergleich zur Infektion mit PepTrio-ORFV von 24 % zu 39 % bzw. 34,1 % zu 80,7 % gesteigert. Nach Infektion mit CD80-PepTrio-ORFV bzw. CD40L-CD80-PepTrio-ORFV lag der Anteil an CD69<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei 29,9 % bzw. 33,7 % und der Anteil CD69<sup>+</sup> B-Zellen bei 72,2 % bzw. 74,5 % und somit etwas niedriger als nach Infektion mit CD40L (Abbildung 3.36 B). Die Infektion mit V-D12-Cherry bzw. PepTrio-ORFV führte bereits zu einer starken Aktivierung in 77 % bzw. 74,7 % aller NK-Zellen. Durch Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV, CD80-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV erhöhte sich dieser Anteil auf 88,8 %, 83,2 % bzw. 84,3 % (Abbildung 3.36 B).

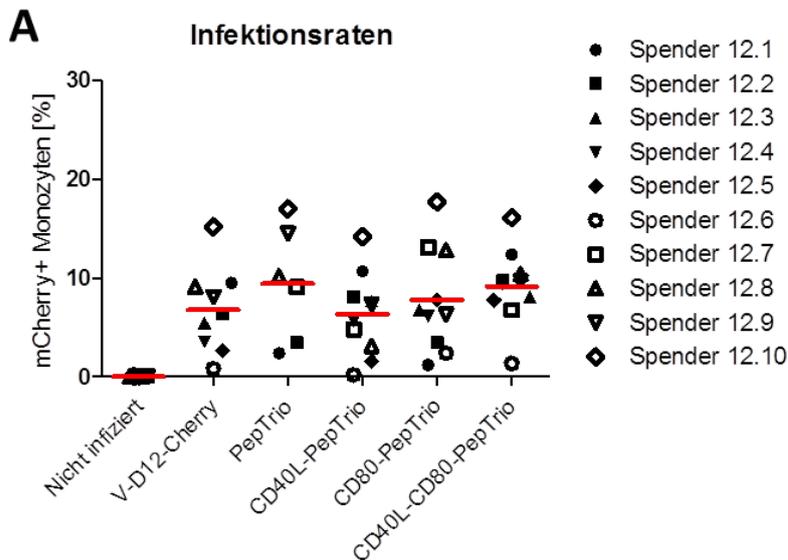
## Ergebnisse

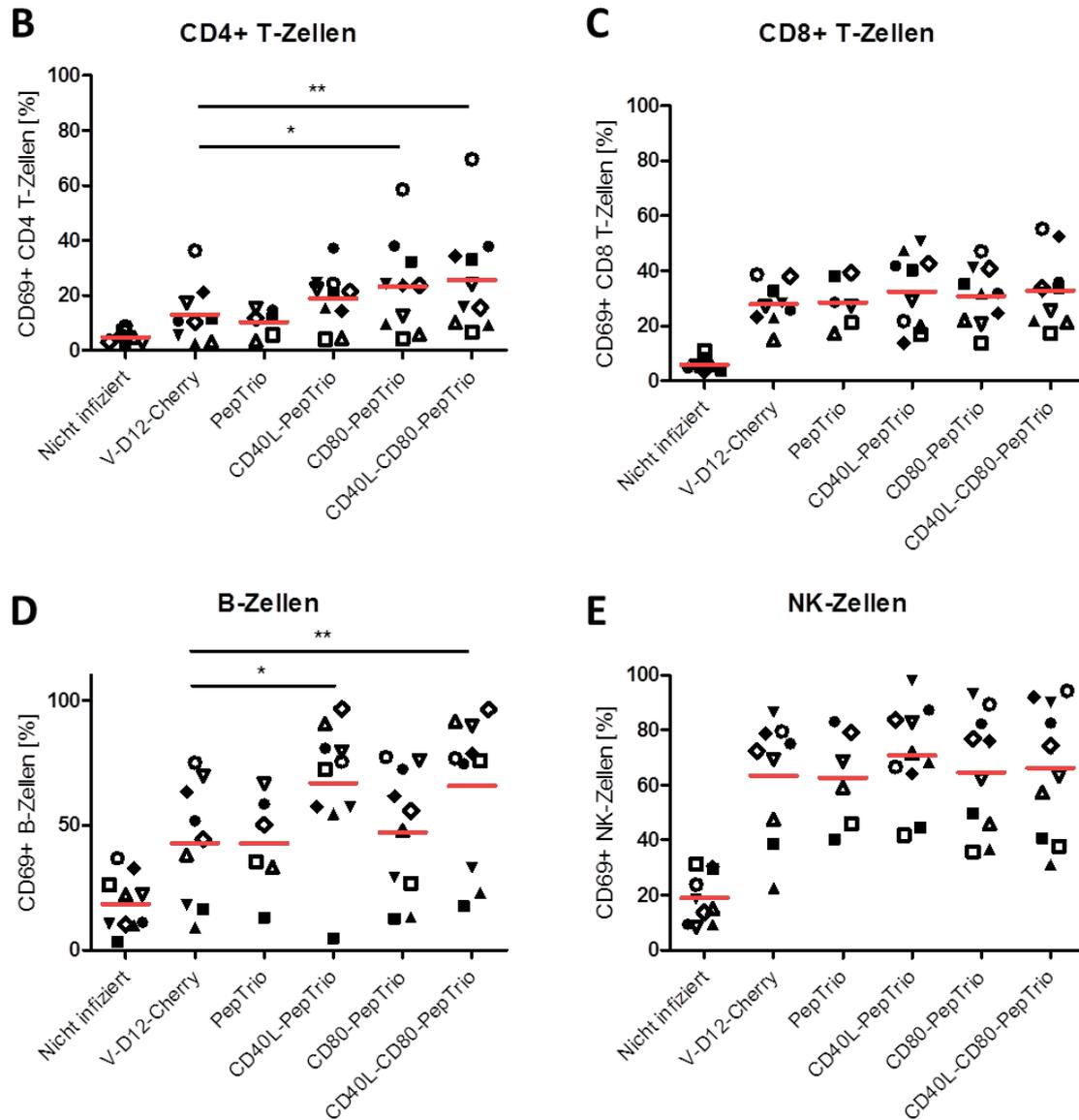


**Abbildung 3.36: Aktivierung von humanen PBMCs nach Infektion mit ORFV-Rekombinanten.** PBMCs wurden mit V-D12-Cherry, PepTrio-ORFV, CD40L-PepTrio-ORFV, CD80-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV infiziert und nach 24 h mit spezifischen Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD4, CD8, CD14, CD19 und CD56 und den frühen Aktivierungsmarker CD69 gefärbt. A) Mittels Durchflusszytometrie wurde über die Expression von mCherry der Anteil infizierter Monozyten bestimmt. B) Prozentualer Anteil CD69 exprimierender CD4+ und CD8+ T-Zellen, CD19+ B-Zellen und CD56+ NK-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von 10 unabhängigen Experimenten.

## Ergebnisse

Die Aktivierung der PBMCs nach Infektion mit den unterschiedlichen Rekombinanten wurde in weiteren 9 Spendern analysiert (Abbildung 3.37). Die mittlere Infektionsrate der Monozyten 24 h nach Infektion lag bei ca. 7 - 10 %. Im Vergleich zu V-D12-Cherry-infizierten PBMCs zeigte sich keine signifikante Änderung in der CD69-Expression auf T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen nach Infektion mit PepTrio-ORFV (Abbildung 3.37 B-E). Dagegen war nach Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV der Anteil CD69+ CD4+ T-Zellen leicht erhöht und lag im Mittel bei ca. 20 %. Nach Infektion mit CD80-PepTrio-ORFV bzw. CD40L-CD80-PepTrio-ORFV steigerte sich dieser Anteil signifikant auf ca. 22 % bzw. 25 % (Abbildung 3.37 B). Die Expression von CD69 auf B-Zellen wurde durch die zusätzliche Expression von CD40L signifikant gesteigert. Sowohl die Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV als auch mit CD40L-CD80-PepTrio-ORFV resultierte in einem erhöhten Anteil CD69+ B-Zellen von ca. 60 %. Die Infektion mit CD80-PepTrio-ORFV induzierte dagegen keine vermehrte Aktivierung der B-Zellen (Abbildung 3.37 D). Der Anteil CD69+ CD8+ T-Zellen von ca. 30 % und der CD69+ NK-Zellen von ca. 70 % wurde durch keine der getesteten Rekombinanten signifikant gesteigert (Abbildung 3.37 C und E).





**Abbildung 3.37: Aktivierung von humanen PBMCs 10 verschiedener Spender nach Infektion mit ORFV-Rekombinanten.** Aus dem Blut 10 gesunder Spender wurden PBMCs isoliert und für 24 h mit V-D12-Cherry, PepTrio-ORFV, CD40L-PepTrio-ORFV, CD80-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV infiziert. A) Anteil mCherry+ Monozyten nach Infektion. B)–E) Anteil CD69+ Zellen nach Infektion mit ORFV-Rekombinanten in jedem durchgeführten Experiment und berechnete Mittelwerte (rote Balken). Die statistische Analyse erfolgte durch den nicht-parametrischen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %: ns =  $p > 0.05$ , \* =  $p \leq 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ .

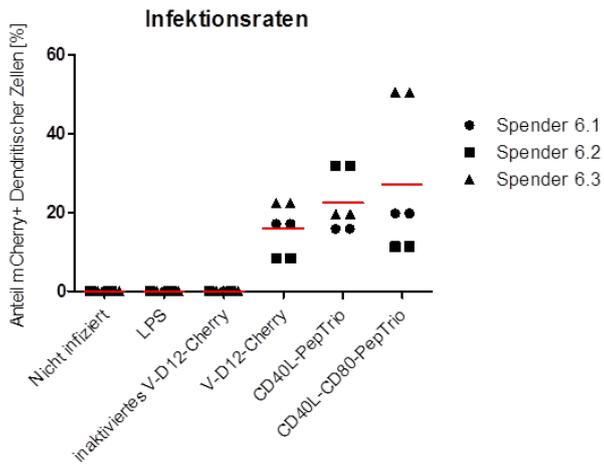
### 3.2.3.5 Analyse der Zytokinproduktion von ORFV-infizierten DCs und PBMCs

Die Analyse der CD40L exprimierenden Rekombinanten zeigte eine erhöhte Aktivierung der DCs und PBMCs. Im nächsten Schritt sollte daher analysiert werden, ob durch die zusätzliche Expression von CD40L und CD40L-CD80 auch das Zytokin-Profil von DCs und PBMCs verändert und die Zytokin-Produktion gesteigert wird. Hierfür wurden DCs und PBMCs für 4 h, 8 h, 16 h, 24 h, 48 h, und 72 h mit V-D12-Cherry, CD40L-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV infiziert. Die Infektion der DCs und PBMCs sowie die Analyse der Zytokinproduktion erfolgten analog zu Versuch 3.1.4.

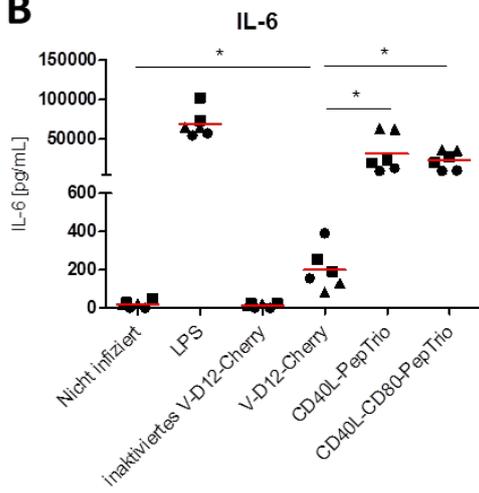
Die gemessenen Zytokine in den Zellkultur-Überständen infizierter DCs sind in den Abbildungen 3.38 und 3.39 dargestellt. Von drei Spendern sind jeweils 2 biologische Replikate dargestellt, welche sich aus 2 technischen Replikaten zusammensetzen (Abbildung 3.38). Die Infektionsrate der DCs nach 24 h Infektion mit V-D12-Cherry, CD40L-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV lag im Mittel bei ca. 20 %. Lediglich die Infektion der DCs von Spender 6.3 mit CD40L-CD80-PepTrio-ORFV resultierte nach Infektion mit der geringsten Virusmenge MOI 0.2 bereits in einer Infektionsrate von ca. 50 % (Abbildung 3.38 A). Die Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV resultierte in einer gesteigerten Produktion mehrerer Zytokine. Neben der Produktion von IL-6, das bereits in geringeren Mengen von V-D12-Cherry-infizierten DCs produziert wurde, führte die Infektion mit CD40L und CD40L-CD80 exprimierenden Rekombinanten zu einer Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-12 (Abbildung 3.38 B, C, D und E). Nach Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV bzw. CD40L-CD80-PepTrio-ORFV wurde eine IL-6-Konzentration von 30 ng/ml bzw. 40 ng/ml gemessen (Abbildung 3.38 B). TNF $\alpha$  wird nach Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV mit einer gemessenen Konzentration von 10 ng/ml in größeren Mengen produziert als nach LPS-Stimulierung (Abbildung 3.38 C). IL-1 $\beta$  und IL-12 wurden lediglich nach Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV produziert. Von beiden Zytokinen wurden nach 24 h Infektion ca. 300 pg/ml detektiert (Abbildung 3.38 D und E). Auch die Produktion von IL-10 wurde durch Infektion der DCs mit den beiden CD40L-exprimierenden Rekombinanten induziert. Nach Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV wurde eine IL-10-Konzentration von ca. 1500 pg/ml gemessen (Abbildung 3.38 F). Neben den pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen führte die Infektion der DCs zur Produktion verschiedener Chemokine. Wie in Abbildung 3.11 bereits gezeigt, wird CXCL10 von V-D12-Cherry-infizierten DCs produziert. Diese Produktion wurde durch Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV bzw. CD40L-CD80-PepTrio-ORFV signifikant auf 6000 pg/ml bzw. 3000 pg/ml gesteigert (Abbildung 3.38 G). Sowohl CXCL10 als auch IL-8 mit 20 ng/ml bzw. 30 ng/ml, CCL3 mit ca. 40 ng/ml und CCL5 mit ca. 2000 pg/ml wurden nach Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV bzw. CD40L-CD80-PepTrio-ORFV in etwa derselben Menge produziert wie nach LPS-Stimulierung (Abbildung 3.38 G, H, I und J). Auch die Produktion von CXCL9 wird im Vergleich zu V-D12-Cherry-infizierten DCs signifikant auf 50 pg/ml bzw. 100 pg/ml gesteigert (Abbildung 3.38 K). Die Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IFN $\gamma$ , IFN $\alpha$  und IL-2 sowie des anti-inflammatorischen Zytokins IL-4 konnte auch nach Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV nicht nachgewiesen werden.

# Ergebnisse

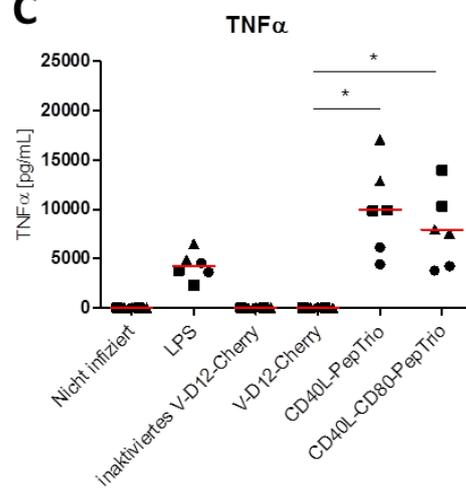
**A**



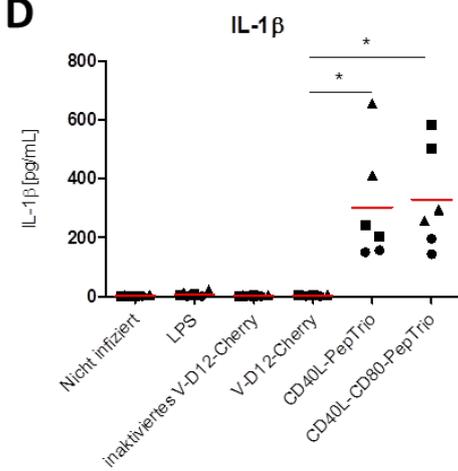
**B**



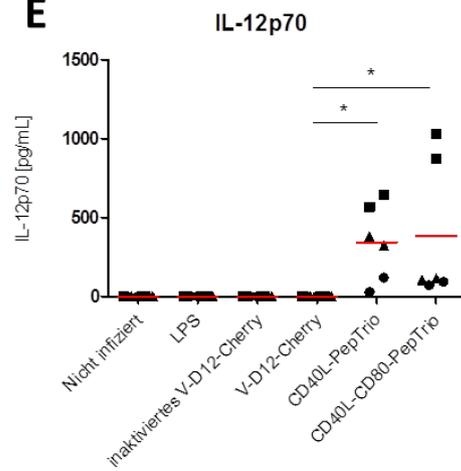
**C**



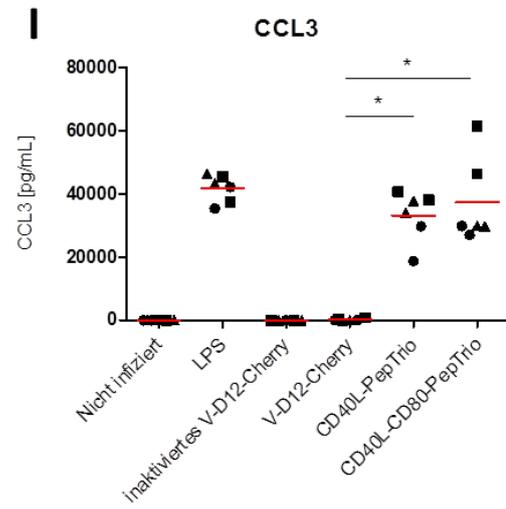
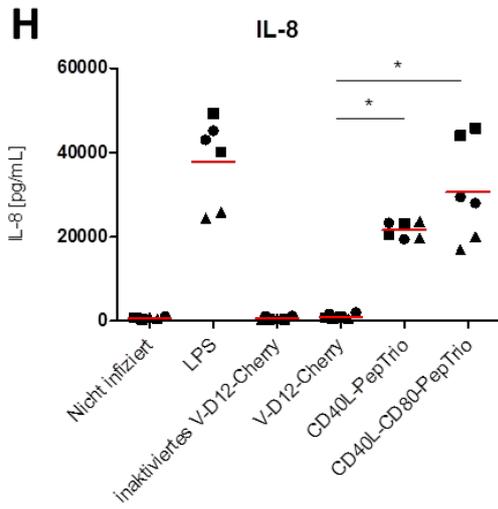
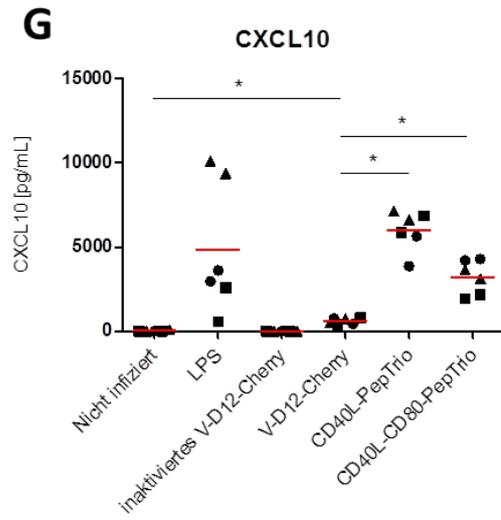
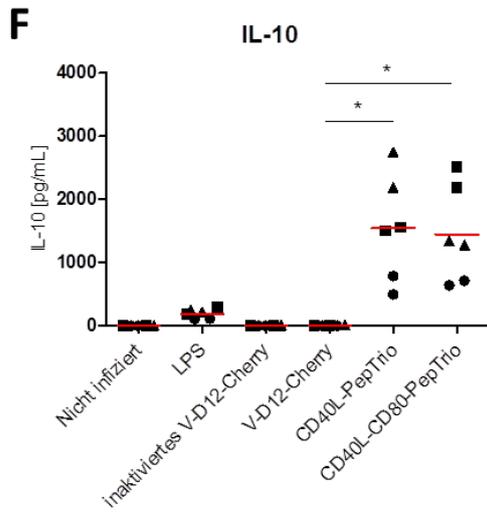
**D**



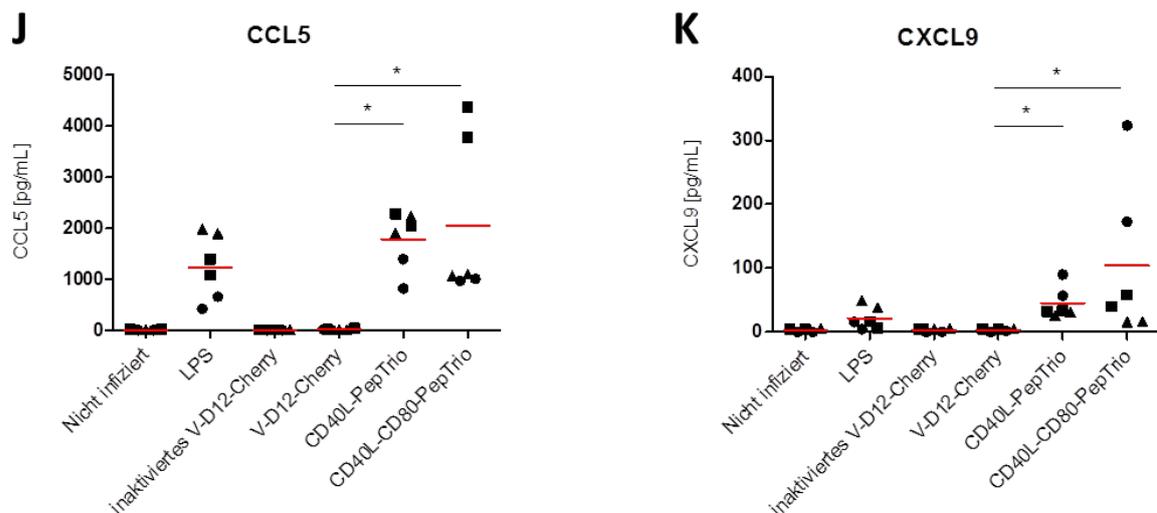
**E**



# Ergebnisse



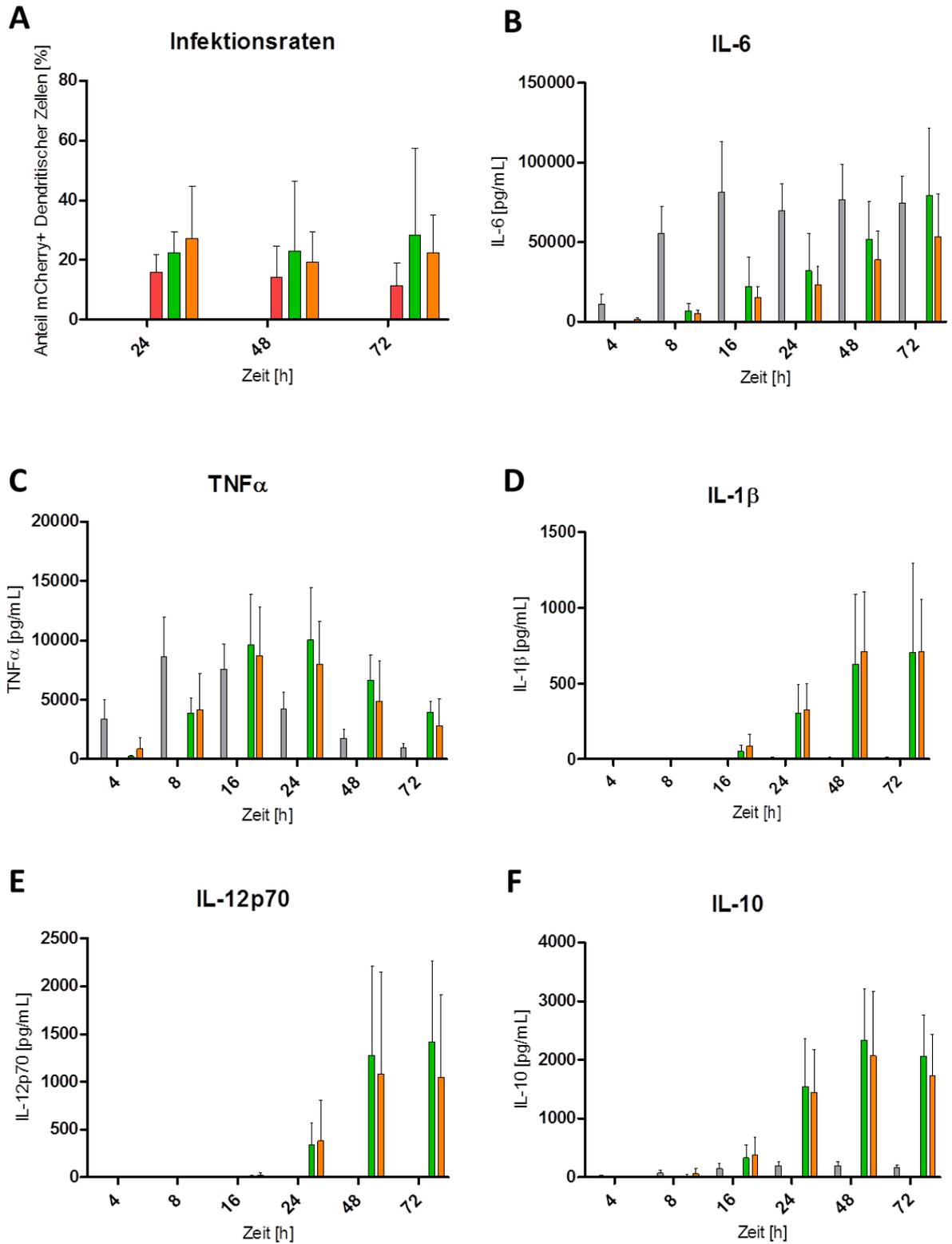
## Ergebnisse



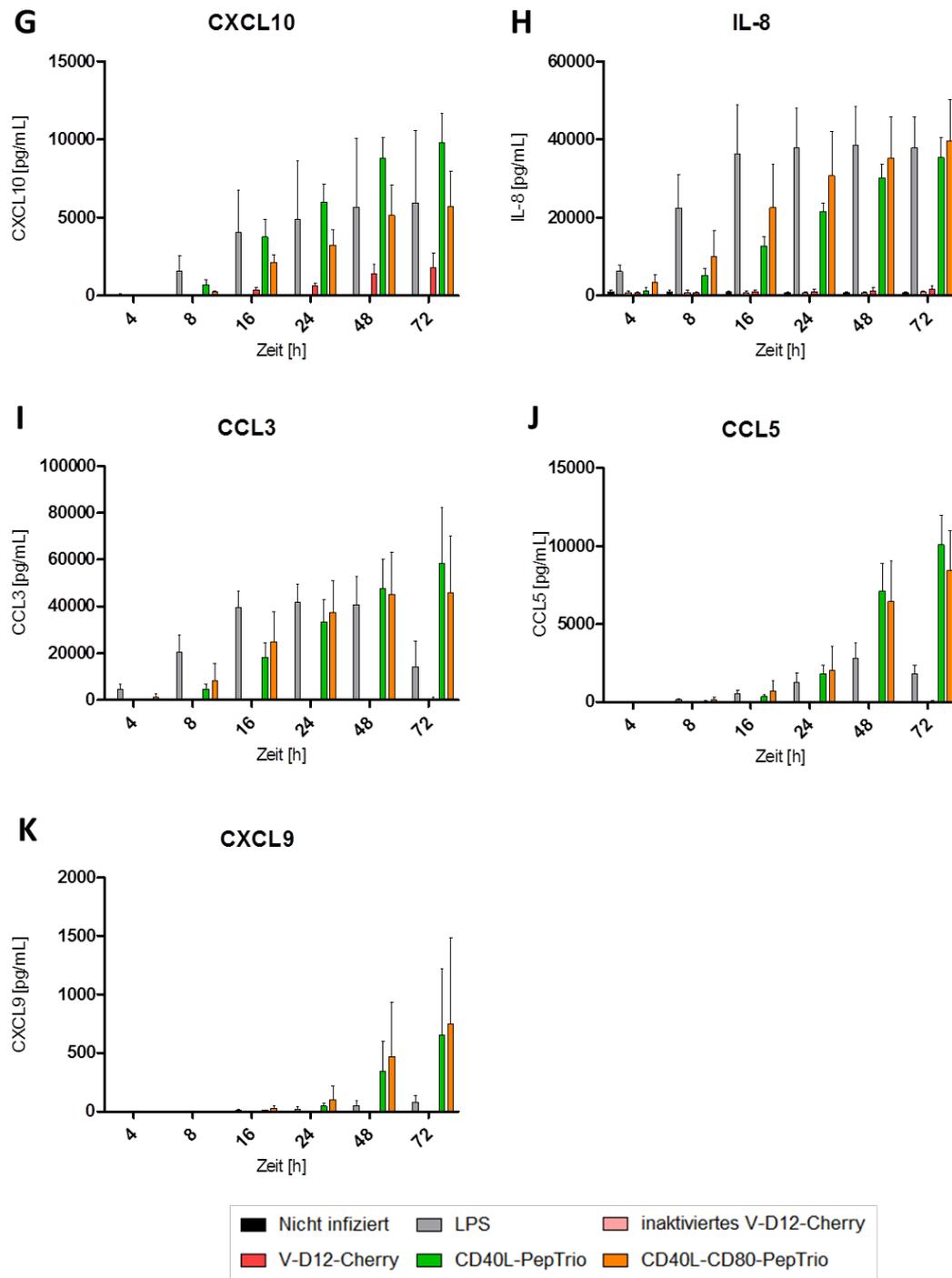
**Abbildung 3.38: Analyse der Zytokin-Produktion von DCs 24 h nach Infektion mit ORFV-Rekombinanten.** A) Anteil mCherry+ infizierter DCs. B)-K) Konzentration der gemessenen Zytokine IL-6 (B), TNF $\alpha$  (C), IL-1 $\beta$  (D), IL-12 (E), IL-10 (F), CXCL10 (G), IL-8 (H), CCL3 (I), CCL5 (J) und CXCL9 (K) in DCs nach Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV. Als Kontrolle dienen nicht infizierte, LPS-stimulierte und mit inaktiviertem V-D12-Cherry stimulierte DCs. Dargestellt sind die biologischen Replikate von 3 unabhängigen Experimenten und die berechneten Mittelwerte (rote Balken). Die statistische Analyse erfolgte durch den nicht-parametrischen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %: \* =  $p \leq 0.05$ .

Die gemessenen Zytokin-Konzentrationen nach 4 h – 72 h Infektion sind in Abbildung 3.39 dargestellt. Die Infektionsrate der DCs bleibt im Mittel konstant bei ca. 20 % (Abbildung 3.39 A). Nach 4 h Infektion konnte die Produktion von TNF $\alpha$  und IL-8 detektiert werden (Abbildung 3.39 C und H). 8 h nach Infektion wurden im Vergleich zu nicht infizierten DCs erhöhte Konzentrationen an IL-6, CCL3 und CXCL10 gemessen (Abbildung 3.39 B, G und I). Die Produktion von IL-1 $\beta$ , IL-10 und CCL5 zeigte sich dagegen erst nach 16 h Infektion (Abbildung 3.39 D, F und J). Erst nach 24 h Infektion war die Produktion von IL-12 und CXCL9 erkennbar (Abbildung 3.39 E und K). Im zeitlichen Verlauf zeigte sich, dass die Menge der gemessenen pro- und anti-inflammatorischen Zytokine und die Menge an Chemokinen über die Zeit zunehmen. (Abbildung 3.39, C-K). Lediglich die Menge an gemessenem TNF $\alpha$  ist nach 24 h am höchsten und nimmt nach 48 h und 72 h Infektion wieder ab (Abbildung 3.39 C). Die Infektion der DCs mit CD40L-CD80-PepTrio-ORFV führte im Vergleich zur Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV sowohl nach 24 h als auch im zeitlichen Verlauf über 72 h zu keiner signifikanten Änderung in der Menge der produzierten Zytokine (Abbildung 3.38 und Abbildung 3.39). Folglich führte die zusätzliche Expression von CD80 zu keiner verstärkten Aktivierung und Zytokinproduktion der DCs. Die Stimulierung mit inaktiviertem V-D12-Cherry führte im Vergleich zu nicht infizierten DCs zu keiner erhöhten Zytokinproduktion.

# Ergebnisse



## Ergebnisse



**Abbildung 3.39: Analyse der Zytokin-Produktion von DCs 4 h - 72 h nach Infektion mit ORFV-Rekombinanten.** A) Anteil mCherry+ infizierter DCs nach 24 h, 48 h und 72 h. B)-K) Konzentration der gemessenen Zytokine IL-6 (B), TNF $\alpha$  (C), IL-1 $\beta$  (D), IL-12p70 (E), IL-10 (F), CXCL10 (G), IL-8 (H), CCL3 (I), CCL5 (J) und CXCL9 (K) in DCs nach Infektion mit V-D12-Cherry (rot), CD40L-PepTrio-ORFV (grün) und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV (orange) sowie in nicht infizierten (schwarz), LPS-stimulierten (grau) und mit inaktiviertem V-D12-Cherry (hellrot) stimulierten DCs nach 4 h, 8 h, 16 h, 24 h, 48 h und 72 h. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung der biologischen und technischen Replikate.

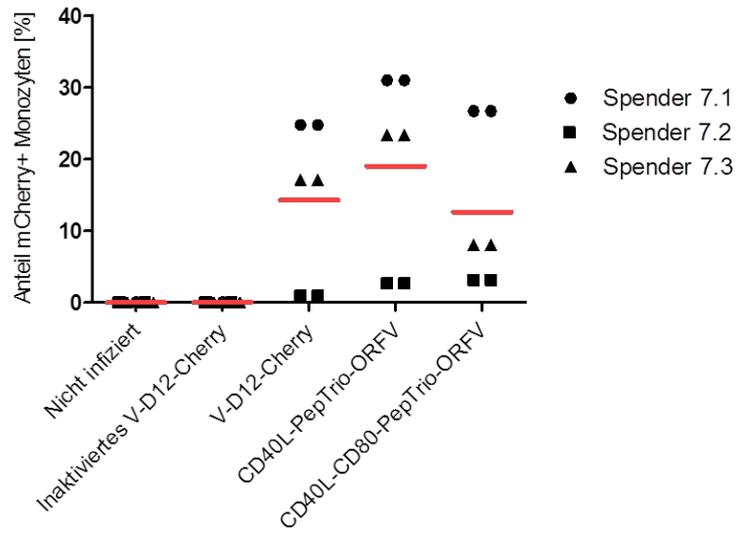
## Ergebnisse

Abbildung 3.40 zeigt die Infektionsraten und die Konzentrationen der analysierten Zytokine 24 h nach Infektion. Von drei Spendern sind jeweils 2 biologische Replikate dargestellt, welche sich aus 2 technischen Replikaten zusammensetzen. Die Infektionsraten der PBMCs nach Infektion mit V-D12-Cherry, CD40L-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV lagen im Mittel bei ca. 10-20 % (Abbildung 3.40 A), wobei der Anteil mCherry+ Monozyten bei den PBMCs von Spender 7.2 mit unter 5 % bei der höchsten verwendeten MOI sehr gering ausfiel. Um den Einfluss der Infektionsrate auf die Produktion der Zytokine zu untersuchen, wurden die Überstände dieser Zellen ebenfalls analysiert. Von allen analysierten Zytokinen wurde nach Infektion mit V-D12-Cherry, CD40L-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV eine erhöhte Produktion von IL-6, IL-8, CCL2, CCL3, CCL5 und CXCL10 festgestellt (Abbildung 3.40 B-G). Die Infektion mit V-D12-Cherry führte in PBMCs weder zur Produktion von IL-6 noch von IL-8. Durch die zusätzliche Expression von CD40L wurde die Produktion dieser Zytokine jedoch induziert (Abbildung 3.40 B-C). Die Infektion mit CD40L-CD80-PepTrio-ORFV führte im Vergleich zur Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV zu einer gesteigerten Produktion von IL-6 und IL-8. Diese Änderung ist jedoch nicht signifikant (Abbildung 3.40 B-C). Während IL-6 nach Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV in einer geringen Konzentration von ca. 50 pg/ml bzw. 60 pg/ml produziert wird, wurden mit 1800 pg/ml bzw. 3500 pg/ml deutlich höhere Mengen an IL-8 gemessen (Abbildung 3.40 B-C). Wie bereits beschrieben, induzierte die Infektion mit V-D12-Cherry die Produktion von CCL2, CCL3, CCL5 und CXCL10. Die zusätzliche Expression von CD40L bzw. CD40L-CD80 konnte die Produktion dieser Chemokine weiter verstärken. Die Konzentration von CCL2 lag nach Infektion mit V-D12-Cherry im Mittel bei ca. 1800 pg/ml, während die Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV in einer erhöhten CCL2-Konzentration von ca. 3700 pg/ml resultierte. Die zusätzliche Expression von CD40L führte somit zu einer signifikant erhöhten CCL2-Konzentration. Da die gemessenen CCL2-Konzentrationen in den Überständen der CD40L-CD80-PepTrio-ORFV infizierten PBMCs innerhalb der Spender sehr voneinander abwichen, war hier keine signifikante Änderung zu erkennen. Die höchste gemessene CCL2-Konzentration wurde in den Überständen der PBMCs gemessen, die nach Infektion mit CD40L-CD80-PepTrio-ORFV nach 24 h die geringste Infektionsrate zeigten (Abbildung 3.40 A und D). Die Konzentration von CCL3 lag nach Infektion mit V-D12-Cherry bei 40 pg/ml. Nach Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV bzw. CD40L-CD80-PepTrio-ORFV wurden signifikant höhere CCL3-Konzentrationen mit ca. 250 pg/ml bzw. 200 pg/ml detektiert (Abbildung 3.40 E). Die CCL3-Konzentrationen nach Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV zeigten innerhalb der PBMCs verschiedener Spender größere Abweichungen (Abbildung 3.40 E). Die CCL5-Konzentration mit 90 pg/ml nach Infektion mit V-D12-Cherry wurde dagegen lediglich mit der Ko-Expression von CD40L und CD80 auf eine Konzentration von ca. 200 pg/ml signifikant gesteigert. Die Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV resultierte in einer leicht erhöhten CCL5-Konzentration im Vergleich zur Infektion mit V-D12-Cherry, diese Änderung war jedoch nicht signifikant. Nach Infektion mit V-D12-Cherry, CD40L-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV wurde die höchste Konzentration an CCL5 in den Überständen der PBMCs von Spender 7.2 detektiert (Abbildung 3.40 F). Die Konzentration von CXCL10 lag nach Infektion der PBMCs mit V-D12-Cherry bei ca. 200 pg/ml. Durch die zusätzliche Expression von CD40L wurde diese auf ca. 400 pg/ml im Mittel gesteigert. Die PBMCs von Spender 7.3 produzierten nach Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV deutlich mehr CXCL10 als die PBMCs der beiden anderen Spender. Durch die damit einhergehende Streuung der Daten war die Änderung der CXCL10-Konzentration im Vergleich zu V-D12-Cherry infizierten PBMCs nicht signifikant. Die Infektion mit CD40L-CD80-PepTrio-

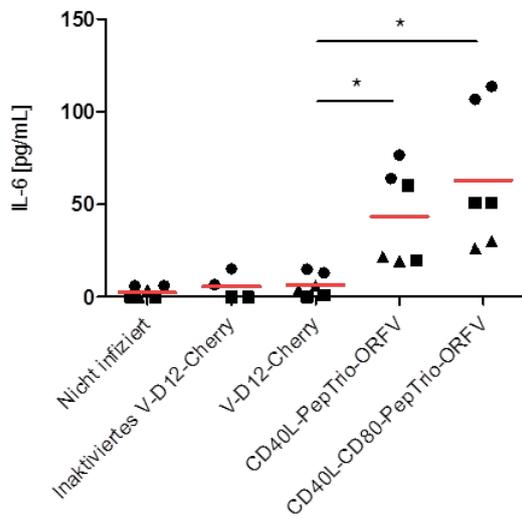
## Ergebnisse

ORFV resultierte ebenso wie die Infektion mit V-D12-Cherry in einer CXCL10-Konzentration von ca. 200 pg/ml (Abbildung 3.40 G).

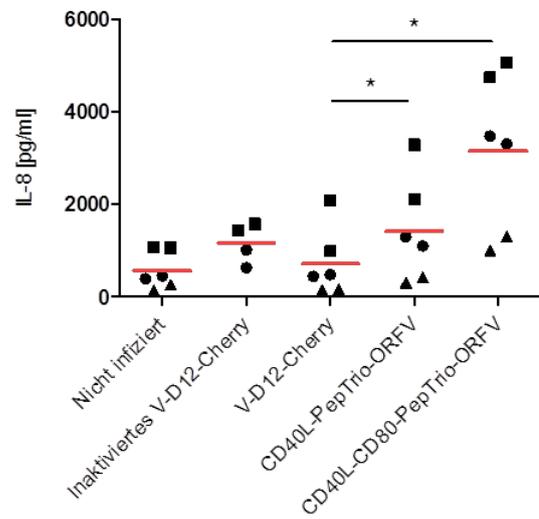
### A Infektionsraten



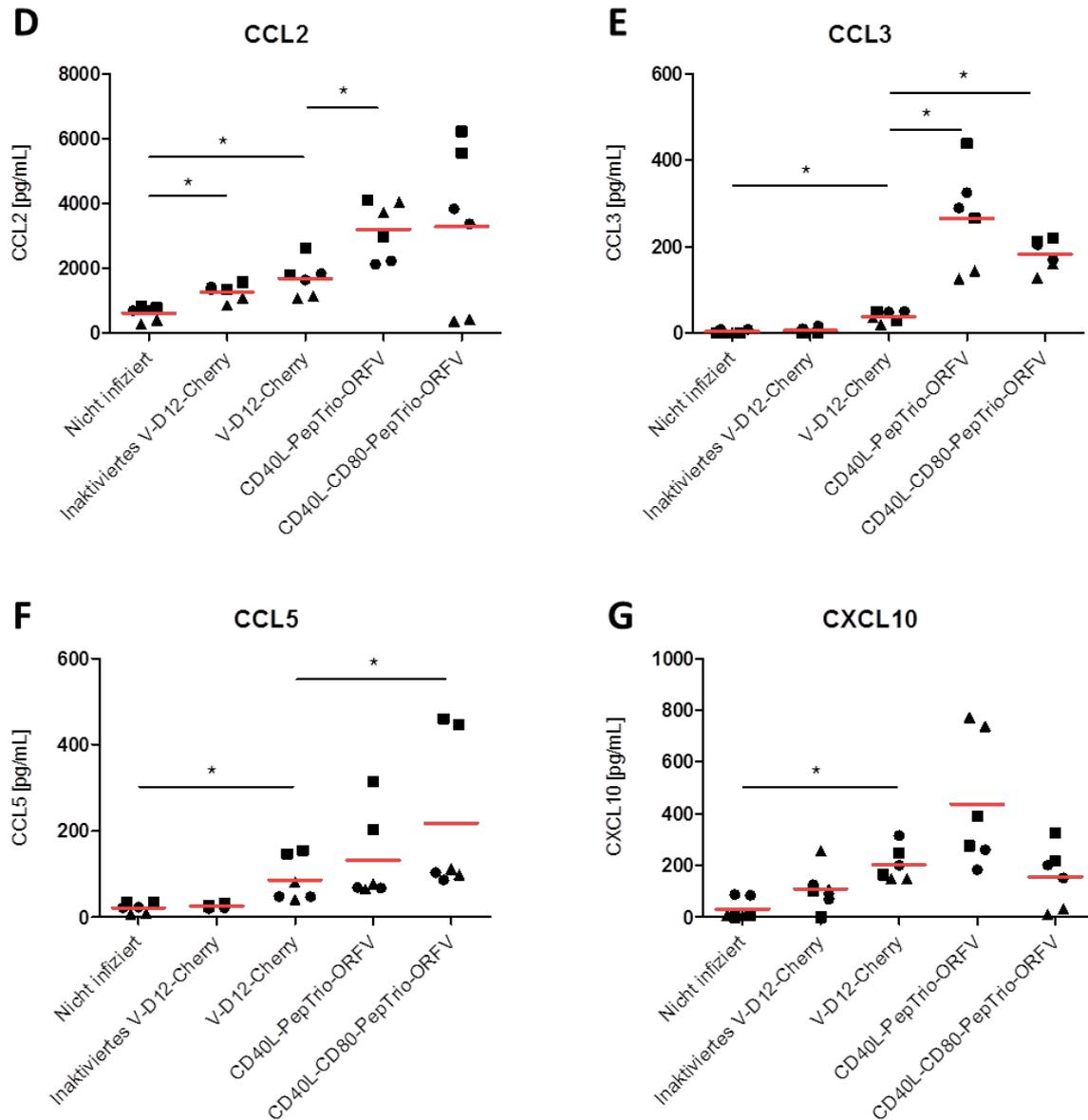
### B IL-6



### C IL-8



## Ergebnisse



**Abbildung 3.40: Analyse der Zytokin-Produktion von PBMCs nach 24 h Infektion mit ORFV-Rekombinanten.** A) Anteil mCherry+ Monozyten. B)-G) Konzentration der gemessenen Zytokine IL-6 (B), IL-8 (C), CCL2 (D), CCL3 (E), CCL5 (F) und CXCL10 (G) in den Überständen infizierter PBMCs nach Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV im Vergleich zur Infektion mit V-D12-Cherry. Als Kontrolle dienten nicht infizierte und mit inaktiviertem V-D12-Cherry stimulierte PBMCs. Dargestellt sind die biologischen Replikate von 3 unabhängigen Experimenten und die berechneten Mittelwerte (rote Balken). Die statistische Analyse erfolgte durch den nicht-parametrischen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %: \* =  $p \leq 0.05$ .

### 3.2.3.6 Induktion von Antigen-spezifischen Immunantworten *in vitro*

Da die zusätzliche Expression der beiden ko-stimulatorischen Moleküle in einer verstärkten Aktivierung und Zytokin-Produktion von APCs resultiert, wurde im Folgenden untersucht, ob CD40L-PepTrio-ORFV, CD80-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV stärkere Antigen-spezifische Immunantworten induzieren. Hierfür wurde die Fähigkeit zur Aktivierung von naiven T-Zellen gegen das im PepTrio Antigen enthaltene NLVPMVATV getestet (*Priming*). Zudem wurde die Expansion von T-Gedächtniszellen sowie deren Funktionalität 12 Tage nach Infektion mit den verschiedenen ORFV-Rekombinanten betrachtet und mit PepTrio-ORFV verglichen (*Recall*). Analog zu Versuch 3.1.6 wurden auch hierfür die PBMCs der verschiedenen Spender auf die Anwesenheit von T-Gedächtniszellen untersucht.

Für die Analyse der Expansion und Funktionalität von NLVPMVATV-spezifischen T-Gedächtniszellen wurden PBMCs mit den verschiedenen ORFV-Rekombinanten infiziert. Unstimulierte PBMCs dienten als negative Kontrolle. Die Stimulation mit Peptid für die Aktivierung von T-Gedächtniszellen wurde als positive Kontrolle genutzt. Die Infektion mit V-D12-Cherry ohne Antigen sowie die Infektion mit V-D12-Cherry bei zusätzlicher Peptid-Stimulierung stellten weitere Kontrollen dar, um den Einfluss des ORFV auf die Expansion und Funktionalität der T-Zellen zu untersuchen. Nach 12 Tagen erfolgte die Analyse der Expansion und der Funktionalität der T-Gedächtniszellen. Um die Grund-Expression der Zytokine zu ermitteln, wurden die Zellen mit einem negativen Peptid stimuliert.

In Abbildung 3.41 ist die Analyse der Expansion und Funktionalität der T-Gedächtniszellen exemplarisch für einen Spender dargestellt. Der Anteil Tetramer+ CD8+ T-Zellen in unstimulierten und nicht infizierten PBMCs lag bei 0,051 % (Abbildung 3.41 A). Die Stimulierung der PBMCs mit NLVPMVATV resultierte in einer Expansion der T-Gedächtniszellen, sodass nach 12 Tagen 9,4 % der CD8+ T-Zellen spezifisch für NLVPMVATV waren (Abbildung 3.41 A). Die Infektion mit V-D12-Cherry hatte keinen Einfluss auf die Expansion der T-Gedächtniszellen: So führte die alleinige Infektion ohne Peptidzugabe zu keiner Expansion der T-Zellen und die Kombination mit NLVPMVATV resultierte in 9,2 % Tetramer+ CD8+ T-Zellen und somit zu vergleichbaren Frequenzen wie die Stimulierung mit Peptid alleine (Abbildung 3.41 A). Die Infektion mit PepTrio-ORFV, CD40L-PepTrio-ORFV, CD80-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV führte ebenfalls zu einer Expansion der T-Gedächtniszellen. Der Anteil Tetramer+ CD8+ T-Zellen lag nach Infektion mit PepTrio-ORFV bei 45,9 %. Einen geringeren Anteil Tetramer+ CD8+ T-Zellen mit 14,7 % erbrachte die Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV. Die größten Populationen Tetramer+ CD8+ T-Zellen wurden mit einem Anteil von 64,6 % bzw. 69,9 % spezifischer T-Zellen nach Infektion mit CD80-PepTrio-ORFV bzw. CD40L-CD80-PepTrio-ORFV erreicht (Abbildung 3.41 A).

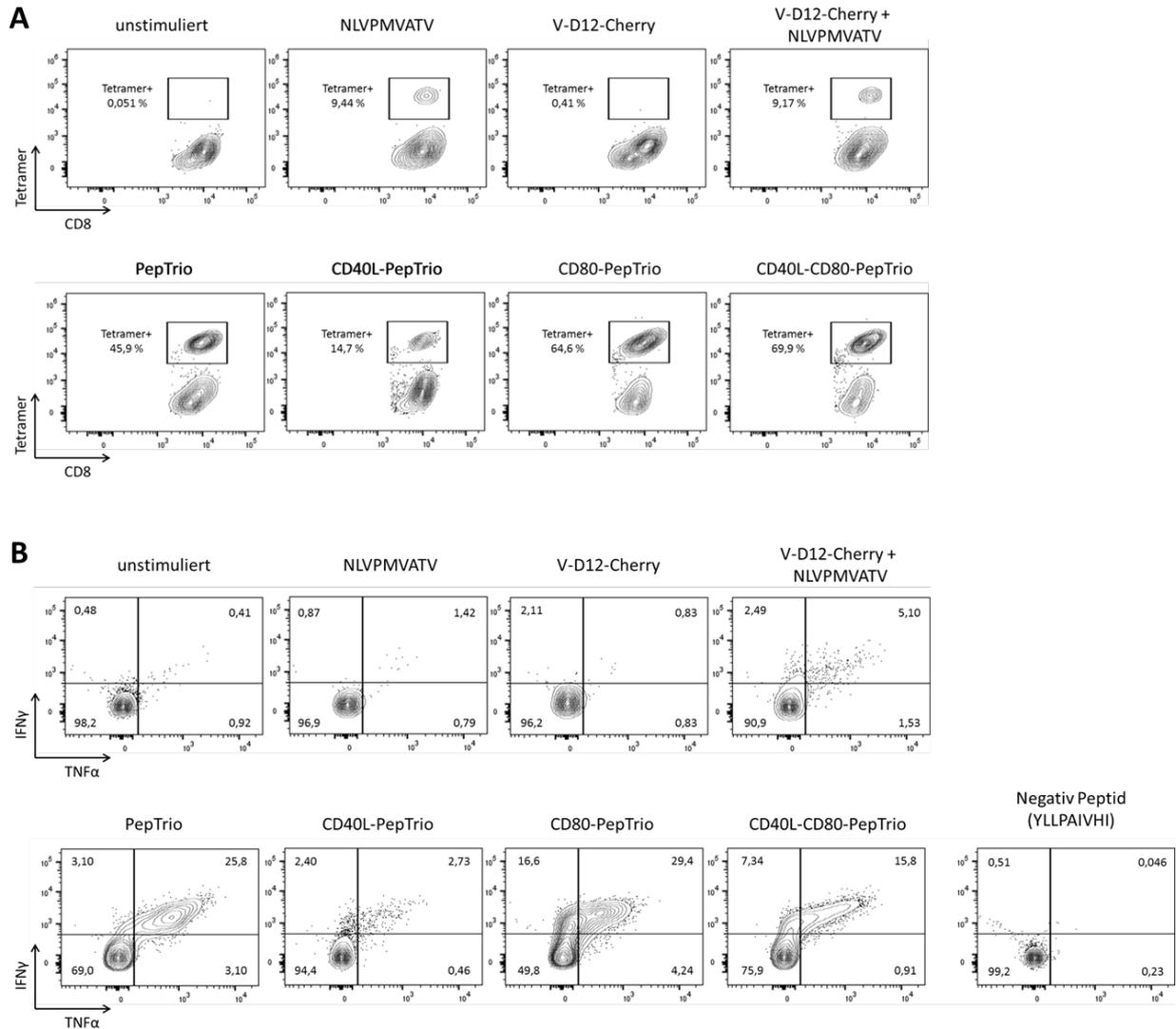
Die Analyse der Funktionalität der T-Gedächtniszellen nach Re-Stimulierung mit NLVPMVATV zeigte die Produktion von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  in 1,4 % der CD8+ T-Zellen (Abbildung 3.41 B). Der Anteil IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$ + und TNF $\alpha$ + CD8+ T-Zellen war nach Infektion mit V-D12-Cherry vergleichbar hoch, der Anteil IFN $\gamma$ + CD8+ T-Zellen war 3-mal höher als in der unstimulierten Kontrolle (Abbildung 3.41 B). Die Kombination von V-D12-Cherry und NLVPMVATV steigerte den Anteil Zytokin-produzierender CD8+ T-Zellen im Vergleich zur Peptid-Stimulierung alleine. 2,5 % der CD8+ T-Zellen produzierten demnach nur IFN $\gamma$ , 1,5 % produzierten nur TNF $\alpha$  und 5,1% produzierten sowohl IFN $\gamma$  als auch TNF $\alpha$  (Abbildung 3.41 B). Nach Infektion mit CD40L-

## Ergebnisse

PepTrio-ORFV produzierten die T-Gedächtniszellen weniger IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$ . Lediglich 2,4 % der CD8 $^+$  T-Zellen waren IFN $\gamma^+$ , 0,5 % waren TNF $\alpha^+$  und 2,7 % waren IFN $\gamma^+$  TNF $\alpha^+$ . Dagegen resultierte die Infektion mit PepTrio-ORFV in einer sehr starken Expression von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$ . Je 3,1 % der CD8 $^+$  T-Zellen produzierten IFN $\gamma^+$  oder TNF $\alpha^+$ , während 25,8 % IFN $\gamma^+$  und TNF $\alpha^+$  produzierten. Etwas geringere Anteile an Zytokin-produzierenden CD8 $^+$  T-Zellen resultierten aus der Infektion mit CD40L-CD80-PepTrio. 7,3 % der CD8 $^+$  T-Zellen exprimierten IFN $\gamma$ , 0,9 % TNF $\alpha$  und 15,8 % der CD8 $^+$  T-Zellen exprimierten sowohl IFN $\gamma$  als auch TNF $\alpha$ . Mit 16,6 % IFN $\gamma^+$ , 4,2 % TNF $\alpha^+$  und 29,4 % IFN $\gamma^+$  TNF $\alpha^+$  CD8 $^+$  T-Zellen führte die Infektion mit CD80-PepTrio-ORFV zu dem größten Anteil Zytokin-produzierender Zellen (Abbildung 3.41 B).

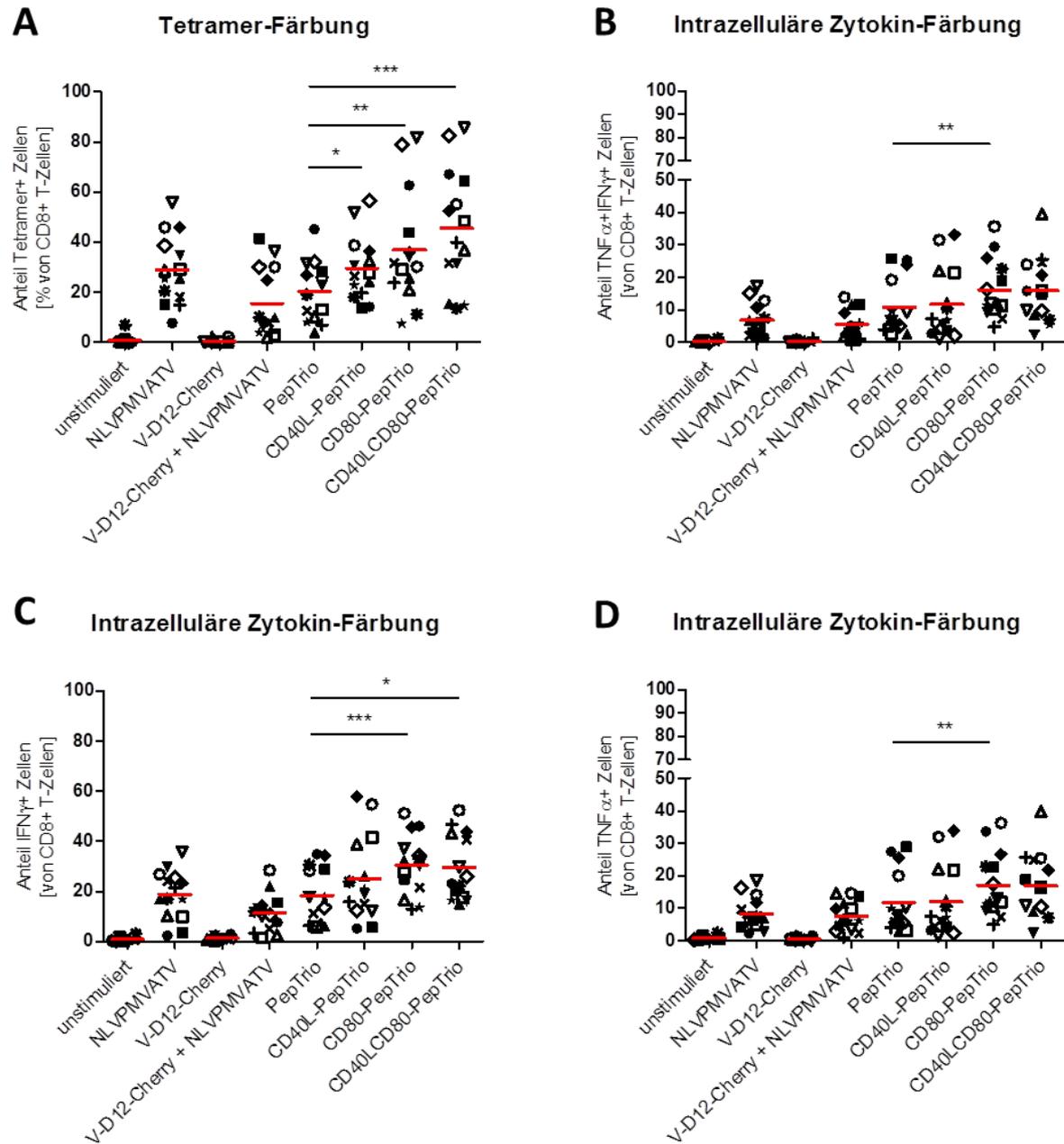
Insgesamt wurde die Expansion von Funktionalität von T-Gedächtniszellen in 7 weiteren Spendern analysiert. Die Durchführung erfolgte in Duplikaten. In Abbildung 3.42 ist die Zusammenfassung der Experimente dargestellt. Die Tetramer-Färbung zeigte, dass durch die Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV, CD80-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV der Anteil NLVPMVATV-spezifischer T-Gedächtniszellen im Vergleich zu PepTrio-ORFV-infizierten Zellen signifikant zunimmt (Abbildung 3.42 A). Nach Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV bzw. CD80-PepTrio-ORFV waren ca. 30 % bzw. 40 % der CD8 $^+$  T-Zellen Tetramer $^+$ . Der größte Anteil Tetramer $^+$  CD8 $^+$  T-Zellen wurde mit ca. 50 % durch Infektion mit CD40L-CD80-PepTrio-ORFV erreicht (Abbildung 3.42 A). Die Infektion mit V-D12-Cherry induzierte keine Expansion der T-Gedächtniszellen. Im Vergleich zur Stimulierung mit NLVPMVATV führte die Kombination von NLVPMVATV und V-D12-Cherry zu einem um 10 % verringerten Anteil von ca. 20 % Tetramer $^+$  CD8 $^+$  T-Zellen (Abbildung 3.42 A). Der Anteil IFN $\gamma^+$ TNF $\alpha^+$  CD8 $^+$  T-Zellen und TNF $\alpha^+$  CD8 $^+$  T-Zellen wurde lediglich durch die Infektion mit CD80-PepTrio-ORFV signifikant gesteigert (Abbildung 3.42 B, C und D). Sowohl die Infektion mit CD80-PepTrio-ORFV als auch die Infektion mit CD40L-CD80-PepTrio-ORFV führte zu einer signifikanten Erhöhung des Anteils an IFN $\gamma^+$  CD8 $^+$  T-Zellen. Die Infektion mit CD40L-CD80-PepTrio-ORFV führte außerdem zu erhöhten Anteilen an IFN $\gamma^+$ TNF $\alpha^+$  CD8 $^+$  T-Zellen und TNF $\alpha^+$  CD8 $^+$  T-Zellen. Diese Erhöhung war allerdings nicht signifikant (Abbildung 3.42 B, C und D).

## Ergebnisse



**Abbildung 3.41: Analyse der Expansion und Funktionalität von T-Gedächtniszellen nach Infektion mit ORFV-Rekombinanten.** PBMCs wurden mit NLVPMVATV stimuliert oder mit PepTrio-ORFV, CD40L-PepTrio-ORFV, CD80-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV (MOI 5.0) infiziert. A) Nach 12 Tagen wurde die Expansion der T-Gedächtniszellen über den Anteil Tetramer+ CD8+ T-Zellen bestimmt. B) Die Analyse der Funktionalität erfolgte nach Re-Stimulierung mit NLVPMVATV durch intrazelluläre Färbung von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  in CD8+ T-Zellen. Die Re-Stimulierung mit negativem Peptid veranschaulicht die Grundexpression von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ . Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von 7 unabhängigen Experimenten.

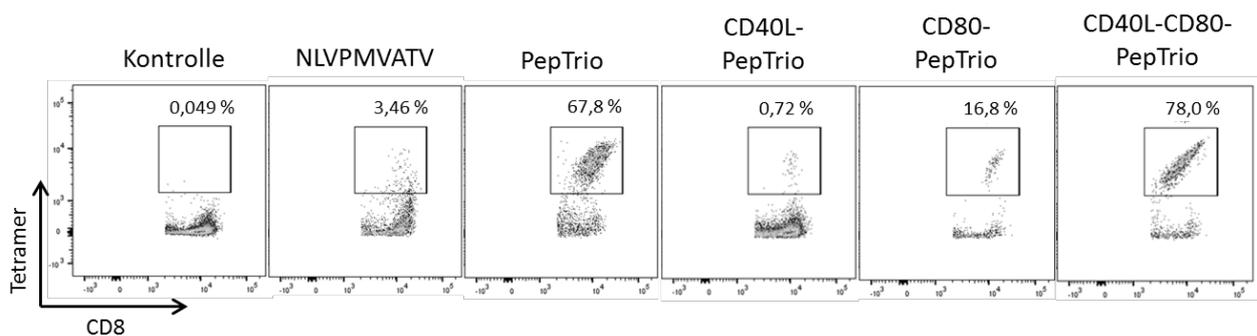
## Ergebnisse



**Abbildung 3.42: Expansion und Funktionalität von T-Gedächtniszellen 7 verschiedener Spender nach Infektion mit ORFV-Rekombinanten.** PBMCs wurden mit NLVPMVATV stimuliert oder mit PepTrio-ORFV, CD40L-PepTrio-ORFV, CD80-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV (MOI 5.0) infiziert. A) Nach 12 Tagen wurde die Expansion der T-Gedächtniszellen über den Anteil Tetramer+ CD8+ T-Zellen bestimmt. B)-D) Die Analyse der Funktionalität erfolgte nach Re-Stimulierung mit NLVPMVATV durch intrazelluläre Färbung von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  in CD8+ T-Zellen. Bestimmt wurde der Anteil TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$ + CD8+ T-Zellen (B), IFN $\gamma$ + CD8+ T-Zellen (C) und TNF $\alpha$ + CD8+ T-Zellen (D). Dargestellt sind die Duplikate von 7 unabhängigen Experimenten und die berechneten Mittelwerte. Die statistische Analyse erfolgte durch einen gepaarten t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %: ns =  $p > 0.05$ , \* =  $p \leq 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$ .

## Ergebnisse

Für das *Priming* von naiven T-Zellen wurden DCs mit PepTrio-ORFV, CD40L-PepTrio-ORFV, CD80-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV infiziert (MOI 5.0). Als Kontrollgruppe dienten mit Peptid beladene DCs welche zuvor mit mehreren Zytokinen stimuliert wurden. Ein erfolgreiches *Priming* ist exemplarisch in Abbildung 3.43 dargestellt. Die Kontrolle zeigt den Anteil Tetramer+ CD8+ T-Zellen ohne Stimulierung mit Peptid oder Infektion mit den verschiedenen ORFV-Rekombinanten (Abbildung 3.43). Das *Priming* mit NLVPMVATV-beladenen DCs führte zu einer Tetramer+ Population von 3,46 % der CD8+ T-Zellen. Die Infektion mit PepTrio-ORFV resultierte in einer starken Zunahme an NLVPMVATV-spezifischen CD8+ T-Zellen. Nach 4 Wochen wurde eine Population von 67,8 % Tetramer+ CD8+ T-Zellen detektiert. Die Infektion der DCs mit CD40L-PepTrio-ORFV führte im Vergleich dazu zu einer geringeren Expansion der Tetramer+ Population. Nach dem *Priming* waren lediglich 0,72 % der CD8+ T-Zellen Tetramer+. Das *Priming* mit CD80-PepTrio-ORFV infizierten DCs war ebenfalls erfolgreich. Mit Hilfe dieser Rekombinante wurde in diesem Fall die Expansion der Tetramer+ Population auf einen Anteil von 16,8 % der CD8+ T-Zellen erreicht. Die Infektion der DCs mit CD40L-CD80-PepTrio-ORFV hatte in den exemplarisch dargestellten Zellen den größten Effekt auf die Aktivierung der naiven T-Zellen. Nach dem *Priming* wurde hier eine Population von 78 % Tetramer+ CD8+ T-Zellen detektiert (Abbildung 3.43).



**Abbildung 3.43: Priming naiver T-Zellen mittels ORFV-infizierter DCs.** Nach Beladung der DCs mit NLVPMVATV oder Infektion mit PepTrio-ORFV, CD40L-PepTrio-ORFV, CD80-PepTrio-ORFV oder CD40L-CD80-PepTrio-ORFV erfolgte die Ko-Kultivierung mit CD8+ T-Zellen. Alle 7 Tage wurden die Zellen durch autologe Peptid-beladene PBMCs re-stimuliert. Nach 4 Wochen wurde der Anteil Tetramer+ CD8+ T-Zellen über Tetramer-Färbung und Durchflusszytometrie bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von 3 unabhängigen Experimenten.

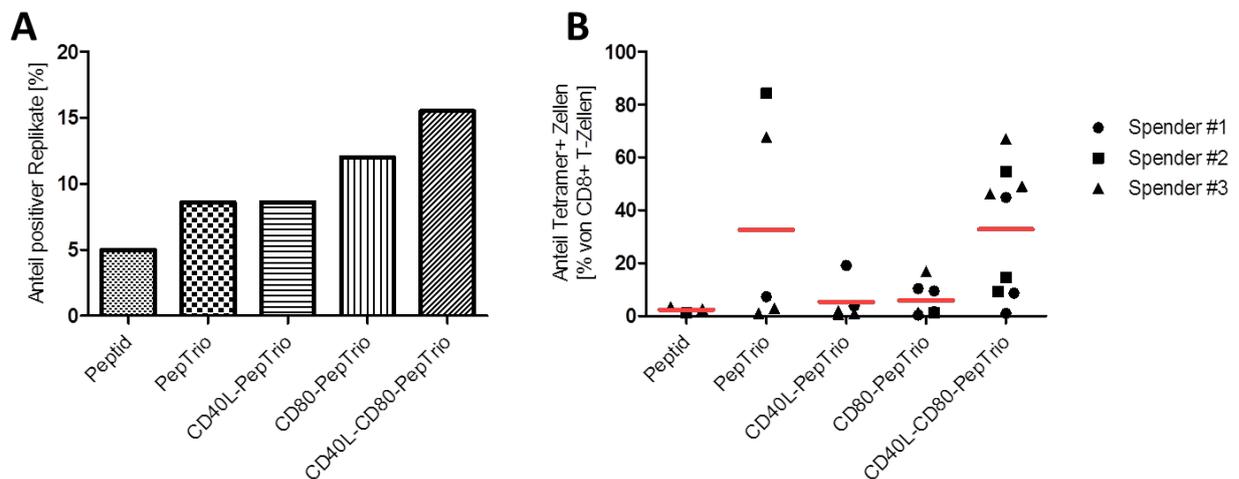
Das *Priming* von naiven T-Zellen mittels CD40L-PepTrio-ORFV, CD80-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV wurde mit den Zellen drei verschiedener Spender durchgeführt. Für jede Bedingung wurden ca. 20 Replikate verwendet. Ein Replikat galt als positiv, wenn der Anteil Tetramer+ Zellen nach Stimulierung mindestens 0,2 % betrug und mindestens doppelt so hoch war als in der unstimulierten Kontrolle. In Tabelle 3.6 und Abbildung 3.44 A ist der Anteil positiver Replikate dargestellt. Das *Priming* mittels Peptid-beladener DCs führte in 3 der insgesamt 59 Replikate zu einer Tetramer+ Population (Tabelle 3.6), was 5,1 % der Replikate entspricht (Abbildung 3.44 A). Mit Hilfe von PepTrio-ORFV- und CD40L-PepTrio-ORFV-infizierten DCs wurden in 5 von 58 Replikaten, also bei 8,6 % (Abbildung 3.44 A), eine Population mit NLVPMVATV-spezifischen CD8+ T-Zellen detektiert. Ein größerer Anteil an

## Ergebnisse

positiven Replikaten wurde beim Priming mit CD80-PepTrio-ORFV-infizierten DCs erreicht. In 7 der 58 Replikate (Tabelle 3.6) und folglich 12,1 % der analysierten Proben zeigte sich eine Tetramer+ Population (Abbildung 3.44 A). Das erfolgreichste *Priming* erfolgte durch Infektion der DCs mit CD40L-CD80-PepTrio-ORFV. In 9 von 58 Replikaten (Tabelle 3.6) und somit 15,5 % der Proben (Abbildung 3.44 A) wurden NLVPMVATV-spezifische CD8+ T-Zellen nachgewiesen. Mit Hilfe der mit PepTrio-ORFV, CD80-PepTrio-ORFV und CD40L-CD80-PepTrio-ORFV infizierten DCs konnten in allen drei Spendern naive T-Zellen aktiviert werden. Mittels Peptid oder durch CD40L-PepTrio-ORFV-infizierte DCs war das *Priming* naiver T-Zellen in 2 der 3 Spender erfolgreich.

**Tabelle 3.6: Anzahl positiver Replikate nach Priming von naiven T-Zellen.** Dargestellt ist die Anzahl der getesteten Replikate sowie die Anzahl der positiven Replikate von drei Spendern.

Spender	Peptid	PepTrio	CD40L-PepTrio	CD80-PepTrio	CD40L-CD80-PepTrio
#1	0/20	1/20	2/20	4/20	3/20
#2	1/19	1/18	0/18	1/18	3/18
#3	2/20	3/20	3/20	2/20	3/20
<b>Summe</b>	<b>3/59</b>	<b>5/58</b>	<b>5/58</b>	<b>7/58</b>	<b>9/58</b>



**Abbildung 3.44: Priming von naiven T-Zellen 3 verschiedener Spender mittels ORFV-infizierter DCs.** A) Prozentualer Anteil der positiven Replikate in 3 unabhängigen Experimenten. B) Anteil der Tetramer+ CD8+ T-Zellen betrachtet in den positiven Replikaten.

Betrachtet man in den positiven Replikaten den prozentualen Anteil der Tetramer+ CD8+ T-Zellen, liegt dieser nach dem *Priming* mit Peptid-beladenen DCs sowie mit CD40L-PepTrio-ORFV- und CD80-PepTrio-ORFV-infizierten DCs bei ca. 5-10 % (Abbildung 3.44 B). Auch das *Priming* mit PepTrio-ORFV infizierten DCs resultierte in 3 der 5 positiven Replikate in einem Anteil Tetramer+ CD8+ T-Zellen von ca. 5 %. 2 der 5 positiven Replikate zeigten eine Tetramer+ Population von 60 – 80 % (Abbildung 3.44 B). Die größte Population an Tetramer+ CD8+ T-

Zellen wurde beim *Priming* mit CD40L-CD80-PepTrio-ORFV infizierten DCs erreicht. In 5 der 9 positiven Replikate wurde eine Population von mindestens 40 % Tetramer+ CD8+ T-Zellen detektiert (Abbildung 3.44 B). Zusammenfassend war das *Priming* von naiven T-Zellen in den drei durchgeführten Experimenten am erfolgreichsten nach Infektion der DCs mit CD40L-CD80-PepTrio-ORFV.

### 3.2.4 Charakterisierung CD80 und CD40L exprimierender ORFV-Rekombinanten *in vivo*

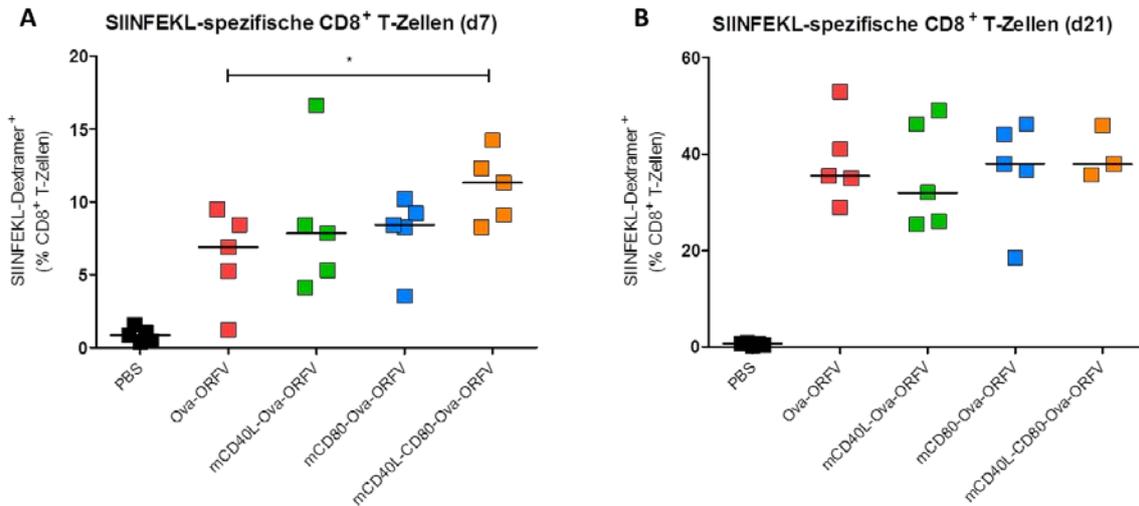
#### 3.2.4.1 Induktion von Ova-spezifischen Immunantworten

*In vitro* konnte bereits gezeigt werden, dass die Ko-Expression von CD40L und/oder CD80 die Aktivierung von APCs und PBMCs sowie eine Antigen-spezifische Immunantwort verstärkt. Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob die ORFV-induzierte Ova-spezifische Immunantwort *in vivo* durch die zusätzliche Expression von CD40L, CD80 und CD40L-CD80 gesteigert werden kann. Sowohl die Durchführung des Experiments als auch die Analyse der Daten erfolgten durch Boehringer Ingelheim.

C57BL/6NTac Mäuse wurden intramuskulär (i.m.) mit jeweils 106 pfu/ml Ova-ORFV, mCD40L-Ova-ORFV, mCD80-Ova-ORFV und mCD40L-CD80-Ova-ORFV immunisiert. Die *Prime*-Immunsierung erfolgte an Studientag 0, die *Boost*-Immunsierung nach 14 Tagen. Der Anteil Ova-spezifischer CD8+ T-Zellen wurde 7 Tage nach der *Prime*-Immunsierung (d7) und 7 Tage nach der *Boost*-Immunsierung (d21) über die Färbung mit SIINFEKL-Dextramer bestimmt. Die Analyse der Funktionalität der Ova-spezifischen T-Zellen erfolgte 7 Tage nach der *Boost*-Immunsierung über die intrazelluläre Färbung von Zytokinen. Hierfür wurden Splenozyten isoliert und mit 2 µg/ml SIINFEKL stimuliert. Zusätzlich zur zellulären Immunantwort wurde die humorale Immunantwort analysiert. Hierfür wurde die Konzentration an Ova-spezifischen Antikörpern im Serum der Mäuse 7 Tage nach *Boost*-Immunsierung mittels ELISA bestimmt.

7 Tage nach *Prime*-Immunsierung wurde ein signifikant größerer Anteil Dextramer+ CD8+ T-Zellen nach Immunsierung mit mCD40L-CD80-Ova-ORFV im Vergleich zur Immunsierung mit Ova-ORFV detektiert. Die *Prime*-Immunsierung mit mCD40L-mCD80-Ova-ORFV resultierte im Mittel in ca. 12 % SIINFEKL-spezifischer CD8+ T-Zellen, während nach *Prime*-Immunsierung mit Ova-ORFV ca. 7 % der CD8+ T-Zellen SIINFEKL-spezifisch waren (Abbildung 3.45 A). Die Immunsierung mit mCD40L-Ova-ORFV bzw. mCD80-Ova-ORFV hatte keinen Einfluss auf den Anteil SIINFEKL-spezifischer CD8+ T-Zellen im Vergleich zur Immunsierung mit Ova-ORFV (Abbildung 3.45 A). Durch die *Boost*-Immunsierungen wurde der Anteil SIINFEKL-spezifischer CD8+ T-Zellen in allen Gruppen erhöht. Im Mittel wurde in allen Gruppen ein Anteil von 30-40 % SIINFEKL-spezifischer CD8+ T-Zellen detektiert (Abbildung 3.45 B). Die zusätzliche Expression von mCD40L und/oder mCD80 hatte nach *Boost*-Immunsierung keine Auswirkung auf den Anteil SIINFEKL-spezifischer CD8+ T-Zellen. Die Proben zweier Mäuse nach *Boost*-Immunsierung mit mCD40L-mCD80-Ova-ORFV waren nicht verfügbar und konnten daher nicht gemessen werden (Abbildung 3.45 B).

## Ergebnisse

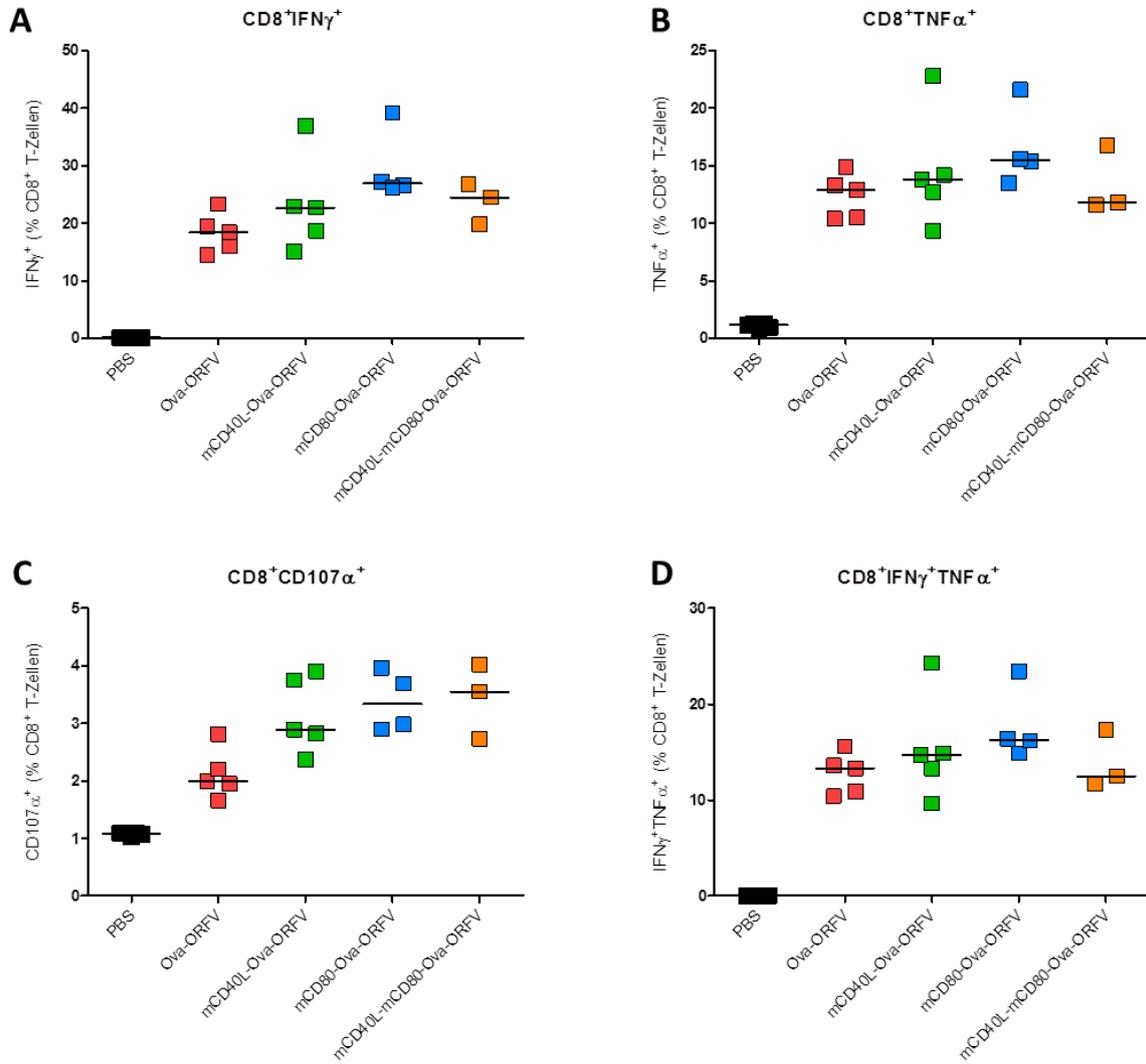


**Abbildung 3.45: SIINFEKL-spezifische CD8+ T-Zell-Antwort nach Immunisierung mit verschiedenen ORFV-Rekombinanten.** C57BL/6NTac Mäuse wurden intramuskulär (i.m.) mit  $10^6$  pfu/ml Ova-ORFV, mCD40L-Ova-ORFV, mCD80-Ova-ORFV oder mCD40L-mCD80-Ova-ORFV immunisiert. Die *Prime*-Immunsierung erfolgte an Studientag 0 gefolgt von einer *Boost*-Immunsierung an Tag 14. Jeweils 7 Tage nach *Prime*- bzw. *Boost*-Immunsierung wurde der Anteil Ova-spezifischer CD8+ T-Zellen mittels Dextramer-Färbung bestimmt. A) Der Anteil Ova-spezifischer CD8+ T-Zellen nach *Prime*-Immunsierung. B) Der Anteil Ova-spezifischer CD8+ T-Zellen nach *Boost*-Immunsierung. Dargestellt sind die Werte der einzelnen Tiere sowie die berechneten Mittelwerte. Die statistische Analyse erfolgte durch einen ungepaarten t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %: ns =  $p > 0.05$ , \* =  $p \leq 0.05$ .

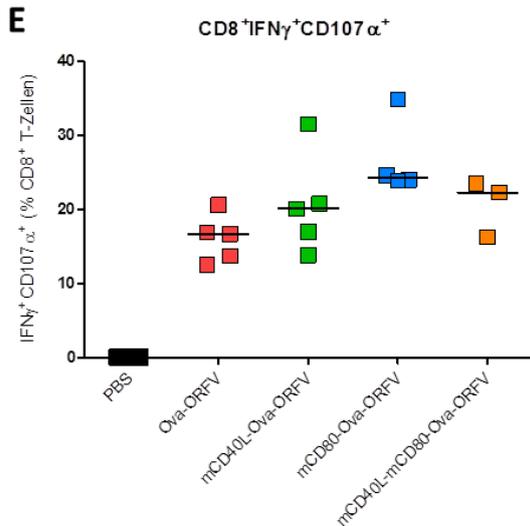
Die Analyse der Produktion von IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und CD107a 7 Tage nach der *Boost*-Immunsierung zeigte eine hohe Funktionalität der SIINFEKL-spezifischen CD8+ T-Zellen (Abbildung 3.46 A-E). Der Anteil IFN $\gamma$ + CD8+ T-Zellen lag in allen ORFV-immunisierten Gruppen bei ca. 20-30 %. Geringfügig mehr IFN $\gamma$  wurde in den Splenozyten der mCD80-Ova-ORFV immunisierten Mäuse detektiert. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen waren jedoch nicht signifikant (Abbildung 3.46 A). Der Anteil TNF $\alpha$ + CD8+ T-Zellen war im Vergleich zu IFN $\gamma$ + CD8+ T-Zellen geringer und lag im Mittel bei 12-15 %. Auch hier waren keine signifikanten Änderungen zwischen den verschiedenen Gruppen zu erkennen (Abbildung 3.46 B). Der Anteil der CD8+ T-Zellen die lediglich CD107a exprimieren lag 7 Tage nach *Boost*-Immunsierung mit Ova-ORFV im Mittel bei ca. 2 %. Durch die Immunisierung mit mCD40L-Ova-ORFV wurde dieser Anteil auf ca. 3 % gesteigert. Die Immunisierung mit mCD80-Ova-ORFV und mCD40L-mCD80-Ova-ORFV resultierte ebenfalls in einem erhöhten Anteil an CD107a+ CD8+ T-Zellen von ca. 3,5 %. Die genannten Änderungen sind jedoch nicht signifikant (Abbildung 3.46 C). Nach Immunisierung mit Ova-ORFV lag der Anteil IFN $\gamma$ + TNF $\alpha$ + CD8+ T-Zellen im Mittel bei ca. 13 %. Die Immunisierung mit mCD40L-Ova-ORFV und mCD80-Ova-ORFV resultierte in einem leicht aber nicht signifikant erhöhten Anteil IFN $\gamma$ + TNF $\alpha$ + CD8+ T-Zellen von 15 % bzw. 17 % (Abbildung 3.46 D). Der Anteil IFN $\gamma$ + CD107a+ CD8+ T-Zellen lag nach Immunisierung mit Ova-ORFV bei ca. 18 %. Durch die zusätzliche Expression von mCD40L und/oder mCD80 wurden leicht erhöhte Anteile an IFN $\gamma$ + CD107a+ CD8+ T-Zellen mit 20 % nach mCD40L-Ova-ORFV-, 22 % nach mCD80-Ova-ORFV- und 21 % nach mCD40L-mCD80-Ova-ORFV-Immunsierung detektiert. Auch in diesem Fall waren die Änderungen nicht signifikant (Abbildung 3.46 E). Die

## Ergebnisse

Proben einer mCD80-Ova-ORFV-immunisierten Maus und zweier mCD40L-mCD80-Ova-ORFV-immunisierten Mäuse waren leider nicht verfügbar und konnten daher nicht gemessen werden.



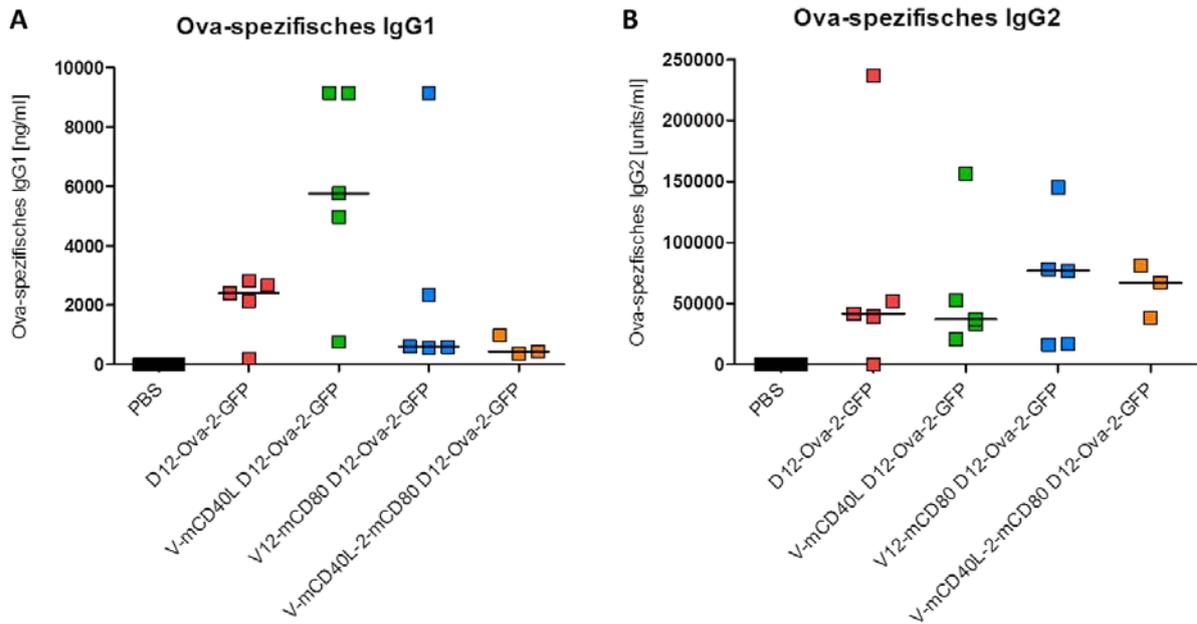
## Ergebnisse



**Abbildung 3.46: Analyse der Funktionalität SIINFEKL-spezifischer CD8+ T-Zellen nach *in vivo*-Immunisierung mit verschiedenen ORFV-Rekombinanten.** C57BL/6NTac Mäuse wurden intramuskulär (i.m.) mit  $10^6$  pfu/ml Ova-ORFV, mCD40L-Ova-ORFV, mCD80-Ova-ORFV oder mCD40L-mCD80-Ova-ORFV immunisiert. Die *Prime*-Immunisierung erfolgte an Studientag 0 gefolgt von einer *Boost*-Immunisierung an Tag 14. 7 Tage nach *Boost*-Immunisierung wurde die Funktionalität Ova-spezifischer CD8+ T-Zellen analysiert. Die Analyse der Funktionalität erfolgte in Splenozyten nach Re-Stimulierung mit SIINFEKL durch intrazelluläre Färbung von TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  und CD107a in CD8+ T-Zellen. Bestimmt wurde der Anteil IFN $\gamma$ + CD8+ T-Zellen (A), TNF $\alpha$ + CD8+ T-Zellen (B), CD107a+ CD8+ T-Zellen (C), IFN $\gamma$ + TNF $\alpha$ + CD8+ T-Zellen (D) und IFN $\gamma$ + CD107a+ CD8+ T-Zellen (E). Dargestellt sind die Werte der einzelnen Tiere sowie die berechneten Mittelwerte. Die statistische Analyse erfolgte durch einen ungepaarten t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %.

Die Analyse der Konzentration an Ova-spezifischen IgG1- und IgG2-Antikörpern ist in Abbildung 3.47 dargestellt. Auch hier waren die Proben zweier Mäuse nach *Boost*-Immunisierung mit mCD40L-mCD80-Ova-ORFV nicht verfügbar und konnten daher nicht gemessen werden. Sowohl spezifische IgG1- als auch spezifische IgG2-Antikörper wurden 7 Tage nach *Boost*-Immunisierung detektiert. Nach Immunisierung mit Ova-ORFV wurde eine Konzentration von ca. 2500 ng/ml Ova-spezifischem IgG1 gemessen. Durch die Ko-Expression von mCD40L wurde der IgG1-Titer auf 6000 ng/ml deutlich erhöht. Die Immunisierung mit mCD80-Ova-ORFV und mCD40L-mCD80-Ova-ORFV resultierte jeweils in verringerten Titern an Ova-spezifischem IgG1. Die Varianz innerhalb der mCD40L-Ova-ORFV- und mCD80-Ova-ORFV-immunisierten Gruppen war dabei sehr hoch (Abbildung 3.47 A). Die Konzentration an Ova-spezifischem IgG2 war in Ova-ORFV und mCD40L-Ova-ORFV-immunisierten Mäusen vergleichbar und lag bei ca. 50000 units/ml. Die Immunisierungen mit mCD80-Ova-ORFV und mCD40L-mCD80-Ova-ORFV ergab im Vergleich zur Immunisierung mit Ova-ORFV eine leicht, jedoch nicht signifikant erhöhte Konzentration an IgG2 mit ca. 90000 units/ml bzw. 80000 units/ml. Die Varianz innerhalb der Ova-ORFV-, mCD40L-Ova-ORFV- und mCD80-Ova-ORFV-immunisierten Gruppen war sehr hoch. Während im Serum einer Ova-ORFV-immunisierten Maus mit ca. 230000 units/ml eine sehr hohe Konzentration an Ova-spezifischen IgG2 gemessen wurde, konnte in einer anderen Ova-ORFV immunisierten Maus kein IgG2 gemessen werden (Abbildung 3.47 B).

## Ergebnisse



**Abbildung 3.47: Quantifizierung Ova-spezifischer IgG1- und IgG2-Antikörper nach Immunisierung mit verschiedenen ORFV-Rekombinanten.** C57BL/6NTac Mäuse wurden intramuskulär (i.m.) mit  $10^6$  pfu/ml Ova-ORFV, mCD40L-Ova-ORFV, mCD80-Ova-ORFV oder mCD40L-mCD80-Ova-ORFV immunisiert. Die *Prime*-Immunisierung erfolgte an Studientag 0 gefolgt von einer *Boost*-Immunisierung an Tag 14. 7 Tage nach *Boost*-Immunisierung wurde die Konzentration Ova-spezifischer IgG1- (A) und IgG2-Antikörper (B) im Serum mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Werte der einzelnen Tiere sowie die berechneten Mittelwerte. Die statistische Analyse erfolgte durch einen ungepaarten t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %.

### 3.2.4.2 Die Effizienz der ORFV-Rekombinanten im Tumormodell

Um die anti-tumorale Wirksamkeit der mCD40L, mCD80 und mCD40L/mCD80 exprimierenden ORFV-Rekombinanten gegenüber der Ova-ORFV-Rekombinante zu vergleichen, wurde das B16-F10(OVA)-Tumormodell in C57BL/6NTac Mäusen genutzt. Am Studienbeginn wurden hierfür pro Maus  $5 \times 10^5$  Zellen der B16-F10(OVA) Melanom-Zelllinie subkutan (s.c.) injiziert. 5 Tage und 15 Tage nach Tumorgabe erfolgten die i.m. Immunisierungen der Mäuse mit jeweils  $1 \times 10^6$  pfu/ml Ova-ORFV, mCD40L-Ova-ORFV, mCD80-Ova-ORFV bzw. mCD40L-mCD80-Ova-ORFV. Vier weitere Gruppen wurden zusätzlich zu den ORFV-Immunisierungen mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren (CPI) behandelt. Hierfür wurde den Mäusen an Studientag 8, 11, 14, 18 und 22 eine Kombination von jeweils 10 mg/kg LAG3-Antikörper und 10 mg/kg PD-1-Antikörper intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Als Kontrollgruppen dienten Mäuse, die nur mit CPI oder PBS behandelt wurden. Pro Gruppe wurden die Überlebensrate und die Tumorgroße von 12 Mäusen bestimmt. Anhand des Tumorstadiums wurden die Mäuse in 3 verschiedene Gruppen unterteilt: Als „Nonresponder“ werden Mäuse bezeichnet, bei denen die Immunisierungen keinen Effekt auf das Tumorstadium hatten. Als „Partielle Responder“ gelten Mäuse, bei welchen nach Immunisierung ein reduziertes Tumorstadium beobachtet wurde. Mäuse, die am Ende der Studie Tumorstadium-frei waren, werden als „Komplette Responder“ bezeichnet.

## Ergebnisse

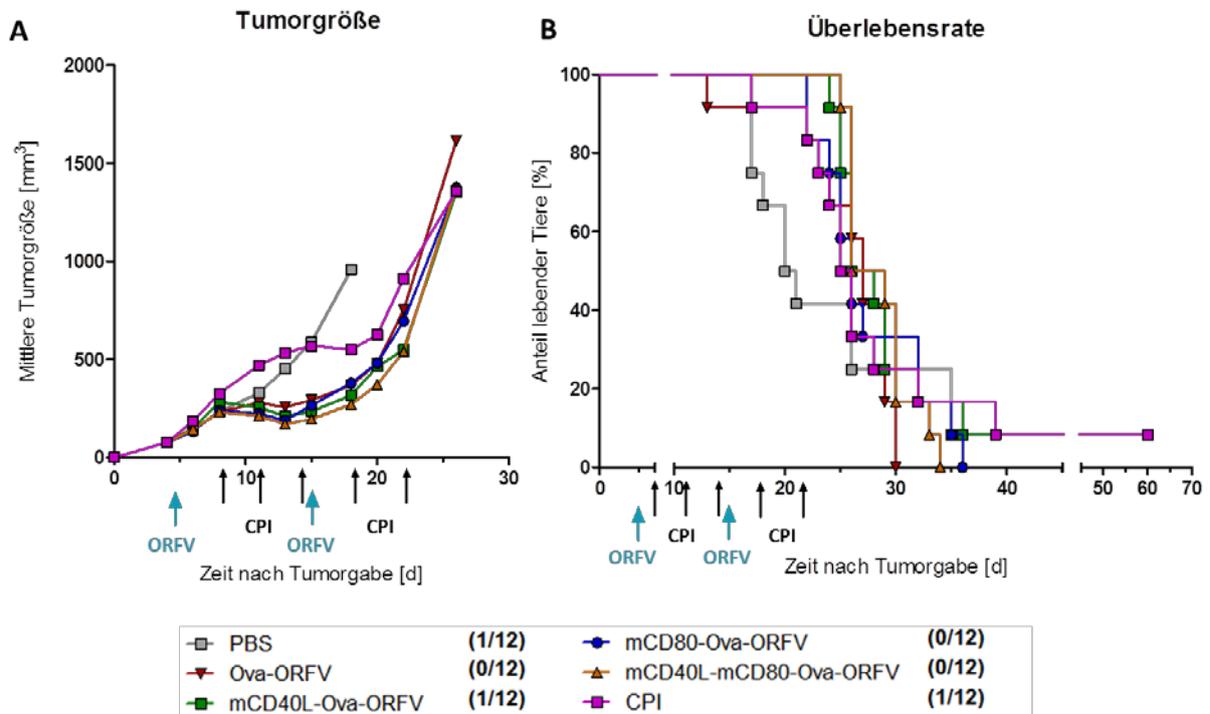
Wie in Abbildung 3.48 A und C zu sehen, stiegen die Tumorgrößen in jeder Gruppe bis zu Studientag 8 stetig an. An Studientag 8 wurde in den Gruppen der mit Ova-ORFV, mCD40L-Ova-ORFV, mCD80-Ova-ORFV und mCD40L-mCD80-Ova-ORFV immunisierten Mäuse mit und ohne zusätzliche CPI-Behandlung ein Rückgang der Tumorgrößen beobachtet. Bei den Mäusen der Kontrollgruppen (PBS) wurde dagegen kontinuierliches Tumorwachstum beobachtet. Betrachtet man die Inhibierung des Tumorwachstums, wurde die größte Reduktion des Tumolvolumens ohne zusätzliche Behandlung mit CPI in den Gruppen der CD40L-Ova-ORFV- und CD40L-CD80-Ova-ORFV-immunisierten Mäuse beobachtet (Tabelle 3.7). Im Vergleich zu den Gruppen, die mit ORFV immunisiert wurden, wurde das Tumorwachstum in den Mäusen, die ORFV und CPI in Kombination erhalten haben, verlangsamt. Während die Tumorgrößen der ORFV-immunisierten Gruppen bereits an Tag 15 zunahm, war in den Gruppen, die mit ORFV und CPI immunisiert wurden erst ab Tag 20 erneutes Tumorwachstum zu beobachten. Auch die Inhibierung des Tumorwachstums nahm bei Immunisierung mit ORFV in Kombination mit CPI auf über 75 % zu (Tabelle 3.7). Die geringsten Tumorgrößen wurden dabei in den Gruppen gemessen, die mit mCD40L-Ova-ORFV und mCD40L-mCD80-Ova-ORFV in Kombination mit CPI immunisiert wurden (Abbildung 3.48 C). Die Inhibierung des Tumorwachstums konnte durch die Kombination von CPI und CD40L-Ova-ORFV und CD40L-CD80-Ova-ORFV im Vergleich zur Immunisierung ohne CPI auf über 90 % gesteigert werden (Tabelle 3.7).

Auch bei Betrachten der Überlebensrate war die Überlegenheit der beiden mCD40L-exprimierenden ORFV-Rekombinanten zu erkennen. Von den ORFV-immunisierten Gruppen war nur eine Maus, die mit mCD40L-Ova-ORFV immunisiert wurde ein „Kompletter Responder“ (Tabelle 3.7). Die Kombination von CPI und ORFV-Immunsierung hatte einen positiven synergistischen Effekt auf das Überleben der Mäuse. Der Anteil an „Partiellen Respondern“ und „Kompletten Respondern“ war deutlich größer als in den Gruppen, die nur mit ORFV immunisiert wurden (Tabelle 3.7). Am Ende der Studie überlebten 4 der 12 Tiere in den mCD40L-Ova-ORFV + CPI und mCD40L-mCD80-Ova-ORFV + CPI immunisierten Gruppen, jeweils eine Maus überlebte in den Kontrollgruppen (PBS und CPI) sowie der mCD40L-Ova-ORFV- und der mCD80-Ova-ORFV + CPI-immunisierten Gruppe („Komplette Responder“). Diese Mäuse waren am Ende der Studie (Studientag 60) Tumor-frei (siehe Anhang: Abbildung 0.4 A, C, F, H, I und J). Keine Maus überlebte die Tumorgabe nach Immunisierung mit Ova-ORFV, mCD80-Ova-ORFV, mCD40L-mCD80-Ova-ORFV oder Ova-ORFV + CPI (Abbildung 3.48 B und D). Im Vergleich zur Kombination von CPI und ORFV nahm der Anteil lebender Tiere mit dem Einstellen der CPI-Behandlung an Studientag 22 in der CPI-Kontrollgruppe sehr stark ab. Die zusätzliche ORFV-Immunsierung resultierte im Vergleich zur alleinigen CPI-Behandlung in verlängertem Überleben (Abbildung 3.48 B).

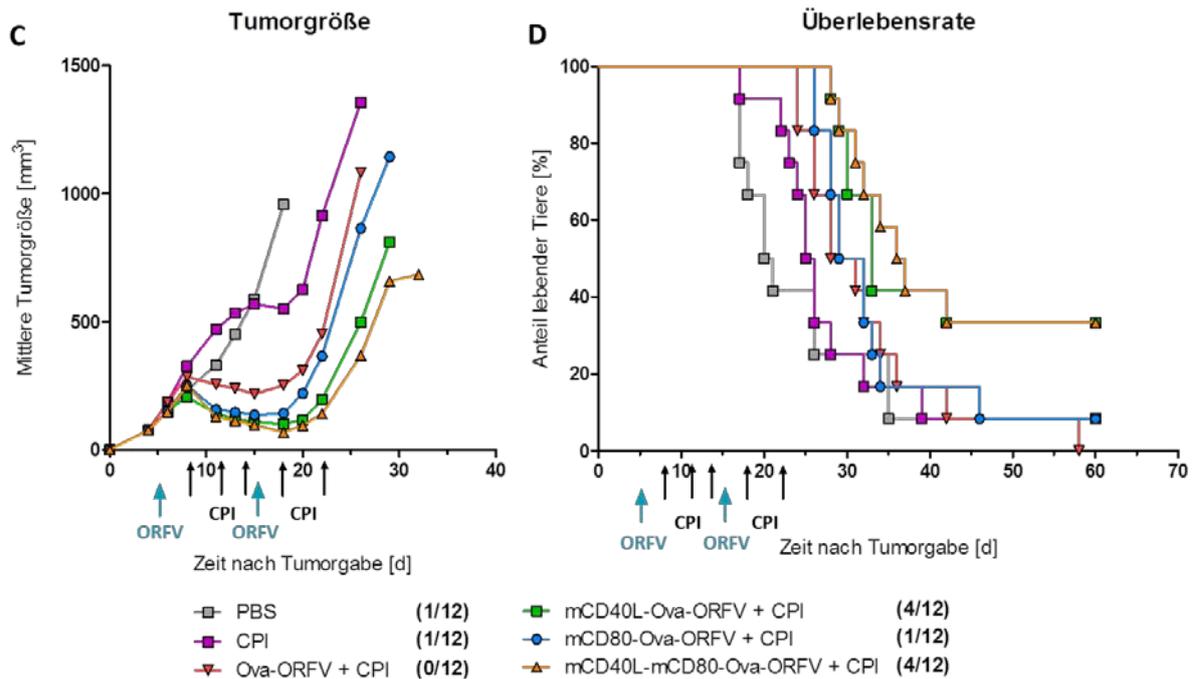
## Ergebnisse

**Tabelle 3.7: Anteil der Nonresponder, Partiiellen Responder und Kompletten Responder im Tumormodell sowie die Inhibierung des Tumorwachstums.** Dargestellt ist die Anzahl der Mäuse bei welchen nach Immunisierung kein Effekt auf das Tumorwachstum zu erkennen war (Nonresponder), ein Rückgang der Tumorgröße zu beobachten war (Partielle Responder) oder die am Ende der Studie Tumor-frei waren (Komplette Responder) sowie die Inhibierung des Tumorwachstums in Prozent.

	Nonresponder	Partielle Responder	Komplette Responder	Inhibierung des Tumorwachstums
<b>PBS</b>	10/12	1/12	1/12	0 %
<b>Ova-ORFV</b>	7/12	5/12	0/12	51 %
<b>mCD40L-Ova-ORFV</b>	7/12	4/12	1/12	70 %
<b>mCD80-Ova-ORFV</b>	7/12	5/12	0/12	63 %
<b>mCD40L-mCD80-Ova-ORFV</b>	7/12	5/12	0/12	74 %
<b>CPI</b>	8/12	3/12	1/12	35 %
<b>Ova-ORFV + CPI</b>	6/12	6/12	0/12	75 %
<b>mCD40L-Ova-ORFV + CPI</b>	3/12	5/12	4/12	90 %
<b>mCD80-Ova-ORFV + CPI</b>	4/12	7/12	1/12	86 %
<b>mCD40L-mCD80-Ova-ORFV + CPI</b>	1/12	7/12	4/12	93 %



## Ergebnisse

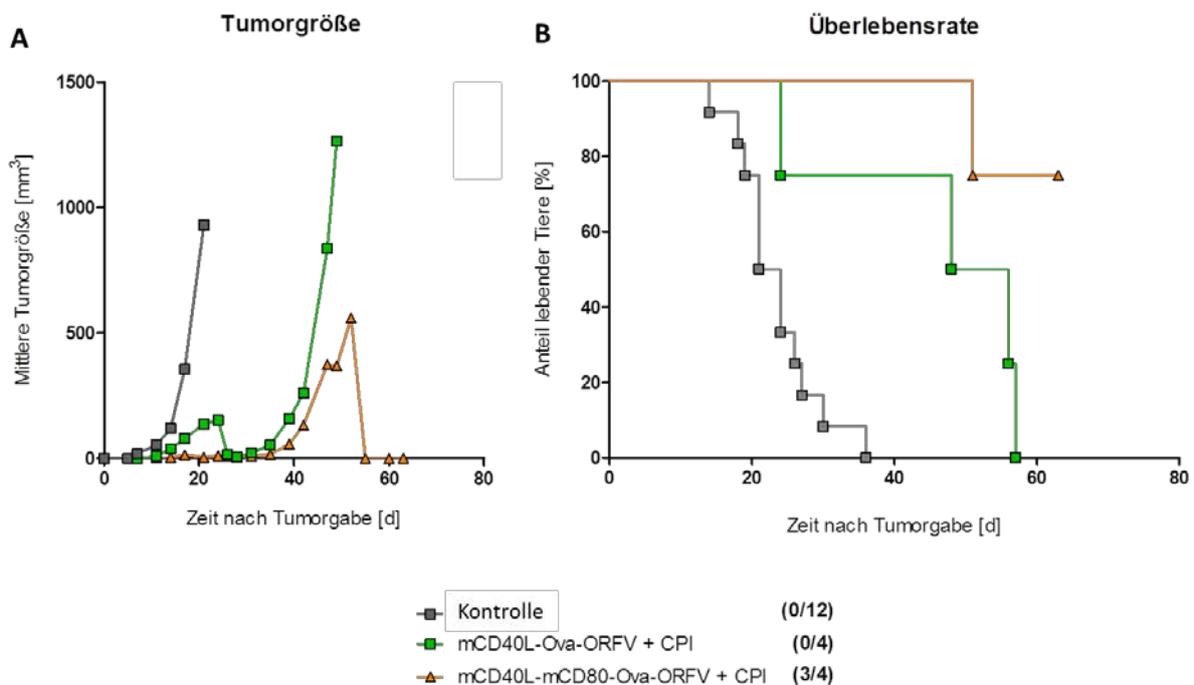


**Abbildung 3.48: Anti-tumorale Wirksamkeit verschiedener ORFV-Rekombinanten im Tumormodell B16-F10(OVA).** Je C57BL/6NTac Maus wurden  $5 \times 10^5$  Zellen der Zelllinie B16-F10(OVA) subkutan (s.c.) injiziert. 5 Tage und 15 Tage nach Tumorgabe erfolgten die i.m. Immunisierungen der Mäuse mit jeweils  $1 \times 10^6$  pfu/ml Ova-ORFV, mCD40L-Ova-ORFV, mCD80-Ova-ORFV bzw. mCD40L-mCD80-Ova-ORFV in Kombination mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren (CPI). CPI wurden an Studientag 8, 11, 14, 18 und 22 intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Zur Kontrolle wurden Mäuse mit CPI oder PBS immunisiert. A) Mittelwert der gemessenen Tumore. B) Überlebensrate der unterschiedlichen Gruppen, dargestellt als Anteil lebender Tiere. Pfeile kennzeichnen die Studientage, an denen Mäuse mit ORFV immunisiert (blau) oder mit CPI behandelt (schwarz) wurden. In Klammern ist die Zahl der lebenden Mäuse nach Versuchsende angegeben.

Im nächsten Schritt sollte nun überprüft werden, ob die überlebenden Mäuse („Komplette Responder“) gegen eine *Rechallenge* mit einer B16-F10 Zelllinie geschützt sind. Dabei sollte geklärt werden, ob die Immunisierung mit Ova-exprimierenden ORFV-Rekombinanten zu einer effektiven Zerstörung des Tumors und einer Freisetzung von Tumor-Antigenen führt, sodass neben der Ova-spezifischen Immunantwort auch Immunantworten gegen weitere Tumor-Antigene der B16-F10-Melanom-Zelllinie induziert werden (*Antigen Spread*). Hierfür wurden den überlebenden Mäusen jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen der Melanom-Zelllinie B16-F10 subkutan (s.c.) injiziert. Im Gegensatz zu der ersten verwendeten Zelllinie exprimiert diese kein Ova. Somit wurde sichergestellt, dass der gemessene Effekt nicht durch eine Ova-spezifische Immunantwort ausgelöst wird. Nach Tumordinjektion wurden die Tumorgroessen sowie der Anteil lebender Tiere bestimmt. Zur Kontrolle wurden bei 12 naiven Mäusen die Tumorzellen injiziert.

## Ergebnisse

Wie in Abbildung 3.49 dargestellt, wuchsen die Tumore in der Kontrollgruppe sehr schnell und keine der Mäuse überlebte länger als Tag 35. In den mit mCD40L-Ova-ORFV + CPI und mCD40L-mCD80-Ova-ORFV + CPI immunisierten Gruppen war das Tumorstadium dagegen deutlich langsamer. In 3 der 4 mit mCD40L-Ova-ORFV + CPI immunisierten Mäusen wurde das Tumorstadium bis Studientag 35 gut kontrolliert (siehe Anhang: Abbildung 0.5 B). Das Tumorstadium in den mit mCD40L-mCD80-Ova-ORFV + CPI immunisierten Mäusen war sehr stark verzögert, hier konnten erst nach 40 Tagen bei einer von 4 Mäusen Tumore gemessen werden (Abbildung 3.49 A, siehe Anhang: Abbildung 0.5 C). Daher war auch der Anteil überlebender Tiere in der mit mCD40L-mCD80-Ova-ORFV + CPI immunisierten Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen deutlich erhöht. 3 von 4 Mäusen zeigten kein Tumorstadium und überlebten die erneute Tumorgabe (siehe Anhang: Abbildung 0.5 C). Kein Tier der Kontrollgruppe und der mit mCD40L-Ova-ORFV + CPI immunisierten Gruppe überlebte die erneute Tumorgabe (Abbildung 3.49 B).



**Abbildung 3.49: Antigen Spread nach Tumorthherapie mit ORFV-Rekombinanten.** C57BL/6NTac Mäusen wurden 70 Tage nach erster Tumorgabe und 60 Tage nach *Boost*-Immunisierung mit mCD40L-Ova-ORFV und mCD40L-mCD80-Ova-ORFV  $5 \times 10^5$  Zellen der Zelllinie B16-F10 subkutan (s.c.) injiziert. Als Kontrolle dienen naive Mäuse. A) Mittelwert der gemessenen Tumore. B) Überlebensrate der unterschiedlichen Gruppen, dargestellt als Anteil lebender Tiere. In Klammern ist die Zahl der lebenden Mäuse nach Versuchsende angegeben.

## 4 - Diskussion

---

Virale Vektoren sind in der Lage starke Immunantworten zu induzieren und gelten daher als vielversprechende Technologie bei der Entwicklung von Impfstoffen. Neben dem Einsatz als prophylaktische Vakzine gegen Infektionskrankheiten werden sie für die therapeutische Behandlung von Krebs weiterentwickelt [8, 9]. Auf ORFV basierende rekombinante Vektoren wurden in der Vergangenheit erfolgreich zur Entwicklung prophylaktischer Impfstoffe genutzt. In unterschiedlichen Spezies konnte gegen verschiedene Infektionskrankheiten eine starke, langlebige humorale Immunantwort induziert und Schutz vermittelt werden. [94-101]. Inwieweit auch zytotoxische T-Zellen induziert werden und zum Schutz beitragen, ist hingegen unklar. So hatte die Depletion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Immunisierung mit ORFV keinen negativen Einfluss auf den Schutz vor Tollwut- oder Influenzavirus Infektionen [97, 100]. Hingegen vermutete Rohde et al. einen T-Zell-basierten Schutz von Kaninchen vor Infektion mit RHDV (*Rabbit Hemorrhagic Disease Virus*), ohne jedoch einen direkten Nachweis Antigen-spezifischer T-Zellen zu erbringen [218]. Der zugrunde liegende Mechanismus der Induktion der adaptiven Immunantwort nach Immunisierung ist darüber hinaus nur wenig verstanden.

Ziel dieser Arbeit war es den Mechanismus der Immunstimulierung des ORFV-Stamms D1701-V zu untersuchen und damit einhergehend dessen Eignung als Vektor für therapeutische Vakzinierungen zu evaluieren. Neben dem Zell-Tropismus von ORFV in humanen PBMCs wurde auch dessen Fähigkeit zur Aktivierung von APCs und zur Induktion von Antigen-spezifischen Immunantworten *in vitro* und *in vivo* betrachtet. Zudem sollte die Immunogenität des Vektors durch die gezielte Integration ko-stimulatorischer Elemente weiter gesteigert werden.

### 4.1 Mechanismus der ORFV-induzierten Immunstimulierung

#### 4.1.1 Zell-Tropismus von ORFV in humanen Leukozyten

Die Analyse des Zell-Tropismus von ORFV in humanen PBMCs ergab, dass Monozyten infiziert werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass auch weitere professionelle APCs wie bspw. Makrophagen und DCs empfänglich für ORFV sind. Eine Infektion von T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen wurde hingegen weder in PBMCs noch in Monozyten-depletierten PBMCs nachgewiesen wodurch ausgeschlossen werden kann, dass Monozyten lediglich bevorzugt infiziert werden. Vielmehr scheint eine Infektion von T-, B- und NK-Zellen generell nicht möglich zu sein. Versuche mit Kaninchen-PBMCs konnten diesen ORFV-Tropismus bestätigen. Nach Infektion von isolierten Kaninchen-PBMCs mit D1701-V-Cherry wurde nur in Monozyten die Expression von mCherry beobachtet (Daten nicht gezeigt). Für den Canarypoxvirus Vektor ALVAC sowie VACV konnte ebenfalls eine bevorzugte Infektion von Monozyten demonstriert werden. Anders als mit ORFV wurden mit diesen Vektoren zu einem geringen Anteil auch B-Zellen infiziert. VACV war zudem in der Lage, NK-Zellen und T-Zellen zu infizieren [219]. Für MVA, den am besten beschriebenen viralen Vektor in der Familie der Pockenviren, wurde ein ähnlicher Zell-Tropismus festgestellt.

## Diskussion

2008 untersuchten Liu et al. mit Hilfe eines GFP exprimierenden MVA den Zell-Tropismus in murinen PBMCs sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Neben der präferierten Infektion von professionellen APCs (CD11c+ DCs und CD11b+ CD11c- Makrophagen) wurden mit MVA zu einem geringeren Anteil auch B-Zellen und T-Zellen infiziert [220]. Flechsig et al. zeigten 2011 bei der Aufklärung des Zell-Tropismus von MVA in humanen PBMCs ebenfalls die präferierte Infektion von Monozyten, gefolgt von B-Zellen und NK-Zellen [221]. Die Ergebnisse von Liu et al. und Flechsig et al. konnten 2017 durch Altenburg et al. verifiziert werden. In einer groß angelegten Studie wurde der Zell-Tropismus von MVA *in vitro* in humanen PBMCs, *ex vivo* in murinen Lungen-Explantaten sowie *in vivo* in Mäusen, Frettchen und Makaken nach intranasaler Tröpfcheninfusion und nach intramuskulärer Injektion untersucht. Unabhängig vom experimentellen Set-Up, dem Tiermodell oder der Applikations-Route wurde die präferierte Infektion von professionellen APCs nachgewiesen [222]. Über den Zell-Tropismus von ORFV *in vivo* ist bislang nur wenig bekannt. Als epitheliotropes Virus gelangt der Wildtyp-Stamm über Läsionen in der Haut in den Wirt, wo er proliferierende Keratinozyten infiziert [81]. Im Zuge dieser Arbeit wurde der Zell-Tropismus von D1701-V *in vivo* nicht untersucht und muss in zukünftigen Immunisierungsversuchen aufgeklärt werden.

Viren verwenden verschiedene Mechanismen, um in die Zielzellen zu gelangen. Neben der Fusion der Virushülle mit der Zellmembran nutzen Viren unter anderem die Aufnahme über Endozytose [223]. Da ORFV ausschließlich in professionellen APCs nachgewiesen werden konnte, wurde untersucht, ob der Zelleintritt von ORFV abhängig von den Aufnahmemechanismen der APCs ist. Über verschiedene Mechanismen nehmen unreife DCs im peripheren Gewebe Antigene auf, was die Aktivierung und Reifung der DCs bewirkt [126]. Die durch die Reifung bedingten funktionellen und morphologischen Veränderungen führen zu einer optimierten Antigen-Prozessierung und Präsentation. Reife DCs migrieren in die Lymphknoten, wo sie die prozessierten antigenen Peptide über MHC Klasse I- und II-Moleküle den T-Zellen präsentieren und somit Antigen-spezifische Immunantworten induzieren. Die Fähigkeit zur Aufnahme und Prozessierung von Antigenen ist in reifen DCs inhibiert. Dadurch wird vermieden, dass zusätzliche Antigene aufgenommen und präsentiert werden [217]. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, war es nicht möglich durch LPS gereifte DCs mit ORFV zu infizieren. Daher lag die Vermutung nahe, dass ORFV über einen Aufnahmemechanismus in die Zellen gelangt der bei iDCs noch aktiv, bei mDCs jedoch inhibiert ist. Bei den verschiedenen Aufnahmemechanismen der DCs wird zwischen der spezifischen Rezeptor-vermittelten Phagozytose und der unspezifischen Rezeptor-unabhängigen Makropinozytose unterschieden [123]. Beide Aufnahmemechanismen sind abhängig von der Aktin-Polymerisation. Um zu untersuchen, ob mindestens einer dieser Mechanismen an der Aufnahme von ORFV in die Zelle beteiligt ist, wurde die Aktin-Polymerisation mit Cytochalasin D inhibiert. Die Behandlung mit Cytochalasin D verhinderte die Aufnahme von ORFV sowohl in DCs als auch in Makrophagen. Somit konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme in die APCs von der Aktin-Polymerisation abhängig ist. Zur weiteren Differenzierung zwischen Phagozytose und Makropinozytose wurden die APCs im nächsten Schritt mit Rottlerin behandelt. Singla et. al konnten 2018 demonstrieren, dass die *Protein Kinase C Isoform Delta* (PKC $\delta$ ) eine zentrale Rolle in der Makropinozytose unreifer DCs spielt. In früheren Studien wurde Rottlerin als ein spezifischer Inhibitor der PKC $\delta$  identifiziert [215, 216]. Durch die Behandlung mit 3  $\mu$ M und 10  $\mu$ M Rottlerin konnte die Aufnahme von ORFV in die APCs reduziert werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ORFV unter anderem mittels Makropinozytose in die Zellen gelangt. Auch für andere Viren wurde die Makropinozytose als Weg in die Zelle identifiziert. So nutzen die reifen Virionen des

Vaccinia Virus die Makropinozytose, um mittels apoptotischer Mimikry die Zielzellen zu infizieren [224]. Auch für das Adenovirus 3, das Herpes simplex virus 1 und verschiedene Viren der Picornaviridae-Familie wurde eine Internalisation via Makropinozytose mit Hilfe verschiedener Inhibitoren demonstriert [225]. Allerdings ist zu beachten, dass die genannten Viren einen breiteren Zelltropismus als ORFV besitzen. Während die Rezeptor-vermittelte Phagozytose eine Eigenschaft weniger spezialisierter Zellen ist, sind viele verschiedene Zelltypen fähig zur Makropinozytose [225, 226]. Bei einer Aufnahme von ORFV alleine über die Makropinozytose wäre ein breiterer Zelltropismus zu erwarten. So besitzen z.B. NK-Zellen ebenfalls die Fähigkeit zur Makropinozytose, diese konnten im Zuge dieser Arbeit jedoch nicht mit ORFV infiziert werden [227]. Daher ist es auch möglich, dass ORFV verschiedene Mechanismen nutzt, um in die Zielzellen zu gelangen. Um die Makropinozytose als Aufnahmemechanismus von ORFV zu bestätigen, sollte die Infektion von DCs nach Behandlung mit weiteren Inhibitoren der Makropinozytose getestet werden.

### **4.1.2 Aktivierung von humanen APCs und PBMCs nach ORFV-Infektion**

Für die Ausbildung einer adaptiven Immunantwort ist die Aktivierung der APCs essentiell. Daher wurde untersucht, ob APCs durch die Aufnahme von ORFV aktiviert werden. Die Expression von MHC-Molekülen und ko-stimulatorischen Molekülen auf APCs korreliert mit ihrer Fähigkeit zur Präsentation von Antigenen und der Aktivierung von T-Zellen. Im Zuge dieser Arbeit wurde anhand der verstärkten Expression der ko-stimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 sowie dem MHC Klasse II-Molekül HLA-DR die Aktivierung von APCs erfolgreich demonstriert. Bei DCs wurde zudem eine verstärkte Expression des Reifungsmarkers CD83 beobachtet. Bei Monozyten wurde vor allem CD86 signifikant hochreguliert. Die Expressionsstärke von CD80, HLA-DR und CD40 bei den Zellen verschiedener Spender war sehr heterogen, weshalb keine signifikante Änderung festgestellt werden konnte. Dagegen zeigten infizierte Makrophagen im Vergleich zu nicht infizierten Zellen eine signifikant stärkere Expression von CD80, CD86 und HLA-DR. Nach Infektion von DCs wurden die Marker CD80, CD83 und HLA-DR signifikant stärker exprimiert. CD86 und CD40 wurden Spender-anhängig nach Infektion entweder stärker oder schwächer exprimiert als auf nicht infizierten DCs. Bei der Analyse der Expression der Aktivierungsmarker war außerdem das Expressionsprofil der verschiedenen Marker zu erkennen. Während die Marker CD86, HLA-DR und CD40 konstitutiv auch auf unstimulierten APCs exprimiert und nach Aktivierung hochreguliert werden, wurde die Expression der Marker CD80 und CD83 erst bei Aktivierung induziert. Dieses Expressionsprofil der analysierten Marker ist bereits beschrieben [125, 147, 173]. Zusätzlich zur Analyse der Expression der Aktivierungsmarker zeigte die parallele Infektion mit zwei verschiedenen ORFV-Rekombinanten die Aktivierung und Reifung der APCs. Nach einer ersten Infektion mit V-D12-Cherry konnten mit zunehmender Infektionsdauer immer weniger APCs mit einer weiteren ORFV-Rekombinanten (V-GFP) infiziert werden. Dies weist darauf hin, dass durch V-D12-Cherry aktivierte und gereifte APCs nicht mehr in der Lage sind, weitere ORFV-Partikel aufzunehmen.

In früheren Studien wurde die Aktivierung von APCs durch den ORFV-Stamm D1701-B, der Ursprungs-Stamm, aus welchem der ORFV Stamm D1701-V hervorging, untersucht. Siegemund et al. zeigten 2009 die verstärkte Expression von MHC I und II sowie CD86 nach Infektion von murinen aus Knochenmark generierten DCs (*Bone marrow derived DCs*, BMDCs) mit einem chemisch inaktivierten ORFV D1701-B [228]. Von Buttler et al. konnten 2014 die verstärkte

## Diskussion

Expression von CD86 auf BMDCs nach Infektion mit inaktiviertem sowie replikationsfähigem ORFV D1701-B bestätigen [229]. Interessanterweise führte in dieser Arbeit die Stimulierung der humanen APCs mit inaktiviertem D1701-V zu keiner verstärkten Expression der Aktivierungsmarker. Die Aktivierung von murinen BMDCs nach Stimulierung mit D1701-V wurde bislang nicht betrachtet. Die Analyse der Aktivierung von humanen APCs durch D1701-B erfolgte bisher lediglich über die Analyse der Zytokin-Produktion [106].

Verschiedene Studien analysierten in der Vergangenheit das Potenzial zur Antigen-Präsentation von MVA-infizierten APCs. Drillien et al. demonstrierten 2004 die Aktivierung von aus humanen Monozyten generierten DCs durch Infektion mit MVA anhand der verstärkten Expression von CD80, CD86 und CD83. Auch durch Hitze und UV-Strahlung inaktiviertes MVA induzierte die Aktivierung der DCs [230]. Flechsig et al. konnten dies 2011 weitgehend bestätigen. Die Infektion von humanen Monozyten führte dabei zu einer verstärkten Expression von CD86 und dem MHC Klasse II-Molekül HLA-DR. Auch DCs konnten durch Infektion mit MVA aktiviert werden, was durch eine Hochregulierung von CD40, CD86 und CD83 bewiesen wurde. Die verstärkte Expression von CD80 wurde im Gegensatz zu Drillien et al. jedoch nicht beobachtet [221].

Allgemein wurde bei der Analyse der Aktivierung der APCs verschiedener Spender deutlich, dass nach Infektion mit ORFV der Anteil infizierter Zellen sehr Spender-abhängig ist. Bspw. führte die Infektion von Monozyten zweier unterschiedlicher Spender bei gleicher MOI zu stark unterschiedlichen Infektionsraten von 5 % bzw. 20 %. Auch bei der Infektion von Makrophagen und DCs konnte diese spenderabhängige Varianz beobachtet werden. Möglicherweise spielt hierbei der Aktivierungs- und Reifungsstatus der Zellen und die damit verbundene Fähigkeit zur Phagozytose eine entscheidende Rolle. Die verwendeten APCs wurden aus dem Blut verschiedener Spender isoliert. Unterschiedliche physiologische Faktoren wie der Hormonspiegel oder vorherige Infektionen der Spender wurden für die Arbeiten nicht berücksichtigt, können den Status von Immunzellen und die Zusammensetzung der PBMCs jedoch stark beeinflussen [231]. Dies könnte die große inter-experimentelle Varianz bei der Analyse der APCs unterschiedlicher Spender erklären.

Wie für Monozyten, Makrophagen und DCs gezeigt, hatte der Anteil infizierter Zellen Einfluss auf die Expressionsstärke der einzelnen Aktivierungsmarker und auf deren Zellviabilität. Dabei war jedoch keine direkte Korrelation zwischen dem Anteil infizierter Zellen und der Expressionsstärke der Marker zu erkennen. So führte eine höhere Infektionsrate bei den Zellen mancher Spender zu einer verstärkten, bei anderen Spendern zu einer verminderten Expression der Marker. Daher ist anzunehmen, dass neben der Infektionsrate auch weitere Faktoren, wie der Zustand der Immunzellen, Einfluss auf die Expression der Aktivierungsmarker haben. Nach Infektion der APCs wurde beobachtet, dass die Größe der Zellen mit steigender Infektionsrate abnimmt. Bei Monozyten und Makrophagen wurde zudem ein Rückgang der CD14-Expression festgestellt. Ein Rückgang der Fluoreszenzstärke der analysierten Marker könnte folglich durch einen Rückgang der Zellgröße erklärt werden. Auch die Infektion von Monozyten und DCs mit MVA führten *in vitro* zu einer Veränderung der Zell-Morphologie. Durch Färbung mit Annexin V konnte gezeigt werden, dass die nach Infektion zunehmenden kleinen Zellen apoptotisch bzw. nekrotisch sind. Außerdem konnte auch nach MVA-Infektion ein Rückgang der CD14-Expression auf infizierten Monozyten festgestellt werden [221, 232]. Ein Zusammenhang zwischen der Induktion von Apoptose und dem

## Diskussion

Rückgang der CD14-Expression auf humanen Monozyten *in vitro* wurde bereits beschrieben [233, 234]. Im Zuge dieser Arbeit konnte Apoptose in ORFV-infizierten APCs jedoch nicht beobachtet werden: So wurden 2 h – 24 h nach ORFV-Infektion von Monozyten, Makrophagen und DCs die Apoptose-Marker Annexin V oder die aktiven Caspasen 3 und 7 nicht detektiert (Daten nicht gezeigt).

Zur weiteren Analyse der Aktivierung von APCs wurde die Zytokinproduktion von DCs und PBMCs untersucht. Nach Infektion mit ORFV wurden in den Überständen der DCs signifikant erhöhte Konzentrationen an IL-6 und CXCL10 detektiert. Beide pro-inflammatorischen Zytokine spielen bei der Ausbildung einer zellulären Immunantwort eine wichtige Rolle [235, 236]. IL-6 ist ein Zytokin, das bei Infektionen und Entzündungen von verschiedenen Zellen wie T-Zellen, B-Zellen und Monozyten produziert wird. Es hat einen pleiotropen Effekt auf die Immunantwort, so induziert es zum einen bei aktivierten B-Zellen die Differenzierung in Antikörperproduzierende Plasma-Zellen [237]. Des Weiteren fördert es die Differenzierung von CD8+ T-Zellen in zytotoxische T-Zellen und ist notwendig für die Differenzierung von naiven CD4+ T-Zellen in Th17-Zellen [238, 239]. CXCL10 wird unter pro-inflammatorischen Bedingungen von verschiedenen Zellen wie Leukozyten, Monozyten, Epithel- oder Endothelzellen produziert und lockt vor allem T-Zellen, Monozyten und NK-Zellen zum Entzündungsort. Durch Bindung an den Rezeptor CXCR3 aktiviert CXCL10 neben T-Zellen auch NK-Zellen, Makrophagen und B-Zellen [240-242]. Auch die Chemokine IL-8 (CXCL8), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) und CCL5 (RANTES) konnten in den Überständen infizierter DCs in geringfügig höheren Konzentrationen im Vergleich zu nicht infizierten DCs gemessen werden. Die Stimulierung der DCs mit inaktiviertem ORFV induzierte dagegen keine Produktion der analysierten Zytokine. Die Infektion von PBMCs resultierte in einer Produktion von CCL2 (MCP-1), CCL3, CCL5 und CXCL10. Hierbei wurde auch nach Stimulierung mit inaktiviertem ORFV eine signifikant erhöhte Konzentration an CCL2 gemessen. Die Chemokine CCL2, CCL3, CCL5 und IL-8 werden von verschiedenen Zelltypen wie Makrophagen, Monozyten, Epithel- und Endothelzellen produziert und dienen der Aktivierung von T-Zellen, Makrophagen, Monozyten und NK-Zellen und deren Rekrutierung an den Infektions- und Entzündungsort [243-246]. 2004 analysierten Friebe et al. die Zytokinproduktion von humanen PBMCs nach Infektion mit inaktiviertem ORFV D1701-B und detektierten dabei die Produktion von TNF $\alpha$ , IL-8, IL-6 und IL-10 mittels ELISA. Außerdem konnte die Produktion von IFN $\gamma$  nach Stimulierung mit Concanavalin A durch eine simultane Stimulation mit inaktiviertem D1701-B gesteigert werden. Die Produktion von IFN $\gamma$  erfolgte dabei lediglich in Gegenwart des Komplementsystems, als die Kultivierung der PBMCs in Medium und unbehandeltem humanen Serum stattfand. Wurde das Serum dagegen durch Hitze inaktiviert, konnte auch nach Infektion mit D1701-B keine IFN $\gamma$ -Produktion detektiert werden [106]. Da auch in dieser Arbeit die Kultivierung der DCs und PBMCs in Medium mit hitzeinaktiviertem Serum und folglich in Abwesenheit des Komplementsystems stattfand, wäre es im nächsten Schritt interessant, die Zytokinproduktion von APCs und PBMCs ebenfalls in Gegenwart des Komplementsystems zu untersuchen. Dadurch könnten zudem verlässlichere Vorhersagen für die *in vivo*-Produktion von Zytokinen getroffen werden. Außerdem gilt zu beachten, dass der in dieser Arbeit verwendete ORFV-Stamm D1701-V ein an das Wachstum in Vero-Zellen adaptierter Abkömmling des D1701-B Stammes ist. Die Adaption an Vero-Zellen bewirkte im Genom von D1701-V im Vergleich zu D1701-B den Verlust von 7 *Open Reading Frames* (ORFs) innerhalb dreier großer Deletionsbereiche [93]. Die Funktion einiger in diesen ORFs kodierten Proteine ist bislang nicht bekannt. Daher lassen sich die Auswirkungen der

## Diskussion

beiden ORFV-Stämme auf die Aktivierung von APCs nur schwer durch die genomischen Veränderungen begründen. Ein weiterer Unterschied besteht in der Inaktivierung der beiden Stämme. Während bei Friebe et al. ein chemisch inaktivierter ORFV-Stamm verwendet wurde, wurde D1701-V in dieser Arbeit mittels Hitze inaktiviert. Um die Aktivierung der APCs durch die beiden inaktivierten Stämme direkt vergleichen zu können, sollte dieselbe Methode zur Inaktivierung verwendet werden.

Die Aktivierung von professionellen Antigen-präsentierende Zellen wie DCs und Makrophagen spielt eine zentrale Rolle in der Induktion von adaptiven Immunantworten. Sowohl die verstärkte Expression der Aktivierungsmarker auf APCs als auch die Produktion verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine nach Infektion zeigen, dass ORFV professionelle APCs effektiv aktiviert.

Um die Auswirkung von ORFV-infizierten APCs auf die Aktivierung von T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen zu untersuchen, wurde die Expression von CD69 betrachtet. CD69 ist ein früher Aktivierungsmarker auf Lymphozyten und ist als ko-stimulatorisches Molekül bei deren Proliferation beteiligt [247]. Nach Infektion von PBMCs erhöhte sich der Anteil CD69+ T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen signifikant. Die stärkste Aktivierung wurde bei NK-Zellen beobachtet. Als Teil des angeborenen Immunsystems spielen NK-Zellen eine zentrale Rolle bei der Bekämpfung von viralen Infektionen. Auch für den inaktivierten und attenuierten ORFV-Stamm D1701-B konnte die Stimulierung der NK-Zell-Aktivität nachgewiesen werden [118, 248].

Wurden vor Infektion der PBMCs die Monozyten depletiert, konnte keine Aktivierung der weiteren PBMCs festgestellt werden, was darauf schließen lässt, dass das Vorhandensein von Monozyten für die Aktivierung der weiteren PBMC-Subtypen essentiell ist. Von aktivierten Monozyten produzierte Zytokine wie CXCL10 sind vermutlich der Grund für die Aktivierung der T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen nach ORFV-Infektion. Eine mögliche Erklärung weshalb ORFV lediglich APCs aktiviert und erst die Aktivierung der APCs die weitere Aktivierung der PBMCs bewirkt, könnte die Identifizierung eines ORFV-erkennenden Rezeptors liefern. Mit Hilfe von Knock-Out-Mäusen konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Aktivierung von konventionellen BMDCs (BM-cDCs) durch den ORFV-Stamm D1701-B unabhängig von den TLR-Adaptormolekülen MyD88 und TRIF initiiert wird, während die Aktivierung von plasmazytoiden BMDCs (BM-pDCs) von MyD88 abhängig ist [228]. Von Buttlar et al. konnten 2014 den endosomalen Rezeptor TLR9 als ORFV-erkennenden Rezeptor in BM-pDCs identifizieren [229]. TLR9 wird intrazellulär von verschiedenen Zellen wie Monozyten, DCs, Makrophagen, B-Zellen und NK-Zellen exprimiert. Die Aufnahme von ORFV durch APCs wäre daher eine Voraussetzung für eine TLR9-bedingte Aktivierung und könnte eine Erklärung dafür sein, dass die Aktivierung von PBMCs eine vorausgehende Aktivierung der Monozyten benötigt. Ob TLR9 jedoch bei der Erkennung des in dieser Arbeit verwendeten ORFV-Stammes D1701-V ebenfalls eine Rolle spielt und ob weitere Rezeptoren für die Aktivierung der APCs notwendig sind, wird Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein. Analog zu von Buttlar et al. könnte die Analyse der Aktivierung von BMDCs isoliert aus verschiedenen TLR Knock-Out-Mäusen nach Infektion mit ORFV im Vergleich zur Aktivierung von BMDCs isoliert aus Wildtyp-Mäusen Hinweise auf den entsprechenden Rezeptor geben.

### 4.1.3 Induktion von Antigen-spezifischen T-Zell-Antworten

Die Induktion von Antigen-spezifischen T-Zell-Antworten erfolgte zunächst *in vitro* mittels Expansion von CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen und dem *Priming* von naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Hierfür wurde eine ORFV-Rekombinante genutzt, die neben dem Fluoreszenzmarkergen mCherry drei HLA-A2-restringierte Epitope des HCMV als Minigene exprimiert, unter anderem das Epitop NLVPMVATV. Aufgrund seiner Immundominanz und der hohen Frequenz spezifischer naiver T-Zellen innerhalb der PBMCs HCMV-seronegativer Spender wurde die NLVPMVATV-spezifische Immunantwort in den Experimenten näher betrachtet [249]. Mittels Peptid-Stimulierung über 5 Tage wurde geprüft, ob die Spender NLVPMVATV-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen besitzen. Sowohl die Expansion von spezifischen T-Gedächtniszellen als auch das *Priming* von naiven T-Zellen mittels ORFV konnte in dieser Arbeit erfolgreich demonstriert werden. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse nach ORFV-Infektion zur positiven Kontrolle, der Peptid-Stimulierung, ist schwierig, da die Menge an präsentiertem Epitop auf den APCs nach Infektion mit ORFV bislang nicht bestimmt wurde. Gegen die weiteren im artifiziellen Antigen „PepTrio“ enthaltenen Epitope MLNIPSINV und VLEETSVML konnte im Zuge dieser Arbeit keine Aktivierung von naiven T-Zellen oder T-Gedächtniszellen mittels Tetramer-Färbung detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Mit Hilfe von intrazellulärer Zytokin-Färbung oder IFN $\gamma$ -ELISpot Assays (*Enzyme Linked Immuno Spot Assay*) sollte die T-Zell-Antwort gegen diese Epitope in Zukunft getestet werden.

In vorherigen Arbeiten konnte mehrfach gezeigt werden, dass ORFV-Vektoren in der Lage sind eine starke humorale Immunantwort gegen das rekombinante Antigen auszulösen. Ob und in welchem Maß auch eine zelluläre Immunantwort induziert wird war jedoch nicht Gegenstand dieser Untersuchungen [94, 95, 100, 101, 218]. Mit Hilfe einer Ova exprimierenden ORFV-Rekombinanten wurde die Induktion von Antigen-spezifischen T-Zell-Antworten *in vivo* untersucht. Zusätzlich sollte der Einfluss der Immunisierungsrouten auf die induzierte Immunantwort untersucht werden. Nach zweimaliger i.v. Immunisierung konnte der größte Anteil SIINFEKL-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut der immunisierten Mäuse gemessen werden. Der geringste Anteil wurde nach i.d. Immunisierung detektiert. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Funktionalität der SIINFEKL-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Sowohl der Anteil IFN $\gamma$ <sup>+</sup> als auch der Anteil CD107 $\alpha$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen war nach i.v. Immunisierung am größten. Der Anteil TNF $\alpha$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen war in allen Gruppen vergleichbar. Betrachtet man das Verhältnis von funktionalen T-Zellen zum Anteil Antigen-spezifischer T-Zellen fällt auf, dass ein Drittel der SIINFEKL-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach i.m. und i.d. Immunisierung sowohl IFN $\gamma$  als auch TNF $\alpha$  produzierten, während nach i.v. Immunisierung lediglich 10 % der SIINFEKL-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen IFN $\gamma$ <sup>+</sup> TNF $\alpha$ <sup>+</sup> waren. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal der Einfluss der Immunisierungsrouten auf die zytotoxische Immunantwort gegen ein ORFV-kodiertes Antigen untersucht. Vorherige Arbeiten untersuchten hingegen den Einfluss unterschiedlicher Immunisierungsrouten auf die Induktion der humoralen Immunität. So zeigte Amann et al., dass in Mäusen die i.m. oder i.v. Administration einer Rabies Glykoprotein exprimierenden ORFV-Rekombinante zu vergleichbar hohen Titern Virus-neutralisierender Antikörper führt. Der Antikörper-Titer war dabei deutlich höher als nach i.d. und subkutaner (s.c.) Immunisierung. Auch in Hunden führte die i.m. Immunisierung zu deutlich höheren Antikörper-Titern als die s.c. Immunisierung [97]. Der Schutz vor einer intrazerebralen Bornavirus-Infektion durch Immunisierung mit Bornavirus-Nukleoprotein p40 exprimierenden ORFV war dagegen nach i.m. Immunisierung am effizientesten [99]. Auch für MVA konnte in verschiedenen Tiermodellen gezeigt werden, dass die i.v. Immunisierung im Vergleich zur i.m. Immunisierung eine stärkere

zytotoxische Immunantwort gegen das jeweils exprimierte Antigen induziert [250, 251]. Fend et al. assoziierten die stärkere Immunantwort mit der Biodistribution von MVA, so konnte ein Großteil des exprimierten Antigens nach i.v. Immunisierung in den APCs in der Milz nachgewiesen werden [251]. Eine Analyse der Biodistribution von ORFV nach i.v. Immunisierung wäre als Teil zukünftiger Experimente daher sehr interessant. Zudem sollten weitere Immunisierungsrouten, wie die s.c. oder i.p. Immunisierung und deren Einfluss auf die Induktion von zellulären Immunantworten getestet werden.

## 4.2 Charakterisierung CD40L und CD80 exprimierender ORFV-Rekombinanten

Obwohl virale Vektoren bereits starke immunstimulatorische Eigenschaften mit sich bringen, werden verschiedene Methoden getestet, um die Immunogenität der Vektoren weiter zu steigern [187]. Eine Möglichkeit bietet dabei die zusätzliche Expression von ko-stimulatorischen Molekülen.

### 4.2.1 Charakterisierung der CD40L exprimierenden ORFV-Rekombinanten

Die Interaktion von CD40L mit CD40 auf der Oberfläche von APCs aktiviert verschiedene Signalkaskaden, die bei der Antigen-Präsentation, der Expression ko-stimulatorischer Moleküle und der Produktion von Zytokinen beteiligt sind [173, 252, 253]. Unter anderem werden dabei morphologische Veränderungen der DCs induziert, die sie zu effizienteren Antigen-präsentierenden Zellen machen. So werden neben dem MHC Klasse II-Molekül HLA-DR auch die ko-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 hochreguliert [254, 255]. Der Einsatz von agonistischen monoklonalen  $\alpha$ CD40-Antikörpern demonstrierte bereits erfolgreich den positiven Effekt der Aktivierung der CD40-Signalkaskade bei der Induktion von anti-tumoralen Immunantworten [256-258]. Die Stimulierung von DCs mit löslichem CD40L (sCD40L) führte ebenfalls zur verstärkten Aktivierung von Antigen-spezifischen T-Zell-Antworten [259]. Die Induktion der CD40-Signalkaskade stellt daher einen vielversprechenden Ansatz dar, die Immunogenität von viralen Vektoren zu verbessern.

Die *in vitro*-Charakterisierung der ORFV-Rekombinanten CD40L-PepTrio-ORFV zeigte, dass die Ko-Expression von CD40L die immunstimulatorischen Eigenschaften von ORFV verstärkt. Nach Infektion von DCs mit der CD40L-exprimierenden ORFV-Rekombinanten wurde eine erhöhte Expression von CD80, CD83, CD86 und HLA-DR beobachtet. Diese starke Aktivierung von DCs durch die Ko-Expression von CD40L *in vitro* konnte bereits mit verschiedenen viralen Vektoren demonstriert werden. Die Infektion von murinen BMDCs mit rMVA-CD40L führte ebenfalls zu einer erhöhten Expression der Aktivierungsmarker CD86 und CD80 [200]. Mit Hilfe eines rekombinanten CD40L-exprimierenden Vaccinia Virus (CD154rVV) konnte gezeigt werden, dass die Infektion von humanen DCs ebenfalls in einer erhöhten Expression von CD80, CD86 und CD83 und somit in einer verstärkten Aktivierung und Reifung der DCs resultiert [199, 260]. Auch ein CD40L exprimierender Canarypox Vektor (ALVAC) führte zur Aktivierung und Reifung von humanen Monozyten-generierten DCs [201]. Die Transduktion von DCs mit einem CD40L exprimierenden Lentivirus-Vektor verdeutlichte, dass nicht nur die transduzierten DCs phänotypisch reifen, auch umliegende nicht-transduzierte DCs zeigten eine Hochregulierung der CD80- und CD83-Expression [261]. Dieser Bystander-Effekt konnte auch nach Infektion der

## Diskussion

DCs mit CD40L-PepTrio-ORFV beobachtet werden. Auch auf umliegenden nicht infizierten DCs wurde eine verstärkte Expression der Aktivierungsmarker beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die Expression von CD40 war nach Infektion der DCs mit der CD40L exprimierenden ORFV-Rekombinante dagegen schwächer, als in den PepTrio-ORFV-infizierten DCs und der nicht infizierten Kontrolle. Dies kann zum einen daran liegen, dass die Bindung von CD40L an CD40 die Antikörper-Bindung an den Rezeptor blockiert. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass CD40 nach Ligation internalisiert wird, um die Signalkaskade zu initiieren, wie es für die lösliche Form von CD40L beschrieben ist [262].

Die verstärkte Aktivierung der DCs nach Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV wurde auch bei der Analyse der Zytokinproduktion sichtbar. Wie im ersten Teil der Arbeit gezeigt wurde, induzierte die Infektion mit ORFV die Expression von IL-6 und CXCL10 in DCs. Die zusätzliche Expression von CD40L resultierte in einer erhöhten Produktion dieser beiden Zytokine. Darüber hinaus wurden weitere pro-inflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-12 sowie die Chemokine CCL3, CCL5, IL-8 und CXCL9 und das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 produziert. Die Analyse der Zytokinproduktion von infizierten PBMCs zeigte, dass die zusätzliche Expression von CD40L zu einer verstärkten Produktion der Chemokine CCL2, CCL3 und CCL5 führt. Zusätzlich zu den genannten Chemokinen induzierte die Infektion mit CD40L exprimierenden ORFV-Rekombinanten die Produktion von IL-6 und IL-8 (CXCL8). Dass die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine in DCs durch die Stimulierung der CD40-Signalkaskade induziert wird, demonstrierten auch Experimente mit anderen viralen Vektoren. Die Infektion von humanen aus Monozyten gereiften DCs mit einem CD40L exprimierenden ALVAC resultierte in einem erhöhten Anteil an TNF $\alpha$ + und IL-12+ DCs [201]. Auch nach Infektion von iDCs mit CD154rVV konnte eine verstärkte Expression von IL-12 und TNF $\alpha$  detektiert werden. Zusätzlich führte die Infektion mit CD154rVV in diesem Experiment auch zur erhöhten Expression von GM-CSF und IL-15 [199]. Die Produktion von GM-CSF und IL-15 konnte im Zuge dieser Arbeit mittels ELISA nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Auch die Transduktion von DCs mit einem CD40L exprimierenden Lentivirus-Vektor induzierte die Produktion von IL-12 [261]. Die Infektion von murinen BMDCs mit rMVA-CD40L *in vitro* resultierte neben der Produktion von IL-6, TNF $\alpha$  und IL-12 zusätzlich in der Produktion von IFN $\alpha$  [200]. Vergleichbar dazu zeigten Trella et al. neben der verstärkten Expression von IL-12 und IL-10 ebenfalls eine Induktion der IFN $\alpha$ - und IFN $\beta$ -Expression in humanen Monozyten *in vitro* nach Infektion mit einem CD40L exprimierenden Vaccinia Virus (rVV40L) [260]. Im Gegensatz dazu konnte die Produktion von IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  in dieser Arbeit nicht beobachtet werden.

Die Infektion der PBMCs mit CD40L exprimierenden ORFV-Rekombinanten führte zudem zu einem erhöhten Anteil CD69+ B-Zellen. Da der CD40-Rezeptor auch auf B-Zellen exprimiert wird, führt die Ligation von CD40L auf infizierten DCs zu einer starken Aktivierung der B-Zellen [148, 263, 264].

Die Analyse der Induktion von Antigen-spezifischen Immunantworten *in vitro* zeigte, dass die Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV in einer signifikant stärkeren Expansion der NLVPMVATV-spezifischen T-Gedächtniszellen resultiert als die Infektion mit PepTrio-ORFV. Dieselbe Beobachtung wurde auch bei der Stimulierung von CD8+ T-Zellen mit CD40L exprimierenden Vaccinia Viren gemacht. Feder-Mengus et al. demonstrierten, dass CD154rVV infizierte und mit MART-1/MelanA<sub>27-35</sub>-Peptid beladene iDCs eine stärkere Expansion Antigen-spezifischer CD8+

## Diskussion

T-Zellen induzieren als iDCs, die mit einem Kontroll-Virus infiziert wurden [199]. Trela et al. konnten dies 2016 bestätigen. Auch hier resultierte die Stimulierung mit rVV40L-infizierten und mit MART-1/MelanA<sub>26-35</sub>-Peptid beladenen Monozyten in einer verstärkten Expansion von Antigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen. In diesem Experiment konnte zudem gezeigt werden, dass der Anteil zentraler T-Gedächtniszellen (*central memory T cells* = T<sub>CM</sub>) nach Stimulierung mit rVV40L höher ist als nach Stimulierung mit dem Kontroll-Virus [260]. T<sub>CM</sub> zeichnen sich durch ein hohes Proliferationspotenzial als Antwort auf eine Antigen-Stimulation aus. Sie spielen vor allem beim Schutz vor Infektionen oder bei der Bekämpfung von Tumoren eine wichtige Rolle [265]. Ob nach der Stimulierung mit CD40L-PepTrio-ORFV ebenfalls der Anteil an T<sub>CM</sub> erhöht ist, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht und sollte in zukünftigen Experimenten analysiert werden. Auf die Funktionalität der NLVPMVATV-spezifischen T-Gedächtniszellen hatte die Infektion mit CD40L-PepTrio-ORFV im Vergleich zur Infektion mit PepTrio-ORFV keinen Einfluss. Dabei ist die Funktionalität der Antigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen essentiell für die effektive Bekämpfung von Tumoren [280]. Auch das *in vitro Priming* von naiven T-Zellen konnte durch die zusätzliche Expression von CD40L nicht verbessert werden.

Der positive Effekt der CD40L-Expression auf die Induktion von Antigen-spezifischen Immunantworten wurde bei den *in vivo*-Experimenten deutlich. Die Immunisierung mit mCD40L-Ova-ORFV führte im Mittel zu einer erhöhten Produktion Ova-spezifischer IgG1-Antikörper. Wie auch schon *in vitro* beobachtet wurde, führt die Bindung von CD40L an CD40 zu einer Aktivierung der B-Zellen. Die Signalkaskade die dabei in den B-Zellen induziert wird, führt zu einer erhöhten Produktion von Antigen-spezifischen IgG1-Antikörpern. Nonoyama et al. konnten zeigen, dass die *in vitro*-Stimulierung von B-Zellen mit einem agonistischen  $\alpha$ CD40-Antikörper bzw. sCD40L in Kombination mit IL-10 ausreicht, um in Abwesenheit von T-Zellen die Produktion von Antigen-spezifischen Antikörpern zu induzieren [266]. Dass die Interaktion von CD40L mit CD40 wichtig für die effiziente Produktion von Antikörpern ist, zeigt das Krankheitsbild des Hyper-IgM-Syndroms (HIGM). Bei der häufigsten Form, dem HIGM Typ 1, liegt eine Mutation im CD40L-Gen vor, was in den Patienten zu einem gestörten Isotypenwechsel von IgM auf IgG und IgA führt. Patienten mit HIGM 1 haben demnach einen erhöhten Anteil an IgM und gleichzeitig einen stark verminderten Anteil an IgG und IgA [183, 184, 186]. Neben dem Isotypenwechsel ist die Interaktion von CD40L und CD40 in B-Zellen auch bei der somatischen Hypermutation beteiligt. Hierbei werden durch das Enzym AID (*activation induced cytidin deaminase*, aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase) Mutationen in die Antikörpergene einer reifenden B-Zelle eingefügt, was zu einer Erhöhung der Bindungsaffinität der Antikörper zu den Antigenen führt [267]. Interessanterweise konnte nach Immunisierung mit mCD40L-Ova-ORFV ein erhöhter Titer an Ova-spezifischen IgG1 Antikörpern detektiert werden, die Konzentration an Ova-spezifischem IgG2 war jedoch vergleichbar hoch wie nach Immunisierung mit Ova-ORFV. Die Immunisierung der Mäuse erfolgte in dieser Arbeit mit einer Virusdosis von  $1 \times 10^6$  pfu/ml. Frühere *in vivo*-Experimente mit Ova-ORFV zeigten, dass mit einer höheren Virusdosis von  $1 \times 10^7$  pfu/ml oder  $1 \times 10^8$  pfu/ml eine stärkere Antigen-spezifische humorale Immunantwort ausgelöst wird. Um verlässlichere Aussagen über die Induktion von humoralen Immunantworten und den Effekt der mCD40L-Expression treffen zu können, sollte dieser Versuch daher mit höheren Virusdosen wiederholt werden.

Im Tumormodell resultierte die Ko-Expression von mCD40L in einem verringerten Tumorstadium und einem verlängerten Überleben der Mäuse. In Kombination mit CPI war ein

Drittel der mit mCD40L-Ova-ORFV immunisierten Mäuse am Ende des Experiments Tumor-frei. Dieser positive Effekt der mCD40L-Ko-Expression lässt sich, wie von Lauterbach et al. demonstriert, durch eine gesteigerte zelluläre Immunantwort begründen. Die Immunisierung von C57BL/6 Mäusen mit rMVA-CD40L führte zu einer gesteigerten Antigen-spezifischen zellulären Immunantwort. Dies war zum einen in einem erhöhten Anteil Antigen-spezifischer CD8+ T-Zellen als auch in einer verbesserten Funktionalität der T-Zellen zu erkennen. Die durch die Immunisierung mit rMVA-CD40L induzierte CD8+ T-Zell-Antwort war dabei ausreichend, um Mäuse vor einer letalen Infektion mit dem Ektromelie-Virus zu schützen [200]. Bei einem Experiment mit einer Vakzine gegen das Simiane Immundefizienz-Virus (SIV) in Makaken führte die Ko-Expression von CD40L in einer Kombination aus DNA-Vektor und MVA ebenfalls zu einer verstärkten humoralen und zellulären Immunantwort und zu einem verbesserten Schutz vor einer SIV-Infektion [268]. Zudem konnten verschiedene klinische Studien die erfolgreiche Verwendung eines CD40L exprimierenden Adenovirus (AdCD40L) im Feld der Krebs-Immuntherapie demonstrieren [269, 270]. Ein signifikant erhöhter Anteil SIINFEKL-spezifischer CD8+ T-Zellen und eine verbesserte Funktionalität dieser Zellen durch die Ko-Expression von mCD40L konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Bereits die Immunisierung mit Ova-ORFV induzierte eine sehr starke T-Zell-Aktivierung, sodass nach der Immunisierung mit mCD40L-Ova-ORFV kein Effekt der Ko-Expression von mCD40L auf die T-Zell-Antwort erkennbar war. Um zu überprüfen, ob die zusätzliche Expression von ko-stimulatorischen Molekülen in einer verstärkten CD8+ T-Zell-Antwort resultiert, sollten weitere ORFV-Rekombinanten hergestellt und getestet werden, die schwächere Antigene als das verwendete Ova exprimieren. Als mögliche Antigene kommen hierbei z.B. Selbstantigene in Frage. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, den Versuchsaufbau anzupassen. So könnte die Immunisierung mit geringeren Virus-Titern oder die Verwendung einer anderen Immunisierungsrouten zu schwächeren zellulären Immunantworten führen und so die Möglichkeit bieten, Unterschiede in der Stärke und Qualität der Immunantwort zu erkennen.

### **4.2.2 Charakterisierung der CD80 exprimierenden ORFV-Rekombinanten**

Eine weitere Möglichkeit der Optimierung von viralen Vektoren bietet die Expression von ko-stimulatorischen Molekülen der Ig-Superfamilie. CD80 und CD86 gehören durch die Interaktion mit CD28 auf T-Zellen zu den wichtigsten ko-stimulatorischen Molekülen bei der Ausbildung einer adaptiven Immunantwort. Die Bindung an CD28 initiiert eine Signalkaskade, die zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie NFAT, AP-1 und NF- $\kappa$ B und infolgedessen zur IL-2-Produktion und Proliferation von T-Zellen führt [138]. Jedoch unterscheiden sich CD80 und CD86 in ihrem Expressionsprofil auf APCs. Während CD86 bereits auf nicht aktivierten APCs konstitutiv exprimiert und nach Aktivierung hochreguliert wird, wird die Expression von CD80 erst nach Aktivierung induziert [147, 150]. Auch zeigten vorangegangene Experimente, dass die CD80-Expression auf APCs, im Gegensatz zur CD86-Expression, nach Infektion mit ORFV nur leicht erhöht ist. Die zusätzliche Expression von CD80 durch die Infektion eines CD80 exprimierenden ORFV sollte daher zu einer optimalen Ko-Stimulierung der T-Zellen bei der Ausbildung der adaptiven Immunantwort führen. Zusätzlich zu CD28 ist jedoch auch CTLA-4, der Prototyp der Immun-Checkpoints, ein Rezeptor für CD80. Nach Aktivierung von T-Zellen wird die Expression von CTLA-4 hochreguliert. Die Bindung von CD80 an CTLA-4 und die damit einhergehende Hemmung der T-Zell Aktivität könnte daher einen Nachteil der Ko-Expression von CD80 darstellen [147].

Die *in vitro*-Charakterisierung von CD80-PepTrio-ORFV zeigte eine sehr starke Expression von CD80 auf der Oberfläche infizierter DCs. Auf die Expression der anderen Aktivierungsmarker hatte diese ORFV-Rekombinante im Vergleich zur PepTrio-ORFV-Rekombinanten jedoch keinen Einfluss. Bei der Analyse der Expression von CD69 auf PBMCs wurde ein signifikant erhöhter Anteil CD69+ CD4+ T-Zellen nach Infektion mit CD80-PepTrio-ORFV beobachtet. Auch Marti et al. beobachteten einen positiven Effekt auf die Aktivierung von CD4+ T-Zellen durch die Ko-Expression von CD80. Die *in vitro*-Proliferation von CD4+ T-Zellen, ausgelöst durch geringe Mengen Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), konnte durch die zusätzliche Stimulierung mit einem rekombinanten B7-1/CD80 exprimierenden Vaccinia Virus (recVV) effizient gesteigert werden [271]. Somit ist anzunehmen, dass die zusätzliche Expression von CD80 ebenfalls zu einer stärkeren Proliferation von T-Zellen führt. Die Proliferation von CD4+ T-Zellen wurde in dieser Arbeit jedoch nicht näher betrachtet.

Bei der Analyse der Induktion Antigen-spezifischer CD8+ T-Zellen *in vitro* wurde ebenfalls der positive Effekt der CD80-Ko-Expression deutlich. Die Expansion der NLVPMVATV-spezifischen T-Gedächtniszellen sowie die Expression von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  waren nach Infektion mit CD80-PepTrio-ORFV im Vergleich zur Infektion mit PepTrio-ORFV signifikant erhöht. Auch beim *Priming* von naiven T-Zellen mit CD80-PepTrio-ORFV-infizierten DCs war der Anteil positiver Replikate höher als beim *Priming* mit PepTrio-ORFV-infizierten DCs. Ein ähnlicher Effekt wurde auch bei der *in vitro*-Stimulation von zytotoxischen T-Zellen mit einem B7.1/CD80 und MART-1/MelanA<sub>27-35</sub>-Peptid exprimierenden recVV deutlich. APCs die mit diesem Vektor infiziert wurden, induzierten signifikant stärkere zytotoxische Immunantworten als APCs, die mit einem recVV infiziert wurden, das nur das Peptid exprimiert [272].

*In vivo* bewirkte die Immunisierung mit mCD80-Ova-ORFV vor allem in Kombination mit CPI ein verzögertes Tumorwachstum im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und der Immunisierung mit Ova-ORFV. Chamberlain et al. konnten in einem therapeutischen Tumor-Modell *in vivo* ebenfalls den positiven Effekt der zusätzlichen Expression von B7-1/CD80 demonstrieren. Die Ko-Expression eines artifiziiellen Antigens mit B7-1/CD80 in einem Vaccinia Virus (rVV) führte zu einem verstärkten therapeutischen anti-tumoralen Effekt. In Tumor-tragenden Mäusen konnte ein Rückgang von Metastasen sowie ein verlängertes Überleben beobachtet werden [273].

### **4.2.3 Charakterisierung der CD40L-CD80 exprimierenden ORFV-Rekombinanten**

Nachdem die Ko-Expression von CD40L oder CD80 die immunstimulatorischen Eigenschaften von ORFV bereits verbessern konnte, sollte getestet werden, ob die Kombination beider ko-stimulatorischen Moleküle zu einer weiteren Steigerung der Immunantwort führt. Der positive Effekt der Expression mehrerer ko-stimulatorischer Moleküle wurde in den letzten Jahren anhand der TRICOM- (*TR*lad of *CO*stimulatory *M*olecules) Vektoren gezeigt. Neben CD80 exprimieren diese Vektoren noch ICAM-1 und LFA-3. *In vitro*-Studien konnten zeigen, dass von den in TRICOM exprimierten ko-stimulatorischen Molekülen CD80 das potenteste bei der Aktivierung von T-Zellen ist. Die Expression aller drei Moleküle bewirkte jedoch die stärkste Immunstimulierung [195]. Die Infektion von murinen und humanen DCs resultierte in einer erhöhten Expression ko-stimulatorischer Moleküle und in einer verstärkten Stimulierung von naiven und Effektor T-Zellen [193, 274].

## Diskussion

Die Ko-Expression von CD40L und CD80 zeigte in dieser Arbeit synergistische Effekte bei der Aktivierung der Immunzellen und der Induktion von Antigen-spezifischen Immunantworten. Wie auch die Infektion von DCs mit CD40L-PepTrio-ORFV resultierte die Infektion mit CD40L-CD80-PepTrio-ORFV in einer verstärkten Expression der Aktivierungsmarker CD83, CD86 und HLA-DR sowie in einer reduzierten Expression von CD40. Zusätzlich führte die Infektion mit CD40L-CD80-PepTrio-ORFV ebenso wie die Infektion mit CD80-PepTrio-ORFV zu einer sehr starken Expression von CD80 auf der Oberfläche infizierter DCs. Während die Infektion von PBMCs mit CD40L-PepTrio-ORFV in einem signifikant größeren Anteil an CD69+ B-Zellen und die Infektion mit CD80-PepTrio-ORFV einem signifikant größeren Anteil an CD69+ CD4+ T-Zellen resultierte, führte die Infektion mit CD40L-CD80-PepTrio-ORFV zu einer verstärkten CD69-Expression auf CD4+ T-Zellen und B-Zellen. Die Ko-Expression von CD40L und CD80 zeigte somit deutlich die Kombination aus starker Aktivierung der APCs und der B-Zellen über den CD40L-CD40 Signalweg [148, 173] sowie den positiven Effekt der CD80-Expression auf die Aktivierung von CD4+ T-Zellen [138].

Bei der Aktivierung naiver T-Zellen *in vitro* wurden die verstärkten immunstimulatorischen Eigenschaften von CD40L-CD80-PepTrio-ORFV ebenfalls deutlich. Die Ko-Expression von CD40L und CD80 führte in 15 % der Replikate zur Aktivierung und Proliferation von NLVPMVATV-spezifischen CD8+ T-Zellen. Auch der Anteil spezifischer CD8+ T-Zellen war nach Infektion mit CD40L-CD80-PepTrio-ORFV am höchsten. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die Sekretion von IL-12 durch aktivierte DCs ein essentieller Schritt in der Aktivierung von CD8+ T-Zellen darstellt [275, 276]. Wie in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, führt die Infektion von DCs mit CD40L exprimierenden ORFV-Rekombinanten zur Produktion von IL-12. Durch das Zusammenspiel des CD40L-CD40-Signalwegs mit der Bindung von CD80 an CD28 wird eine starke T-Zell-Aktivierung induziert. Um verlässlichere Aussagen über das *Priming* von naiven CD8+ T-Zellen und den Einfluss der CD40L- und CD80-Expression treffen zu können, sollten in Zukunft noch weitere Versuche durchgeführt werden. Das verwendete artifizielle Antigen „PepTrio“ besteht aus drei HLA-A\*02:01-restringierten Epitopen des HCMV. Die HCMV-Prävalenz bei Blutspendern in Deutschland liegt laut Robert-Koch-Institut zwischen 37 - 65 % [277]. Der Anteil der HCMV-positiven Spender war auch bei den in dieser Arbeit getesteten Spendern sehr groß, daher konnte lediglich mit den Zellen 3 der 10 analysierten Spender das *Priming* naiver T-Zellen durchgeführt werden. Durch den Austausch des artifiziellen Antigens „PepTrio“ in den verwendeten Rekombinanten gegen ein selteneres Antigen wie z.B. ein tumorassoziiertes Antigen oder Epitope des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) könnten weitere Experimente zügig durchgeführt werden.

Auch *in vivo* wurde der positive Effekt der Ko-Expression von mCD40L und mCD80 beobachtet. Durch die zusätzliche Expression von mCD40L und mCD80 konnte der Anteil SIINFEKL-spezifischer CD8+ T-Zellen nach *Prime*-Immunisierung erhöht werden. Nach *Boost*-Immunisierung mit Ova-ORFV war die induzierte Immunantwort bereits sehr stark, sodass kein Effekt der mCD40L- und mCD80-Ko-Expression zu erkennen war. Im Tumormodell B16-F10(OVA) überlebten nach Immunisierung mit mCD40L-mCD80-Ova-ORFV in Kombination mit CPI 4 von 12 Mäusen die Tumorgabe. Diese Mäuse waren am Ende des Experiments Tumor-frei („Komplette Responder“). In dieser Gruppe zeigte sich im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und der Ova-ORFV-immunisierten Gruppe ein deutlich verlangsamtes Tumorstadium. Die Immunisierung mit mCD40L-mCD80-Ova-ORFV hatte einen ähnlichen Effekt wie die Immunisierung mit mCD40L-Ova-ORFV. Allgemein wurde in diesem Versuch der synergistische

## Diskussion

Effekt von ORFV-Immunisierung und Behandlung mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren (CPI) deutlich. Während nach Kombination von mCD40L-mCD80-Ova-ORFV und CPI ein Drittel der Mäuse Tumor-frei waren, überlebte keine der Mäuse der Gruppe, die nur mit mCD40L-mCD80-Ova-ORFV immunisiert wurde. Dass die Immunisierung mit mCD40L-Ova-ORFV und mCD40L-mCD80-Ova-ORFV zur Induktion einer effektiven anti-tumoralen Immunantwort führt, wurde auch durch die *Rechallenge* mit B16-F10 sichtbar. Die zusätzliche Gabe von B16-F10 ohne das Zielantigen Ova resultierte in der Kontrollgruppe in einem sehr schnellen Tumorwachstum. In den mit mCD40L-Ova-ORFV + CPI und mCD40L-mCD80-Ova-ORFV + CPI immunisierten Mäusen konnte das Tumorwachstum zunächst sehr gut kontrolliert werden. In einer mCD40L-mCD80-Ova-ORFV + CPI immunisierten Maus und allen mCD40L-Ova-ORFV + CPI immunisierten Mäusen kam es zu späteren Zeitpunkten jedoch zum Tumor-*Escape*. Die Immunisierung mit mCD40L-mCD80-Ova-ORFV + CPI war dabei am effektivsten. In 3 der 4 Mäuse dieser Gruppe war kein Tumorwachstum zu erkennen. Folglich zeigte sich, dass diese Mäuse nicht nur eine Ova-spezifische Immunantwort aufgebaut hatten, sondern auch Ova-freie B16-F10-Tumorzellen eliminieren konnten und demnach eine zelluläre Immunität gegen weitere Tumorantigene besitzen. Bei einer effektiven anti-tumoralen Immunantwort wird eine T-Zell-abhängige Lyse der Tumorzellen induziert. Die Lyse führt zu einer Freisetzung von weiteren Tumor-assoziierten Antigenen, die von APCs aufgenommen, prozessiert und präsentiert werden können. Dadurch werden Immunantworten induziert, die sich nicht nur gegen das in der Vakzine enthaltene Antigen, sondern gegen mehrere Tumor-assoziierte Antigene richten. Durch diesen als *Antigen Spread* bezeichneten Mechanismus erfolgt die Induktion einer erweiterten anti-tumoralen Immunantwort [278]. Es gibt Hinweise darauf, dass die erweiterte anti-tumorale Immunantwort, die sich gegen mehrere Tumor-assoziierte Antigene richtet, ein entscheidender Faktor bei der effizienten Wirkung von Immuntherapien ist. IMA901 ist eine Tumorstoff, die 10 verschiedene Tumor-assoziierte Peptide (TUMAPs) enthält, die auf Nierenzellkarzinomen präsentiert werden. In einer Studie mit diesem therapeutischen Krebsimpfstoff wurde gezeigt, dass Patienten, die eine Immunantwort gegen mehrere der TUMAPs ausbildeten ein verbessertes Gesamtüberleben zeigten, als Patienten die eine Immunantwort gegen maximal eines der TUMAPs ausbildeten [279]. Dass 3 der 4 mit mCD40L-mCD80-Ova-ORFV + CPI immunisierten Mäuse die *Rechallenge* mit B16-F10 Tumor-frei überlebten, ist daher ein starker Hinweis auf *Antigen Spread*. Die Immunisierung führte in dieser Gruppe demnach zu einer effektiven Lyse des B16-F10(OVA)-Tumors und zur Induktion von Immunantworten gegen weitere durch die Lyse freigesetzte Tumorantigene. Die Immunisierung mit mCD40L-Ova-ORFV + CPI führte zwar zunächst zu einem Rückgang des Tumorwachstums, die gesteigerte Immunaktivierung durch die Bindung von CD40L an CD40 reichte allerdings nicht aus, um das Tumorwachstum zu verhindern. Erst das Zusammenspiel der Aktivierung der APCs über den CD40L:CD40-Signalweg und der T-Zell-Aktivierung durch die Bindung von CD80 an CD28 führte nach Immunisierung zur Induktion einer effektiven anti-tumoralen Immunantwort. Um die Hypothese zu bestätigen, dass die Ko-Expression von mCD40L und mCD80 zu einer verstärkten anti-tumoralen Immunantwort führt, sollten mCD40L und mCD80 exprimierende ORFV-Rekombinanten in weiteren Tumormodellen getestet werden.

Im Zuge dieser Arbeit wurde ein viraler Vektor erstellt, der die beiden ko-stimulatorischen Moleküle CD40L und CD80 exprimiert. Die Expression von CD40L bewirkte dabei über die Bindung an CD40 eine starke Aktivierung von APCs, was durch die erhöhte Expression verschiedener Aktivierungsmarker und die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen deutlich wurde. Die Expression von CD80 verstärkte durch die Bindung an CD28 die

## Diskussion

Aktivierung von T-Zellen. Die Kombination beider Moleküle führte *in vitro* zu einer verstärkten Induktion Antigen-spezifischer Immunantworten. *In vivo* induzierte die Immunisierung mit mCD40L-mCD80-Ova-ORFV eine starke anti-tumorale Immunantwort, die zu einer Tumorremission in allen Tieren führte. Die bereits sehr guten immunstimulatorischen Eigenschaften des ORFV-Vektors D1701-V konnten durch die zusätzliche Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40L und CD80 erfolgreich gesteigert werden.

# Anhang

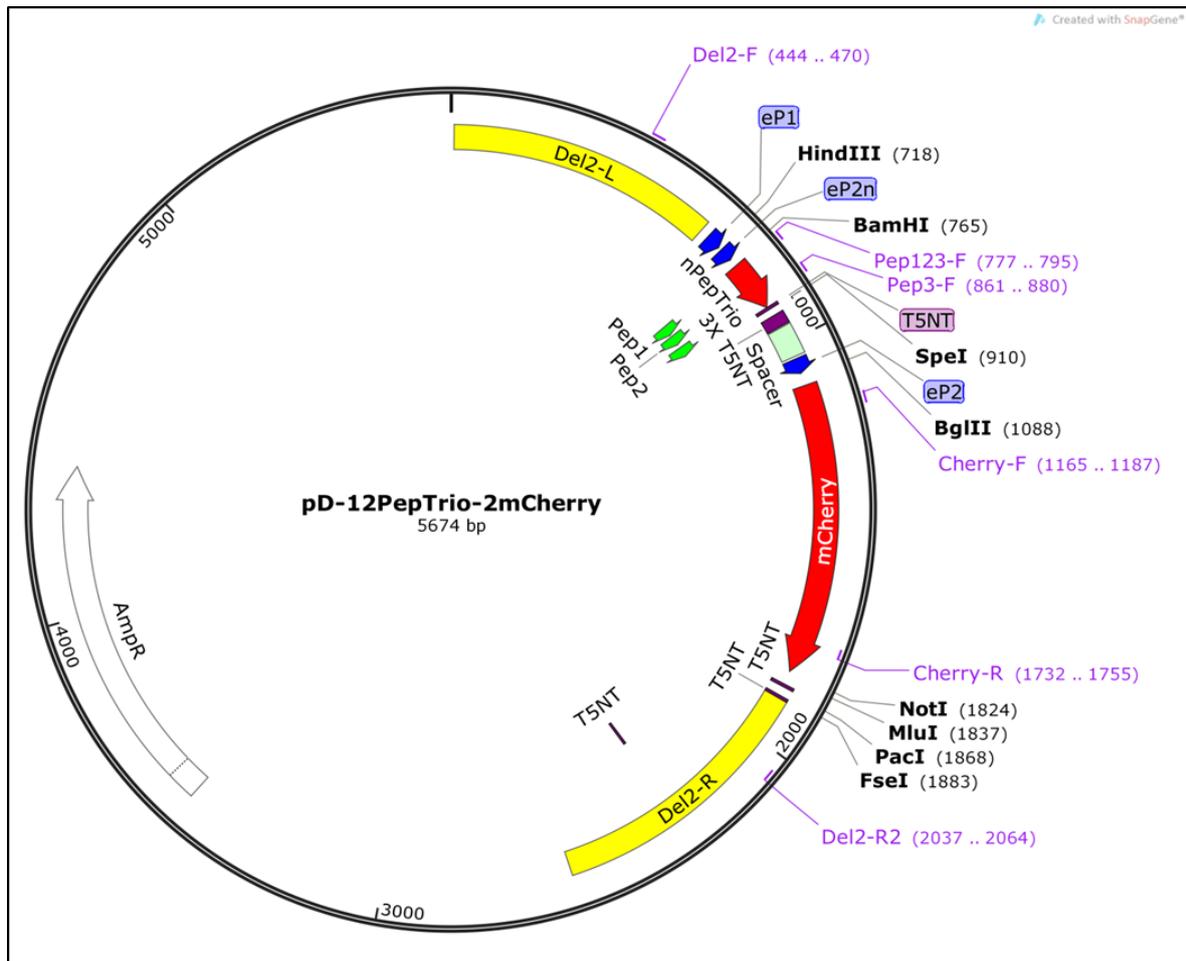


Abbildung 0.1: Plasmidkarte des generierten Plasmids pD12-PepTrio-2-Cherry

# Anhang

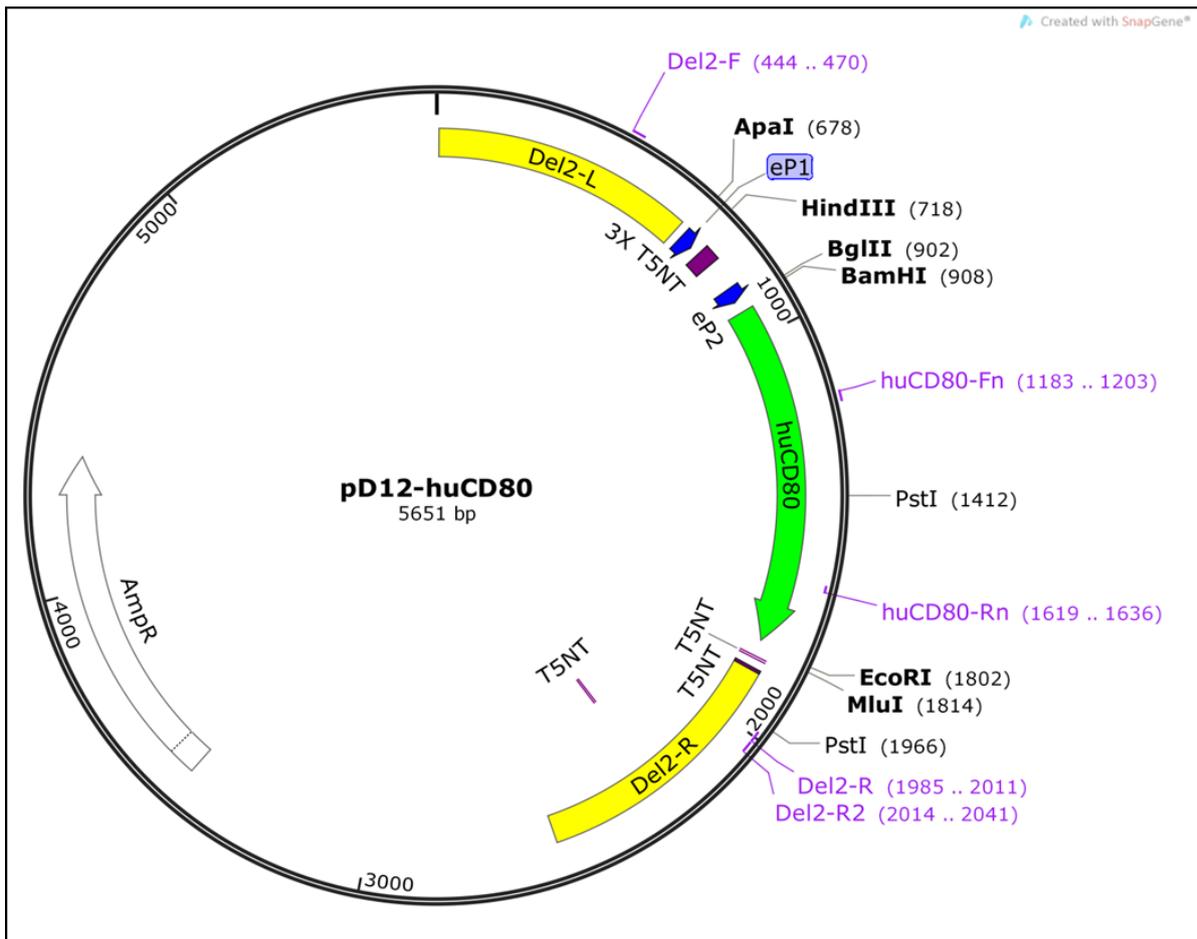


Abbildung 0.2: Plasmidkarte des generierten Plasmids pD12-CD80.

# Anhang

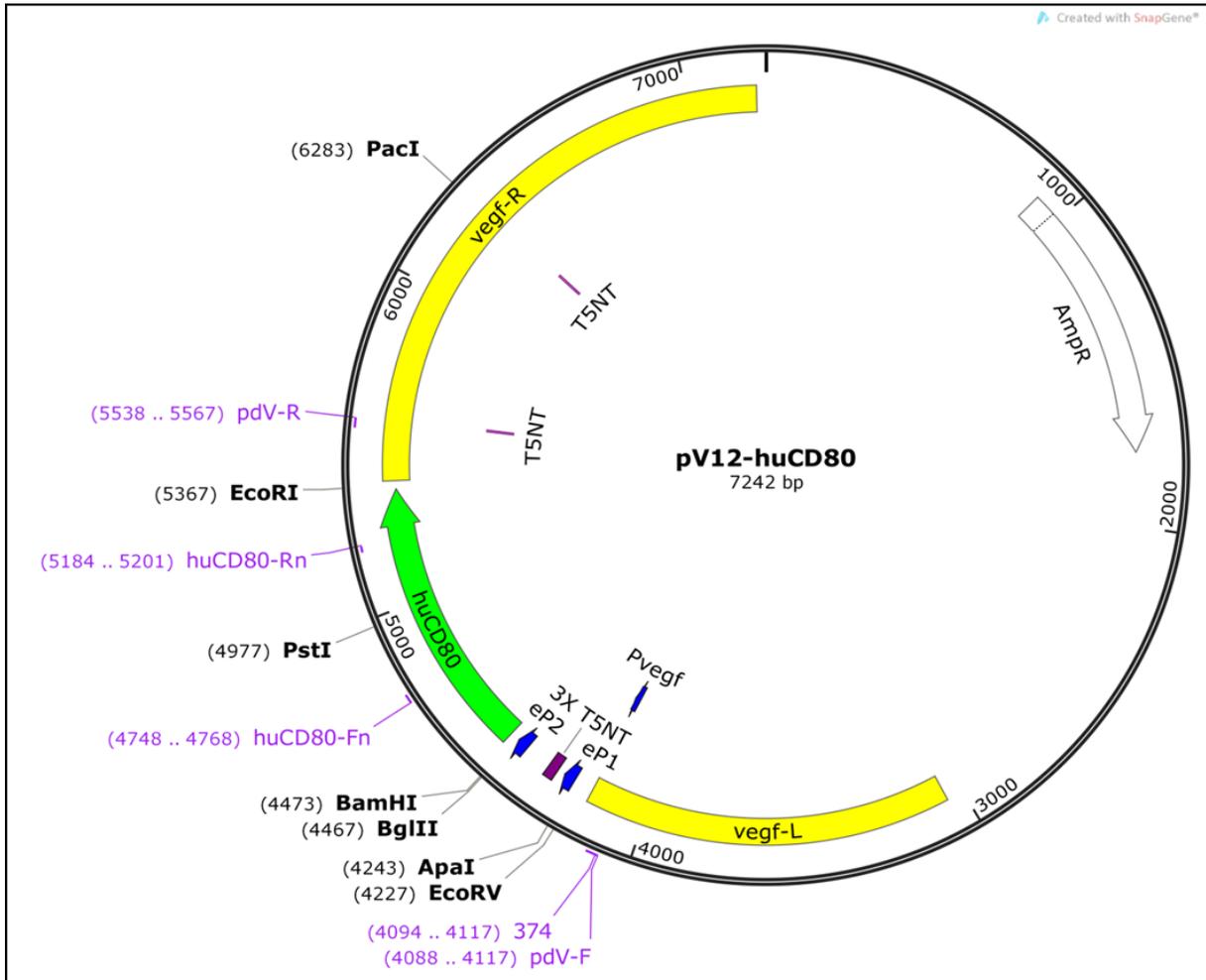
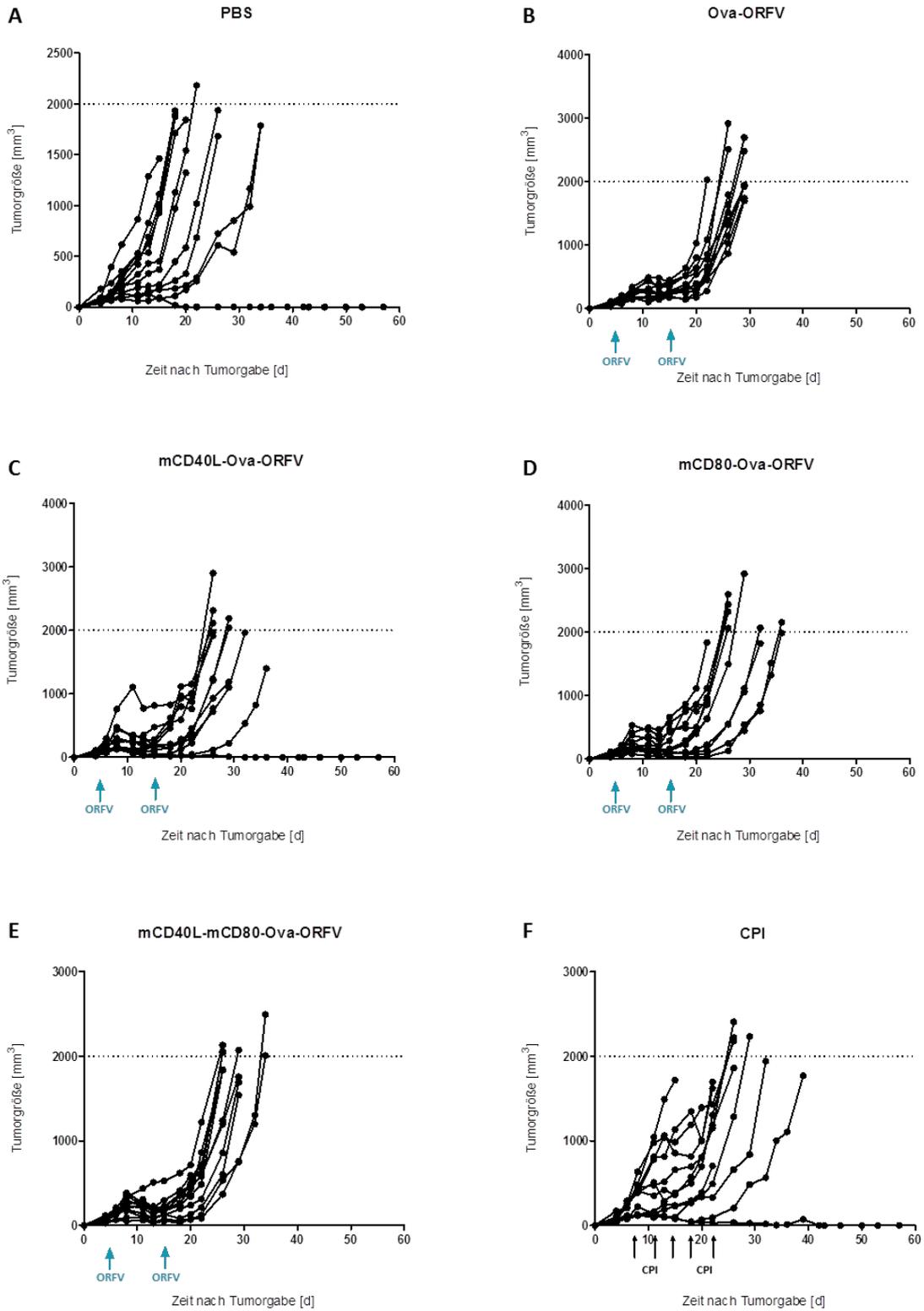
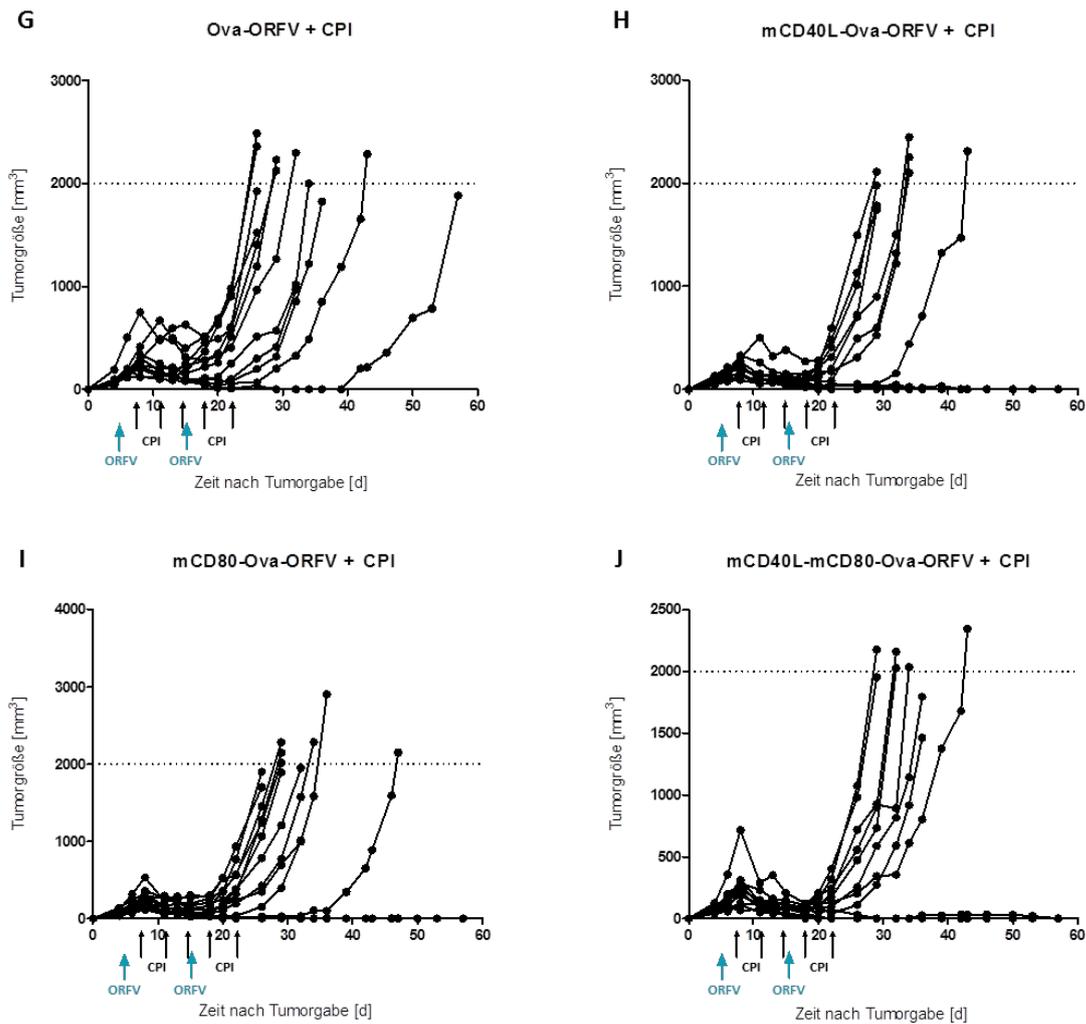


Abbildung 0.3: Plasmidkarte des generierten Plasmids pV12-CD80.

# Anhang

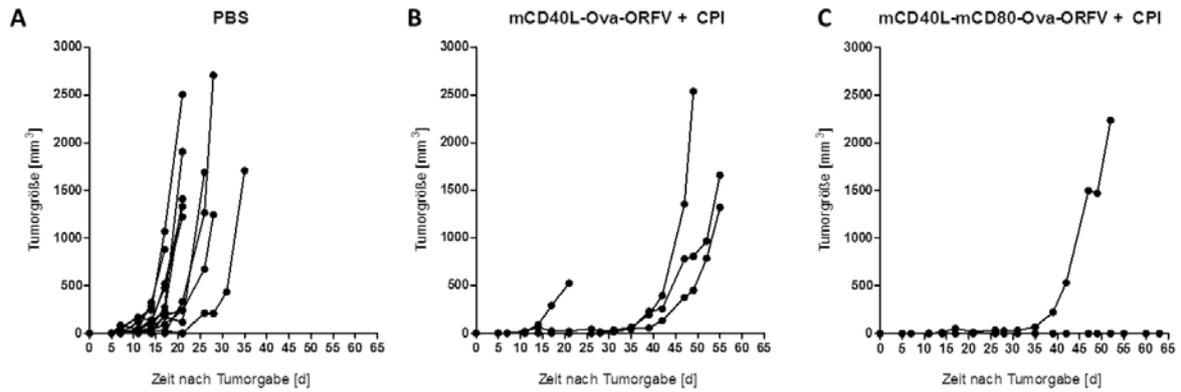


## Anhang



**Abbildung 0.4: Anti-tumorale Wirksamkeit verschiedener ORFV-Rekombinanten im Tumormodell B16-F10(OVA).** Je C57BL/6NTac-Maus wurden  $5 \times 10^5$  Zellen der Zelllinie B16-F10(OVA) subkutan (s.c.) injiziert. 5 Tage und 15 Tage nach Tumorgabe erfolgten die i.m. Immunisierungen der Mäuse mit jeweils  $1 \times 10^6$  pfu/ml Ova-ORFV, mCD40L-Ova-ORFV, mCD80-Ova-ORFV bzw. mCD40L-mCD80-Ova-ORFV in Kombination mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren (CPI). CPI wurden an Studientag 8, 11, 14, 18 und 22 intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Zur Kontrolle wurden Mäuse mit CPI oder PBS immunisiert. Dargestellt ist die TumorgroÙe jeder Maus nach Immunisierung mit A) PBS, B) Ova-ORFV, C) mCD40L-Ova-ORFV, D) mCD80-Ova-ORFV, E) mCD40L-mCD80-Ova-ORFV, F) CPI, G) Ova-ORFV + CPI, H) mCD40L-Ova-ORFV + CPI, I) mCD80-Ova-ORFV + CPI, und J) mCD40L-mCD80-Ova-ORFV + CPI. Pfeile kennzeichnen die Studientage, an denen Mäuse mit ORFV immunisiert (blau) oder mit CPI behandelt (schwarz) wurden. In Klammern ist die Zahl der lebenden Mäuse nach Versuchsende angegeben.

## Anhang



**Abbildung 0.5: Antigen Spread nach Tumortherapie mit ORFV-Rekombinanten.** C57BL/6 Mäusen wurden 70 Tage nach erster Tumorgabe und 60 Tage nach *Boost*-Immunisierung mit mCD40L-Ova-ORFV und mCD40L-mCD80-Ova-ORFV  $5 \times 10^5$  Zellen der Zelllinie B16-F10 subkutan (s.c.) injiziert. Dargestellt ist die Tumorgöße jeder Maus A) ohne Immunisierung (12 Mäuse) oder nach Immunisierung mit B) mCD40L-Ova-ORFV + CPI (4 Mäuse) und C) mCD40L-mCD80-Ova-ORFV + CPI (4 Mäuse).

# Literaturverzeichnis

---

1. Plotkin, S.A., *Vaccines: past, present and future*. Nature Medicine, 2005. **11**: p. S5.
2. Plotkin, S., *History of vaccination*. Proc Natl Acad Sci, 2014. **111**(34): p. 12283-12287.
3. Boylston, A.W., *The Myth of the Milkmaid*. N Engl J Med, 2018. **378**(5): p. 414-415.
4. Nabel, G.J., *Designing tomorrow's vaccines*. N Engl J Med, 2013. **368**(6): p. 551-60.
5. WHO. *WHO | Measles*. 2018 [cited March 2019; Available from: <https://www.who.int/immunization/diseases/measles/en/>].
6. Greenwood, B., *The contribution of vaccination to global health: past, present and future*. Phil Trans. Series B, Biological sciences, 2014. **369**: p. 20130433-20130433.
7. Pulendran, B. and R. Ahmed, *Immunological mechanisms of vaccination*. Nat Immunol, 2011. **12**(6): p. 509-517.
8. Draper, S.J. and J.L. Heeney, *Viruses as vaccine vectors for infectious diseases and cancer*. Nat Rev Microbiol, 2010. **8**(1): p. 62-73.
9. Larocca, C. and J. Schlom, *Viral vector-based therapeutic cancer vaccines*. Cancer J, 2011. **17**(5): p. 359-71.
10. Guo, C., M. H. Manjili, J. R. Subjeck, D. Sarkar, P. B. Fisher, X.-Y. Wang, *Therapeutic Cancer Vaccines: Past, Present and Future*. Adv Cancer Res, 2013. **119**: p. 421-475.
11. Disis, M.L., *Mechanism of Action of Immunotherapy*. Semin Oncol, 2014. **41**: p. S3-S13.
12. Ura, T., K. Okuda, and M. Shimada, *Developments in Viral Vector-Based Vaccines*. Vaccines, 2014. **2**(3): p. 624-641.
13. Castellino, F., G. Galli, G. Del Giudice and R. Rappuoli, *Generating memory with vaccination*. Eur J Immunol, 2009. **39**(8): p. 2100-5.
14. Pulendran, B. and R. Ahmed, *Translating Innate Immunity into Immunological Memory: Implications for Vaccine Development*. Cell, 2006. **124**(4): p. 849-863.
15. Lollini, P.-L., F. Cavallo, P. Nanni and G. Forni, *Vaccines for tumour prevention*. Nature Reviews Cancer, 2006. **6**: p. 204.
16. Dougan, M. and G. Dranoff, *Immune therapy for cancer*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 83-117.
17. Melief, C.J., T. van Hall, R. Arens, F. Ossendorp and S. H. van der Burg, *Therapeutic cancer vaccines*. J Clin Invest, 2015. **125**(9): p. 3401-12.
18. Ye, Z., Z. Li, H. Jin and Q. Qian, *Therapeutic Cancer Vaccines*, in *Progress in Cancer Immunotherapy*, S. Zhang, Editor. 2016, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 139-167.
19. WHO. *Cancer*. 2018 [cited March 2019; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>].
20. Robert-Koch-Institut. *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*. 2016 [cited March 2019; Available from: [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen\\_node.html](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen_node.html)].
21. Sharma, P., S. Hu-Lieskovan, J. A. Wargo and A. Ribas, *Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy*. Cell, 2017. **168**(4): p. 707-723.
22. Coley, W.B., *The treatment of inoperable sarcoma by bacterial toxins (the mixed toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus)*. J Royal Soc Med, 1910. **3**(Surg\_Sect): p. 1-48.
23. Ehrlich, P. and S.H.H. Dale, *The Collected Papers: In Four Volumes, Including a Complete Bibliography*. 1960: Pergamon Press.

24. Burnet, M., *CHAPTER VIII - IMMUNOLOGICAL SURVEILLANCE*, in *Immunological Surveillance*, M. Burnet, Editor. 1970, Pergamon. p. 161-185.
25. Dunn, G.P., A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old and R. D. Schreiber, *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. *Nat Immunol*, 2002. **3**: p. 991.
26. Zhang, H. and J. Chen, *Current status and future directions of cancer immunotherapy*. *J Cancer*, 2018. **9**(10): p. 1773-1781.
27. Rosenberg, S.A., *Progress in human tumour immunology and immunotherapy*. *Nature*, 2001. **411**(6835): p. 380-4.
28. Schneble, E., G. T. Clifton, D. F. Hale and G. E. Peoples, *Peptide-Based Cancer Vaccine Strategies and Clinical Results*, in *Vaccine Design: Methods and Protocols: Volume 1: Vaccines for Human Diseases*, S. Thomas, Editor. 2016, Springer New York: New York, NY. p. 797-817.
29. Palucka, K. and J. Banchereau, *Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines*. *Immunity*, 2013. **39**(1): p. 38-48.
30. Jackson, D.A., R.H. Symons, and P. Berg, *Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci*, 1972. **69**(10): p. 2904-2909.
31. Mackett, M., G.L. Smith, and B. Moss, *Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector*. *Proc Natl Acad Sci*, 1982. **79**(23): p. 7415-7419.
32. Smith, G.L., M. Mackett, and B. Moss, *Infectious vaccinia virus recombinants that express hepatitis B virus surface antigen*. *Nature*, 1983. **302**(5908): p. 490-5.
33. Moss, B., G. L. Smith, J. L. Gerin and R. H. Purcell, *Live recombinant vaccinia virus protects chimpanzees against hepatitis B*. *Nature*, 1984. **311**(5981): p. 67-9.
34. Liu, M.A., *Immunologic Basis of Vaccine Vectors*. *Immunity*, 2010. **33**.
35. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen Recognition and Innate Immunity*. *Cell*, 2006. **124**(4): p. 783-801.
36. Brown, M., D. H. Davies, M. A. Skinner, G. Bowen, S. J. Hollingsworth, G. J. Mufti, J. R. Arrand and S. N. Stacey, *Antigen gene transfer to cultured human dendritic cells using recombinant avipoxvirus vectors*. *Cancer Gene Ther*, 1999. **6**(3): p. 238-45.
37. Drillien, R., D. Spehner, A. Bohbot and D. Hanau, *Vaccinia virus-related events and phenotypic changes after infection of dendritic cells derived from human monocytes*. *Virology*, 2000. **268**(2): p. 471-81.
38. Bonini, C., S. P. Lee, S. R. Riddell and P. D. Greenberg, *Targeting antigen in mature dendritic cells for simultaneous stimulation of CD4+ and CD8+ T cells*. *J Immunol*, 2001. **166**(8): p. 5250-7.
39. Hodge, J.W., M. Chakraborty, C. Kudo-Saito, C. T. Garnett and J. Schlom, *Multiple costimulatory modalities enhance CTL avidity*. *J Immunol*, 2005. **174**(10): p. 5994-6004.
40. Yang, S., K.Y. Tsang, and J. Schlom, *Induction of higher-avidity human CTLs by vector-mediated enhanced costimulation of antigen-presenting cells*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(15): p. 5603-15.
41. Kantor, J., K. Irvine, S. Abrams, H. Kaufman, J. DiPietro and J. Schlom, *Antitumor activity and immune responses induced by a recombinant carcinoembryonic antigen-vaccinia virus vaccine*. *J Natl Cancer Inst*, 1992. **84**(14): p. 1084-91.
42. Kass, E., J. Schlom, J. Thompson, F. Guadagni, P. Graziano and J. W. Greiner, *Induction of protective host immunity to carcinoembryonic antigen (CEA), a self-antigen in CEA transgenic mice, by immunizing with a recombinant vaccinia-CEA virus*. *Cancer Res*, 1999. **59**(3): p. 676-83.
43. Arlen, P.M., H.L. Kaufman, and R.S. DiPaola, *Pox viral vaccine approaches*. *Semin Oncol*, 2005. **32**(6): p. 549-55.
44. Liu, K. and M.C. Nussenzweig, *Origin and development of dendritic cells*. *Immunol Rev*, 2010. **234**(1): p. 45-54.

45. Mastrangelo, M.J., L. C. Eisenlohr, L. Gomella and E. C. Lattime, *Poxvirus vectors: orphaned and underappreciated*. J Clin Invest, 2000. **105**(8): p. 1031-1034.
46. Roberts, K.L. and G.L. Smith, *Vaccinia virus morphogenesis and dissemination*. Trends Microbiol, 2008. **16**(10): p. 472-9.
47. Tsang, K.Y., S. Zaremba, C. A. Nieroda, M. Z. Zhu, J. M. Hamilton and J. Schlom, *Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine*. J Natl Cancer Inst, 1995. **87**(13): p. 982-90.
48. Blanchard, T.J., A. Alcami, P. Andrea and G. L. Smith, *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. **79**(Pt 5): p. 1159-67.
49. Mayr, A., V. Hochstein-Mintzel, and H. Stickl, *Passage history, properties and applicability of the attenuated vaccinia virus strain MVA*. Infection, 1975. **3**(1): p. 6 - 14.
50. Meyer, H., G. Sutter, and A. Mayr, *Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence*. J Gen Virol, 1991. **72**(Pt 5): p. 1031-8.
51. Sutter, G. and C. Staib, *Vaccinia vectors as candidate vaccines: the development of modified vaccinia virus Ankara for antigen delivery*. Curr Drug Targets Infect Disord, 2003. **3**(3): p. 263-71.
52. Stittelaar, K.J., T. Kuiken, R. L. de Swart, G. van Amerongen, H. W. Vos, H. G. M. Niesters, P. van Schalkwijk, T. van der Kwast, L. S. Wyatt, B. Moss and A. D. M. E. Osterhaus, *Safety of modified vaccinia virus Ankara (MVA) in immune-suppressed macaques*. Vaccine, 2001. **19**(27): p. 3700-3709.
53. Carroll, M.W., W. W. Overwijk, R. S. Chamberlain, S. A. Rosenberg, B. Moss and N. P. Restifo, *Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara (MVA) as an effective recombinant vector: a murine tumor model*. Vaccine, 1997. **15**(4): p. 387-94.
54. Hodge, J.W., D. J. Poole, W. M. Aarts, A. Gomez Yafal, L. Gritz and J. Schlom, *Modified vaccinia virus ankara recombinants are as potent as vaccinia recombinants in diversified prime and boost vaccine regimens to elicit therapeutic antitumor responses*. Cancer Res, 2003. **63**(22): p. 7942-9.
55. Sutter, G., L. S. Wyatt, P. L. Foley, J. R. Bennink and B. Moss, *A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus*. Vaccine, 1994. **12**(11): p. 1032-40.
56. Pastoret, P.P. and A. Vanderplasschen, *Poxviruses as vaccine vectors*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2003. **26**(5-6): p. 343-55.
57. Kundig, T.M., C. P. Kalberer, H. Hengartner and R. M. Zinkernagel, *Vaccination with two different vaccinia recombinant viruses: long-term inhibition of secondary vaccination*. Vaccine, 1993. **11**(11): p. 1154-8.
58. Cooney, E.L., A. C. Collier, P. D. Greenberg, R. W. Coombs, J. Zarling, D. E. Arditti, M. C. Hoffman, S. L. Hu and L. Corey, *Safety of and immunological response to a recombinant vaccinia virus vaccine expressing HIV envelope glycoprotein*. Lancet, 1991. **337**(8741): p. 567-72.
59. Taylor, J. and E. Paoletti, *Fowlpox virus as a vector in non-avian species*. Vaccine, 1988. **6**(6): p. 466-8.
60. Aarts, W.M., J. Schlom, and J.W. Hodge, *Vector-based Vaccine/Cytokine Combination Therapy to Enhance Induction of Immune Responses to a Self-Antigen and Antitumor Activity*. Cancer Res, 2002. **62**(20): p. 5770-5777.
61. Hodge, J.W., J. P. McLaughlin, J. A. Kantor and J. Schlom, *Diversified prime and boost protocols using recombinant vaccinia virus and recombinant non-replicating avian pox virus to enhance T-cell immunity and antitumor responses*. Vaccine, 1997. **15**(6-7): p. 759-68.

62. Buller, R.M. and G.J. Palumbo, *Poxvirus pathogenesis*. Microbiol Rev, 1991. **55**(1): p. 80-122.
63. Wibbelt, G., S. H. Tausch, P. W. Dabrowski, O. Kershaw, A. Nitsche and L. Schrick, *Berlin Squirrelpox Virus, a New Poxvirus in Red Squirrels, Berlin, Germany*. Emerg Infect Dis, 2017. **23**(10): p. 1726-1729.
64. Abdussalam, M. and V.E. Cosslett, *Contagious pustular dermatitis virus. I. Studies on morphology*. J Comp Pathol, 1957. **67**: p. 145-156.
65. Nagington, J., A.A. Newton, and R.W. Horne, *The structure of orf virus*. Virology, 1964. **23**(4): p. 461-472.
66. Spehner, D., S. De Carlo, R. Drillien, F. Weiland, K. Mildner, D. Hanau and H. J. Rziha, *Appearance of the bona fide spiral tubule of ORF virus is dependent on an intact 10-kilodalton viral protein*. J Virol, 2004. **78**(15): p. 8085-93.
67. Moss, B., *Poxvirus Cell Entry: How Many Proteins Does it Take?* Viruses, 2012. **4**(5): p. 688-707.
68. Tan, J.L., N. Ueda, A. A. Mercer and S. B. Fleming, *Investigation of orf virus structure and morphogenesis using recombinants expressing FLAG-tagged envelope structural proteins: evidence for wrapped virus particles and egress from infected cells*. J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 3): p. 614-25.
69. Delhon, G., E. R. Tulman, C. L. Afonso, Z. Lu, A. de la Concha-Bermejillo, H. D. Lehmkuhl, M. E. Piccone, G. F. Kutish and D. L. Rock, *Genomes of the Parapoxviruses Orf Virus and Bovine Papular Stomatitis Virus*. J Virol, 2004. **78**(1): p. 168-177.
70. Mercer, A.A., N. Ueda, S.-M. Friederichs, K. Hofmann, K. M. Fraser, T. Bateman and S. B. Fleming, *Comparative analysis of genome sequences of three isolates of Orf virus reveals unexpected sequence variation*. Virus Res, 2006. **116**(1): p. 146-158.
71. Baroudy, B.M., S. Venkatesan, and B. Moss, *Incompletely base-paired flip-flop terminal loops link the two DNA strands of the vaccinia virus genome into one uninterrupted polynucleotide chain*. Cell, 1982. **28**(2): p. 315-24.
72. Buttner, M. and H.J. Rziha, *Parapoxviruses: from the lesion to the viral genome*. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 2002. **49**(1): p. 7-16.
73. Rziha, H.-J., M. Henkel, R. Cottone, M. Meyer, C. Dehio and M. Büttner, *Parapoxviruses: potential alternative vectors for directing the immune response in permissive and non-permissive hosts*. J Biotechnol, 1999. **73**(2): p. 235-242.
74. Cottone, R., M. Buttner, B. Bauer, M. Henkel, E. Hettich and H. J. Rziha, *Analysis of genomic rearrangement and subsequent gene deletion of the attenuated Orf virus strain D1701*. Virus Res, 1998. **56**(1): p. 53-67.
75. Fleming, S.B., D. J. Lyttle, J. T. Sullivan, A. A. Mercer and A. J. Robinson, *Genomic analysis of a transposition-deletion variant of orf virus reveals a 3.3 kbp region of non-essential DNA*. J Gen Virol, 1995. **76**(Pt 12): p. 2969-78.
76. McInnes, C.J., A. R. Wood, P. E. Nettleton and J. A. Gilray, *Genomic comparison of an avirulent strain of Orf virus with that of a virulent wild type isolate reveals that the Orf virus G2L gene is non-essential for replication*. Virus Genes, 2001. **22**(2): p. 141-50.
77. Moss, B., *Poxviridae: The Viruses and Their Replication*, in *Fields Virology*, H.P.M. Knipe D.M., Editor. 2007, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA. p. 2905–2946.
78. Moss, B., *Poxvirus entry and membrane fusion*. Virology, 2006. **344**(1): p. 48-54.
79. Broyles, S.S., *Vaccinia virus transcription*. J Gen Virol, 2003. **84**(Pt 9): p. 2293-303.
80. Fleming, S.B., L.M. Wise, and A.A. Mercer, *Molecular genetic analysis of orf virus: a poxvirus that has adapted to skin*. Viruses, 2015. **7**(3): p. 1505-39.
81. McKeever, D.J., D. McEwan Jenkinson, G. Hutchison and H. W. Reid, *Studies of the pathogenesis of orf virus infection in sheep*. J Comp Pathol, 1988. **99**(3): p. 317-328.
82. Haig, D.M., C. McInnes, D. Deane, H. Reid and A. Mercer, *The immune and inflammatory response to orf virus*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 1997. **20**(3): p. 197-204.
83. Hussain, K.A. and D. Burger, *In vivo and in vitro characteristics of contagious ecthyma virus isolates: Host response mechanism*. Vet Microbiol, 1989. **19**(1): p. 23-36.

84. Jenkinson, D., P. McEwan, S. K. Onwuka, V. A. Moss, H. Y. Elder, G. Hutchison and H. W. Reid, *The Pathological Changes and Polymorphonuclear and Mast Cell Responses in the Skin of Specific Pathogen-free Lambs Following Primary and Secondary Challenge with Orf Virus*. *Vet Dermatol*, 1990. **1**(3): p. 139-150.
85. Haig, D.M. and C.J. McInnes, *Immunity and counter-immunity during infection with the parapoxvirus orf virus*. *Virus Res*, 2002. **88**(1): p. 3-16.
86. Haig, D.M. and A.A. Mercer, *Ovine diseases*. *Orf*. *Vet Res*, 1998. **29**(3-4): p. 311-26.
87. Groves, R.W., E. Wilson-Jones, and D.M. MacDonald, *Human orf and milkers' nodule: A clinicopathologic study*. *J Am Acad Dermatol*, 1991. **25**(4): p. 706-711.
88. Ara, M., P. Zaballo, M. Sánchez, I. Querol, M. L. Zubiri, E. Simal and C. Hörndler, *Giant and recurrent orf virus infection in a renal transplant recipient treated with imiquimod*. *J Am Acad Dermatol*, 2008. **58**(2, Supplement 1): p. S39-S40.
89. Geerinck, K., G. Lukito, R. Snoeck, R. De Vos, E. De Clercq, Y. Vanrenterghem, H. Degreef and B. Maes, *A case of human orf in an immunocompromised patient treated successfully with cidofovir cream*. *J Med Virol*, 2001. **64**(4): p. 543-9.
90. Nettleton, P.F., J. A. Gilray, H. W. Reid and A. A. Mercer, *Parapoxviruses are strongly inhibited in vitro by cidofovir*. *Antiviral Res*, 2000. **48**(3): p. 205-8.
91. Mayr, A., M. Herlyn, H. Mahnel, A. Danco, A. Zach and H. Bostedt, *Bekämpfung des Ecthyma contagiosum (Pustular dermatitis) der Schafe mit einem neuen Parenteral-Zellkultur-Lebendimpfstoff*. *J Vet Med*, 1981. **28**(7): p. 535-552.
92. Rziha, H.J., M. Henkel, R. Cottone, B. Bauer, U. Auge, F. Götz, E. Pfaff, M. Röttgen, C. Dehio and M. Büttner, *Generation of recombinant parapoxviruses: non-essential genes suitable for insertion and expression of foreign genes*. *J Biotechnol*, 2000. **83**(1): p. 137-145.
93. Rziha, H.J., M. Büttner, M. Müller, F. Salomon, A. Reguzova, D. Laible and R. Amann, *Genomic Characterization of Orf Virus Strain D1701-V (Parapoxvirus) and Development of Novel Sites for Multiple Transgene Expression*. *Viruses*, 2019. **11**(2).
94. Dory, D., T. Fischer, V. Béven, R. Cariolet, H.-J. Rziha and A. Jestin, *Prime-boost immunization using DNA vaccine and recombinant Orf virus protects pigs against Pseudorabies virus (Herpes suid 1)*. *Vaccine*, 2006. **24**(37-39): p. 6256-63.
95. Fischer, T., O. Planz, L. Stitz and H. J. Rziha, *Novel recombinant parapoxvirus vectors induce protective humoral and cellular immunity against lethal herpesvirus challenge infection in mice*. *J Virol*, 2003. **77**(17): p. 9312-23.
96. van Rooij, E.M., F. A. Rijsewijk, H. W. Moonen-Leusen, A. T. Bianchi and H. J. Rziha, *Comparison of different prime-boost regimes with DNA and recombinant Orf virus based vaccines expressing glycoprotein D of pseudorabies virus in pigs*. *Vaccine*, 2010. **28**(7): p. 1808-13.
97. Amann, R., J. Rohde, U. Wulle, D. Conlee, R. Raue, O. Martinon and H.-J. Rziha, *A New Rabies Vaccine Based on a Recombinant Orf Virus (Parapoxvirus) Expressing the Rabies Virus Glycoprotein*. *J Virol*, 2013. **87**(3): p. 1618-1630.
98. Hausmann, J., K. Baur, K. R. Engelhardt, T. Fischer, H. J. Rziha and P. Staeheli, *Vaccine-induced protection against Borna disease in wild-type and perforin-deficient mice*. *J Gen Virol*, 2005. **86**(Pt 2): p. 399-403.
99. Henkel, M., O. Planz, T. Fischer, L. Stitz and H. J. Rziha, *Prevention of Virus Persistence and Protection against Immunopathology after Borna Disease Virus Infection of the Brain by a Novel Orf Virus Recombinant*. *J Virol*, 2005. **79**(1): p. 314-325.
100. Rohde, J., R. Amann, and H.-J. Rziha, *New Orf Virus (Parapoxvirus) Recombinant Expressing H5 Hemagglutinin Protects Mice against H5N1 and H1N1 Influenza A Virus*. *PLOS ONE*, 2013. **8**(12): p. e83802.
101. Voigt, H., C. Merant, D. Wienhold, A. Braun, E. Hutet, M. F. Le Potier, A. Saalmuller, E. Pfaff and M. Büttner, *Efficient priming against classical swine fever with a safe glycoprotein E2 expressing Orf virus recombinant (ORFV VrV-E2)*. *Vaccine*, 2007. **25**(31): p. 5915-26.

102. Amann, R., *Orf Virusvektor: Entwicklung neuer Selektionsstrategien, Identifikation neuer Fremdgen-Insertionsorte sowie Herstellung, Charakterisierung und Wirksamkeit eines rekombinanten Tollwutimpfstoffs*. Dissertation 2014, Universität Tübingen: Tübingen.
103. Brun, A., E. Albina, T. Barret, D. A. Chapman, M. Czub, L. K. Dixon, G. M. Keil, B. Klonjowski, M. F. Le Potier, G. Libeau, J. Ortego, J. Richardson and H. H. Takamatsu, *Antigen delivery systems for veterinary vaccine development. Viral-vector based delivery systems*. Vaccine, 2008. **26**(51): p. 6508-28.
104. Büttner, M., C. P. Czerny, K. H. Lehner and K. Wertz, *Interferon induction in peripheral blood mononuclear leukocytes of man and farm animals by poxvirus vector candidates and some poxvirus constructs*. Vet Immunol Immunopathol, 1995. **46**(3-4): p. 237-50.
105. Fachinger, V., T. Schlapp, W. Strube, N. Schmeer and A. Saalmüller, *Poxvirus-Induced Immunostimulating Effects on Porcine Leukocytes*. J Virol, 2000. **74**(17): p. 7943-7951.
106. Friebe, A., A. Siegling, S. Friederichs, H. D. Volk and O. Weber, *Immunomodulatory effects of inactivated parapoxvirus ovis (ORF virus) on human peripheral immune cells: induction of cytokine secretion in monocytes and Th1-like cells*. J Virol, 2004. **78**(17): p. 9400-11.
107. Kruse, N. and O. Weber, *Selective induction of apoptosis in antigen-presenting cells in mice by Parapoxvirus ovis*. J Virol, 2001. **75**(10): p. 4699-704.
108. Haig, D.M., G. Hutchinson, J. Thomson, D. Yirrell and H. W. Reid, *Cytolytic activity and associated serine protease expression by skin and afferent lymph CD8+ T cells during orf virus reinfection*. J Gen Virol, 1996. **77 ( Pt 5)**: p. 953-61.
109. Lear, A., G. Hutchinson, H. W. Reid, M. Norval and D. M. Haig, *Phenotypic characterisation of the dendritic cells accumulating in ovine dermis following primary and secondary orf virus infections*. Eur J Dermatol, 1996. **6**.
110. Haig, D., D. Deane, A. Percival, N. Myatt, J. Thomson, L. Inglis, J. Rothel, H.-F. Seow, P. Wood, H. R. P. Miller and H. W. Reid, *The cytokine response of afferent lymph following orf virus reinfection of sheep*. Vet Dermatol, 1996. **7**(1): p. 11-20.
111. Fleming, S.B., D. M. Haig, P. Nettleton, H. W. Reid, C. A. McCaughan, L. M. Wise and A. Mercer, *Sequence and functional analysis of a homolog of interleukin-10 encoded by the parapoxvirus orf virus*. Virus Genes, 2000. **21**(1-2): p. 85-95.
112. Fleming, S.B., C. A. McCaughan, A. E. Andrews, A. D. Nash and A. A. Mercer, *A homolog of interleukin-10 is encoded by the poxvirus orf virus*. J Virol, 1997. **71**(6): p. 4857-61.
113. Lateef, Z., S. Fleming, G. Halliday, L. Faulkner, A. Mercer and M. Baird, *Orf virus-encoded interleukin-10 inhibits maturation, antigen presentation and migration of murine dendritic cells*. J Gen Virol, 2003. **84**(Pt 5): p. 1101-9.
114. Deane, D., C. J. McInnes, A. Percival, A. Wood, J. Thomson, A. Lear, J. Gilray, S. Fleming, A. Mercer and D. Haig, *Orf virus encodes a novel secreted protein inhibitor of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2*. J Virol, 2000. **74**(3): p. 1313-20.
115. Lateef, Z., M. A. Baird, L. M. Wise, A. A. Mercer and S. B. Fleming, *Orf virus-encoded chemokine-binding protein is a potent inhibitor of inflammatory monocyte recruitment in a mouse skin model*. J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 6): p. 1477-82.
116. Haig, D.M., C. J. McInnes, J. Thomson, A. Wood, K. Bunyan and A. Mercer, *The orf virus OV20.0L gene product is involved in interferon resistance and inhibits an interferon-inducible, double-stranded RNA-dependent kinase*. Immunology, 1998. **93**(3): p. 335-40.
117. McInnes, C.J., A.R. Wood, and A.A. Mercer, *Orf virus encodes a homolog of the vaccinia virus interferon-resistance gene E3L*. Virus Genes, 1998. **17**(2): p. 107-15.
118. Weber, O., A. A. Mercer, A. Friebe, P. Knolle and H. D. Volk, *Therapeutic immunomodulation using a virus--the potential of inactivated orf virus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2013. **32**(4): p. 451-60.
119. Akashi, K., D. Traver, T. Miyamoto and I. L. Weissman, *A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages*. Nature, 2000. **404**: p. 193.
120. Aumüller G, A.G. und Engele J., *Duale Reihe - Anatomie*, in *Duale Reihe Anatomie*. 2014, Georg Thieme Verlag.

121. Kondo, M., D. C. Scherer, A. G. King, M. G. Manz and I. L. Weissman, *Lymphocyte development from hematopoietic stem cells*. *Curr Opin Genet Dev*, 2001. **11**(5): p. 520-526.
122. Manz, M.G., D. Traver, K. Akashi, M. Merad, T. Miyamoto, E. G. Engleman and I. L. Weissman, *Dendritic cell development from common myeloid progenitors*. *Ann N Y Acad Sci*, 2001. **938**: p. 167-73; discussion 173-4.
123. Liu, Z. and P.A. Roche, *Macropinocytosis in phagocytes: regulation of MHC class-II-restricted antigen presentation in dendritic cells*. *Front Physiol*, 2015. **6**: p. 1.
124. Wieczorek, M., E. T. Abualrous, J. Sticht, M. Álvaro-Benito, S. Stolzenberg, F. Noé and C. Freund, *Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation*. *Front Immunol*, 2017. **8**(292).
125. Randolph, G.J., S. Beaulieu, S. Lebecque, R. M. Steinman and W. A. Muller, *Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking*. *Science*, 1998. **282**(5388): p. 480-3.
126. Bonilla, F.A. and H.C. Oettgen, *Adaptive immunity*. *J Allergy Clin Immunol*, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S33-40.
127. Kappler, J.W., N. Roehm, and P. Marrack, *T cell tolerance by clonal elimination in the thymus*. *Cell*, 1987. **49**(2): p. 273-80.
128. Jameson, S.C., K.A. Hogquist, and M.J. Bevan, *Positive Selection of Thymocytes*. *Annu Rev Immunol*, 1995. **13**(1): p. 93-126.
129. Takaba, H. and H. Takayanagi, *The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus*. *Trends Immunol*, 2017. **38**(11): p. 805-816.
130. Meuer, S.C., S.F. Schlossman, and E.L. Reinherz, *Clonal analysis of human cytotoxic T lymphocytes: T4+ and T8+ effector T cells recognize products of different major histocompatibility complex regions*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982. **79**(14): p. 4395-9.
131. Swain, S.L., *T cell subsets and the recognition of MHC class*. *Immunol Rev*, 1983. **74**: p. 129-42.
132. Germain, R.N., *MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation*. *Cell*, 1994. **76**(2): p. 287-99.
133. Bousoo, P. and E. Robey, *Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(6): p. 579-85.
134. Weninger, W., N. Manjunath, and U.H. von Andrian, *Migration and differentiation of CD8+ T cells*. *Immunol Rev*, 2002. **186**: p. 221-33.
135. den Haan, J.M.M., R. Arens, and M.C. van Zelm, *The activation of the adaptive immune system: Cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells*. *Immunol Lett*, 2014. **162**(2, Part B): p. 103-112.
136. Curtsinger, J.M. and M.F. Mescher, *Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation*. *Curr Opin Immunol*, 2010. **22**(3): p. 333-340.
137. Borst, J., T. Ahrends, N. Bąbała, C. J. M. Melief and W. Kastenmüller, *CD4+ T cell help in cancer immunology and immunotherapy*. *Nat Rev Immunol*, 2018. **18**(10): p. 635-647.
138. June, C.H., J. A. Ledbetter, M. M. Gillespie, T. Lindsten and C. B. Thompson, *T-cell proliferation involving the CD28 pathway is associated with cyclosporine-resistant interleukin 2 gene expression*. *Mol Cell Biol*, 1987. **7**(12): p. 4472-81.
139. Bretscher, P. and M. Cohn, *A Theory of Self-Nonself Discrimination*. *Science*, 1970. **169**(3950): p. 1042-1049.
140. Mueller, D.L., M.K. Jenkins, and R.H. Schwartz, *Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy*. *Annu Rev Immunol*, 1989. **7**: p. 445-80.
141. Chen, L. and D.B. Flies, *Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition*. *Nat Rev Immunol*, 2013. **13**(4): p. 227-42.
142. Liechtenstein, T., I. Dufait, A. Lanna, K. Breckpot and D. Escors, *Modulating co-stimulation during antigen presentation to enhance cancer immunotherapy*. *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem*, 2012. **12**(3): p. 224-235.

143. Saito, T., T. Yokosuka, and A. Hashimoto-Tane, *Dynamic regulation of T cell activation and co-stimulation through TCR-microclusters*. FEBS Lett, 2010. **584**(24): p. 4865-71.
144. Jenkins, M.K., D. M. Pardoll, J. Mizuguchi, T. M. Chused and R. H. Schwartz, *Molecular events in the induction of a nonresponsive state in interleukin 2-producing helper T-lymphocyte clones*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(15): p. 5409-13.
145. Jenkins, M.K. and R.H. Schwartz, *Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo*. J Exp Med, 1987. **165**(2): p. 302-19.
146. Sansom, D.M., *CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom?* Immunology, 2000. **101**(2): p. 169-77.
147. Greenwald, R.J., G.J. Freeman, and A.H. Sharpe, *The B7 family revisited*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 515-48.
148. Elgueta, R., M. J. Benson, V. C. de Vries, A. Wasiuk, Y. Guo and R. J. Noelle, *Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system*. Immunol Rev, 2009. **229**(1): p. 152-72.
149. Bhatia, S., M. Edidin, S. C. Almo and S. G. Nathenson, *Different cell surface oligomeric states of B7-1 and B7-2: implications for signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(43): p. 15569-74.
150. Acuto, O. and F. Michel, *CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(12): p. 939-51.
151. Larsen, C.P., S. C. Ritchie, R. Hendrix, P. S. Linsley, K. S. Hathcock, R. J. Hodes, R. P. Lowry and T. C. Pearson, *Regulation of immunostimulatory function and costimulatory molecule (B7-1 and B7-2) expression on murine dendritic cells*. J Immunol, 1994. **152**(11): p. 5208-19.
152. Liu, M.F., J. S. Li, T. H. Weng and H. Y. Lei, *Differential expression and modulation of costimulatory molecules CD80 and CD86 on monocytes from patients with systemic lupus erythematosus*. Scand J Immunol, 1999. **49**(1): p. 82-7.
153. Radvanyi, L.G., A. Banerjee, M. Weir and H. Messner, *Low levels of interferon-alpha induce CD86 (B7.2) expression and accelerates dendritic cell maturation from human peripheral blood mononuclear cells*. Scand J Immunol, 1999. **50**(5): p. 499-509.
154. Freedman, A.S., G. J. Freeman, K. Rhyhart and L. M. Nadler, *Selective induction of B7/BB-1 on interferon-gamma stimulated monocytes: a potential mechanism for amplification of T cell activation through the CD28 pathway*. Cell Immunol, 1991. **137**(2): p. 429-37.
155. Ding, L., P. S. Linsley, L. Y. Huang, R. N. Germain and E. M. Shevach, *IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression*. J Immunol, 1993. **151**(3): p. 1224-34.
156. Buelens, C., F. Willems, A. Delvaux, G. Pierard, J. P. Delville, T. Velu and M. Goldman, *Interleukin-10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells*. Eur J Immunol, 1995. **25**(9): p. 2668-72.
157. Schweitzer, A.N. and A.H. Sharpe, *Mutual regulation between B7-1 (CD80) expressed on T cells and IL-4*. J Immunol, 1999. **163**(9): p. 4819-25.
158. Schweitzer, A.N., F. Borriello, R. C. Wong, A. K. Abbas and A. H. Sharpe, *Role of costimulators in T cell differentiation: studies using antigen-presenting cells lacking expression of CD80 or CD86*. J Immunol, 1997. **158**(6): p. 2713-22.
159. Schweitzer, A.N. and A.H. Sharpe, *Studies using antigen-presenting cells lacking expression of both B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) show distinct requirements for B7 molecules during priming versus restimulation of Th2 but not Th1 cytokine production*. J Immunol, 1998. **161**(6): p. 2762-71.
160. Fields, P.E., R. J. Finch, G. S. Gray, R. Zollner, J. L. Thomas, K. Sturmhoefel, K. Lee, S. Wolf, T. F. Gajewski, F. W. Fitch, *B7.1 is a quantitatively stronger costimulus than B7.2 in the activation of naive CD8+ TCR-transgenic T cells*. J Immunol, 1998. **161**(10): p. 5268-75.

161. Olsson, C., E. Michaelsson, E. Parra, U. Pettersson, P. A. Lando and M. Dohlsten, *Biased dependency of CD80 versus CD86 in the induction of transcription factors regulating the human IL-2 promoter*. *Int Immunol*, 1998. **10**(4): p. 499-506.
162. Beyersdorf, N., T. Kerkau, and T. Hunig, *CD28 co-stimulation in T-cell homeostasis: a recent perspective*. *Immunotargets Ther*, 2015. **4**: p. 111-22.
163. Turka, L.A., J. A. Ledbetter, K. Lee, C. H. June and C. B. Thompson, *CD28 is an inducible T cell surface antigen that transduces a proliferative signal in CD3+ mature thymocytes*. *J Immunol*, 1990. **144**(5): p. 1646-53.
164. Krummel, M.F. and J.P. Allison, *CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation*. *J Exp Med*, 1995. **182**(2): p. 459-65.
165. Sharpe, A.H. and G.J. Freeman, *The B7-CD28 superfamily*. *Nat. Rev. Immunol.*, 2002. **2**: p. 116.
166. Khoury, S.J. and M.H. Sayegh, *The Roles of the New Negative T Cell Costimulatory Pathways in Regulating Autoimmunity*. *Immunity*, 2004. **20**(5): p. 529-538.
167. Chen, L., *Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**: p. 336.
168. Esensten, J.H., Y. A. Helou, G. Chopra, A. Weiss and J. A. Bluestone, *CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy*. *Immunity*, 2016. **44**(5): p. 973-88.
169. Metzler, W.J., J. Bajorath, W. Fenderson, S.-Y. Shaw, K. L. Constantine, J. Naemura, G. Leytze, R. J. Peach, T. B. Lavoie, L. Mueller and P. S. Linsley, *Solution structure of human CTLA-4 and delineation of a CD80/CD86 binding site conserved in CD28*. *Nat Struct Mol Biol*, 1997. **4**: p. 527.
170. Paulie, S., B. Ehlin-Henriksson, H. Mellstedt, H. Koho, H. Ben-Aissa and P. Perlmann, *A p50 surface antigen restricted to human urinary bladder carcinomas and B lymphocytes*. *Cancer Immunol Immunother*, 1985. **20**(1): p. 23-8.
171. Banchereau, J., B. Dubois, J. Fayette, N. Burdin, F. Briere, P. Miossec, M. C. Rissoan, C. van Kooten and C. Caux, *Functional CD40 antigen on B cells, dendritic cells and fibroblasts*. *Adv Exp Med Biol*, 1995. **378**: p. 79-83.
172. van Kooten, C. and J. Banchereau, *Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells*. *Curr Opin Immunol*, 1997. **9**(3): p. 330-7.
173. van Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand*. *J Leukoc Biol*, 2000. **67**(1): p. 2-17.
174. Graf, D., S. Müller, U. Korthäuer, C. v. Kooten, C. Weise and R. A. Kroczeck, *A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation*. *Eur J Immunol*, 1995. **25**: p. 1749-1754.
175. Karpusas, M., Y. M. Hsu, J. H. Wang, J. Thompson, S. Lederman, L. Chess and D. Thomas, *A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand*. *Structure*, 1995. **3**(10): p. 1031-9.
176. Henn, V., J. R. Slupsky, M. Grafe, I. Anagnostopoulos, R. Forster, G. Muller-Berghaus and R. A. Kroczeck, *CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells*. *Nature*, 1998. **391**(6667): p. 591-4.
177. Graf, D., U. Korthäuer, H. W. Mages, G. Senger and R. A. Kroczeck, *Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells*. *Eur J Immunol*, 1992. **22**(12).
178. Bishop, G.A., C. R. Moore, P. Xie, L. L. Stunz and Z. J. Kraus, *TRAF proteins in CD40 signaling*. *Adv Exp Med Biol*, 2007. **597**: p. 131-51.
179. Tong, A.W. and M.J. Stone, *Prospects for CD40-directed experimental therapy of human cancer*. *Cancer Gene Ther*, 2003. **10**(1): p. 1-13.
180. Quezada, S.A., L. Z. Jarvinen, E. F. Lind and R. J. Noelle, *CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity*. *Annu Rev Immunol*, 2004. **22**: p. 307-28.
181. Armitage, R.J. and M.R. Alderson, *B-cell stimulation*. *Curr Opin Immunol*, 1995. **7**(2): p. 243-7.
182. Flavell, I.S.G.a.R.A., *CD40 and CD154 in cell-mediated immunity*. *Annu Rev Immunol*, 1998. **16**.

183. Allen, R., R. Armitage, M. Conley, H. Rosenblatt, N. Jenkins, N. Copeland, M. Bedell, S. Edelhoff, C. Disteche, D. Simoneaux, *CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome*. Science, 1993. **259**(5097): p. 990-993.
184. Aruffo, A., M. Farrington, D. Hollenbaugh, X. Li, A. Milatovich, S. Nonoyama, J. Bajorath, L. S. Grosmaire, R. Stenkamp, M. Neubauer, R. L. Roberts, R. J. Noelle, J. A. Ledbetter, U. Francke and H. D. Ochs, *The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome*. Cell, 1993. **72**(2): p. 291-300.
185. Ferrari, S., S. Giliani, A. Insalaco, A. Al-Ghonaium, A. R. Soresina, M. Loubser, M. A. Avanzini, M. Marconi, R. Badolato, A. G. Ugazio, Y. Levy, N. Catalan, A. Durandy, A. Tbakhi, L. D. Notarangelo and A. Plebani, *Mutations of CD40 gene cause an autosomal recessive form of immunodeficiency with hyper IgM*. Proc Natl Acad Sci, 2001. **98**(22): p. 12614-12619.
186. Korthäuer, U., D. Graf, H. W. Mages, F. Brière, M. Padayachee, S. Malcolm, A. G. Ugazio, L. D. Notarangelo, R. J. Levinsky and R. A. Kroccek, *Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM*. Nature, 1993. **361**: p. 539.
187. Garcia-Arriaza, J. and M. Esteban, *Enhancing poxvirus vectors vaccine immunogenicity*. Hum Vaccin Immunother, 2014. **10**(8): p. 2235-44.
188. Chavan, R., K. A. Marfatia, I. C. An, D. A. Garber and M. B. Feinberg, *Expression of CCL20 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, but not Flt3-L, from modified vaccinia virus ankara enhances antiviral cellular and humoral immune responses*. J Virol, 2006. **80**(15): p. 7676-87.
189. Dreicer, R., W. M. Stadler, F. R. Ahmann, T. Whiteside, N. Bizouarne, B. Acres, J.-M. Limacher, P. Squiban and A. Pantuck, *MVA-MUC1-IL2 vaccine immunotherapy (TG4010) improves PSA doubling time in patients with prostate cancer with biochemical failure*. Invest New Drugs 2009. **27**(4): p. 379-386.
190. Kolibab, K., A. Yang, S. C. Derrick, T. A. Waldmann, L. P. Perera and S. L. Morris, *Highly persistent and effective prime/boost regimens against tuberculosis that use a multivalent modified vaccine virus Ankara-based tuberculosis vaccine with interleukin-15 as a molecular adjuvant*. Clin Vaccine Immunol, 2010. **17**(5): p. 793-801.
191. Rodríguez, A.M., M. F. Pascutti, C. Maeto, J. Falivene, M. P. Holgado, G. Turk and M. M. Gherardi, *IL-12 and GM-CSF in DNA/MVA Immunizations against HIV-1 CRF12\_BF Nef Induced T-Cell Responses With an Enhanced Magnitude, Breadth and Quality*. PLOS ONE, 2012. **7**(5): p. e37801.
192. Wingren, A.G., E. Parra, M. Varga, T. Kalland, H. O. Sjogren, G. Hedlund and M. Dohlsten, *T cell activation pathways: B7, LFA-3, and ICAM-1 shape unique T cell profiles*. Crit Rev Immunol, 1995. **15**(3-4): p. 235-53.
193. Hodge, J.W., A. N. Rad, D. W. Grosenbach, H. Sabzevari, A. G. Yafal, L. Gritz and J. Schlom, *Enhanced activation of T cells by dendritic cells engineered to hyperexpress a triad of costimulatory molecules*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(15): p. 1228-39.
194. Palena, C., M. Zhu, J. Schlom and K.-Y. Tsang, *Human B cells that hyperexpress a triad of costimulatory molecules via avipox-vector infection: an alternative source of efficient antigen-presenting cells*. Blood, 2004. **104**(1): p. 192-199.
195. Hodge, J.W., H. Sabzevari, A. Gómez Yafal, L. Gritz, M. G. O. Lorenz and J. Schlom, *A Triad of Costimulatory Molecules Synergize to Amplify T-Cell Activation*. Cancer Research, 1999. **59**(22): p. 5800-5807.
196. Singh, P., S. K. Pal, A. Alex and N. Agarwal, *Development of PROSTVAC immunotherapy in prostate cancer*. Future Oncol (London, England), 2015. **11**(15): p. 2137-2148.
197. Kantoff, P.W., T. J. Schuetz, B. A. Blumenstein, L. M. Glode, D. L. Bihartz, M. Wyand, K. Manson, D. L. Panicali, R. Laus, J. Schlom, W. L. Dahut, P. M. Arlen, J. L. Gulley and W. R. Godfrey, *Overall survival analysis of a phase II randomized controlled trial of a Poxviral-based PSA-targeted immunotherapy in metastatic castration-resistant prostate cancer*. J Clin Oncol, 2010. **28**(7): p. 1099-105.

198. Gulley, J.L., M. Borre, N. J. Vogelzang, S. Ng, N. Agarwal, C. C. Parker, D. W. Pook, P. Rathenborg, T. W. Flaig, J. Carles, N. D. Shore, L. Chen, C. R. Heery, W. R. Gerritsen, F. Priou and P. W. Kantoff, *Results of PROSPECT: A randomized phase 3 trial of PROSTVAC-V/F (PRO) in men with asymptomatic or minimally symptomatic metastatic, castration-resistant prostate cancer*. J Clin Oncol, 2018. **36**(15\_suppl): p. 5006-5006.
199. Feder-Mengus, C., E. Schultz-Thater, D. Oertli, W. R. Marti, M. Heberer, G. C. Spagnoli and P. Zajac, *Nonreplicating recombinant vaccinia virus expressing CD40 ligand enhances APC capacity to stimulate specific CD4+ and CD8+ T cell responses*. Hum Gene Ther, 2005. **16**(3): p. 348-60.
200. Lauterbach, H., J. Patzold, R. Kassub, B. Bathke, K. Brinkmann, P. Chaplin, M. Suter and H. Hochrein, *Genetic Adjuvantation of Recombinant MVA with CD40L Potentiates CD8 T Cell Mediated Immunity*. Front Immunol, 2013. **4**(251).
201. Liu, J., Q. Yu, G. W. Stone, F. Y. Yue, N. Ngai, R. B. Jones, R. S. Kornbluth and M. A. Ostrowski, *CD40L expressed from the canarypox vector, ALVAC, can boost immunogenicity of HIV-1 canarypox vaccine in mice and enhance the in vitro expansion of viral specific CD8+ T cell memory responses from HIV-1-infected and HIV-1-uninfected individuals*. Vaccine, 2008. **26**(32): p. 4062-72.
202. Sinclair, J. and P. Sissons, *Latency and reactivation of human cytomegalovirus*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 7): p. 1763-79.
203. Klenerman, P. and A. Oxenius, *T cell responses to cytomegalovirus*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(6): p. 367-77.
204. Ross, S.A., Z. Novak, S. Pati and S. B. Boppana, *Overview of the diagnosis of cytomegalovirus infection*. Infect Disord Drug Targets, 2011. **11**(5): p. 466-474.
205. Krishnan, A., Z. Wang, T. Srivastava, R. Rawal, P. Manchanda, D. J. Diamond and C. La Rosa, *A novel approach to evaluate the immunogenicity of viral antigens of clinical importance in HLA transgenic murine models*. Immunol Lett, 2008. **120**(1-2): p. 108-16.
206. Khan, N., M. Cobbold, R. Keenan and P. A. Moss, *Comparative analysis of CD8+ T cell responses against human cytomegalovirus proteins pp65 and immediate early 1 shows similarities in precursor frequency, oligoclonality, and phenotype*. J Infect Dis, 2002. **185**(8): p. 1025-34.
207. Paulus, C., S. Krauss, and M. Nevels, *A human cytomegalovirus antagonist of type I IFN-dependent signal transducer and activator of transcription signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(10): p. 3840-5.
208. Abate, D.A., S. Watanabe, and E.S. Mocarski, *Major human cytomegalovirus structural protein pp65 (ppUL83) prevents interferon response factor 3 activation in the interferon response*. J Virol, 2004. **78**(20): p. 10995-1006.
209. Cristea, I.M., N. J. Moorman, S. S. Terhune, C. D. Cuevas, E. S. O'Keefe, M. P. Rout, B. T. Chait and T. Shenk, *Human cytomegalovirus pUL83 stimulates activity of the viral immediate-early promoter through its interaction with the cellular IFI16 protein*. J Virol, 2010. **84**(15): p. 7803-14.
210. Morrison, D.C. and J.L. Ryan, *Endotoxins and disease mechanisms*. Annu Rev Med, 1987. **38**: p. 417-32.
211. Allen, L.A. and A. Aderem, *Mechanisms of phagocytosis*. Curr Opin Immunol, 1996. **8**(1): p. 36-40.
212. Goddette, D.W. and C. Frieden, *Actin polymerization. The mechanism of action of cytochalasin D*. J Biol Chem, 1986. **261**(34): p. 15974-80.
213. Cooper, J.A., *Effects of cytochalasin and phalloidin on actin*. J Cell Biol, 1987. **105**(4): p. 1473-8.
214. Singla, B., P. Ghoshal, H. Lin, Q. Wei, Z. Dong and G. Csanyi, *PKCdelta-Mediated Nox2 Activation Promotes Fluid-Phase Pinocytosis of Antigens by Immature Dendritic Cells*. Front Immunol, 2018. **9**(537).

215. Sarkar, K., M. J. Kruhlak, S. L. Erlandsen and S. Shaw, *Selective inhibition by rottlerin of macropinocytosis in monocyte-derived dendritic cells*. Immunology, 2005. **116**(4): p. 513-24.
216. Raghu, H., N. Sharma-Walia, M. V. Veetil, S. Sadagopan and B. Chandran, *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus utilizes an actin polymerization-dependent macropinocytic pathway to enter human dermal microvascular endothelial and human umbilical vein endothelial cells*. J Virol, 2009. **83**(10): p. 4895-911.
217. Norbury, C.C., *Drinking a lot is good for dendritic cells*. Immunology, 2006. **117**(4): p. 443-51.
218. Rohde, J., H. Schirmer, H. Granzow and H.-J. Rziha, *A new recombinant Orf virus (ORFV, Parapoxvirus) protects rabbits against lethal infection with rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV)*. Vaccine, 2011. **29**(49): p. 9256-9264.
219. Yu, Q., B. Jones, N. Hu, H. Chang, S. Ahmad, J. Liu, M. Parrington and M. Ostrowski, *Comparative analysis of tropism between canarypox (ALVAC) and vaccinia viruses reveals a more restricted and preferential tropism of ALVAC for human cells of the monocytic lineage*. Vaccine, 2006. **24**(40): p. 6376-6391.
220. Liu, L., R. Chavan, and M.B. Feinberg, *Dendritic Cells are preferentially targeted among hematology lymphocytes by Modified Vaccinia Virus Ankara and play a key role in the induction of virus-specific T cell responses in vivo*. BMC Immunology, 2008. **9**(1): p. 15.
221. Flechsig, C., Y. Suezter, M. Kapp, S. M. Tan, J. Löffler, G. Sutter, H. Einsele and G. U. Grigoleit, *Uptake of antigens from modified vaccinia Ankara virus-infected leukocytes enhances the immunostimulatory capacity of dendritic cells*. Cytotherapy, 2011. **13**(6): p. 739-52.
222. Altenburg, A.F., C. E. van de Sandt, B. W. S. Li, R. J. MacLoughlin, R. A. M. Fouchier, G. van Amerongen, A. Volz, R. W. Hendriks, R. L. de Swart, G. Sutter, G. F. Rimmelzwaan and R. D. de Vries, *Modified Vaccinia Virus Ankara Preferentially Targets Antigen Presenting Cells In Vitro, Ex Vivo and In Vivo*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 8580.
223. Kalia, M. and S. Jameel, *Virus entry paradigms*. Amino Acids, 2011. **41**(5): p. 1147-57.
224. Mercer, J. and A. Helenius, *Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells*. Science, 2008. **320**(5875): p. 531-5.
225. Mercer, J. and A. Helenius, *Virus entry by macropinocytosis*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(5): p. 510-20.
226. Swanson, J.A. and C. Watts, *Macropinocytosis*. Trends Cell Biol, 1995. **5**(11): p. 424-428.
227. Peruzzi, G., M. Masilamani, F. Borrego and J. E. Coligan, *Endocytosis as a mechanism of regulating natural killer cell function: unique endocytic and trafficking pathway for CD94/NKG2A*. Immunol Res, 2009. **43**(1-3): p. 210-222.
228. Siegemund, S., A. Hartl, H. von Buttlar, F. Dautel, R. Raue, M. A. Freudenberg, G. Fejer, M. Büttner, G. Kohler, C. J. Kirschning, T. Sparwasser and G. Alber, *Conventional bone marrow-derived dendritic cells contribute to toll-like receptor-independent production of alpha/beta interferon in response to inactivated parapoxvirus ovis*. J Virol, 2009. **83**(18): p. 9411-22.
229. von Buttlar, H., S. Siegemund, M. Büttner and G. Alber, *Identification of Toll-like receptor 9 as parapoxvirus ovis-sensing receptor in plasmacytoid dendritic cells*. PLOS ONE, 2014. **9**(8).
230. Drillien, R., D. Spehner, and D. Hanau, *Modified vaccinia virus Ankara induces moderate activation of human dendritic cells*. J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 8): p. 2167-75.
231. Kleiveland, C.R., *Peripheral Blood Mononuclear Cells*, in *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, K. Verhoeckx, et al., Editors. 2015, Springer International Publishing: Cham. p. 161-167.
232. Kastenmüller, W., I. Drexler, H. Ludwig, V. Erfle, C. Peschel, H. Bernhard and G. Sutter, *Infection of human dendritic cells with recombinant vaccinia virus MVA reveals general persistence of viral early transcription but distinct maturation-dependent cytopathogenicity*. Virology, 2006. **350**(2): p. 276-88.

233. Bosshart, H. and M. Heinzelmann, *Spontaneous decrease of CD14 cell surface expression in human peripheral blood monocytes ex vivo*. J Immunol Methods, 2011. **368**(1-2): p. 80-3.
234. Heidenreich, S., M. Schmidt, C. August, P. Cullen, A. Rademaekers and H. G. Pauels, *Regulation of human monocyte apoptosis by the CD14 molecule*. J Immunol, 1997. **159**(7): p. 3178-88.
235. Romagnani, P., L. Maggi, B. Mazzinghi, L. Cosmi, L. Lasagni, F. Liotta, E. Lazzeri, R. Angeli, M. Rotondi, L. Fili, P. Parronchi, M. Serio, E. Maggi, S. Romagnani and F. Annunziato, *CXCR3-mediated opposite effects of CXCL10 and CXCL4 on TH1 or TH2 cytokine production*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **116**(6): p. 1372-9.
236. Tanaka, T., M. Narazaki, and T. Kishimoto, *IL-6 in inflammation, immunity, and disease*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. **6**(10): p. a016295-a016295.
237. Kishimoto, T., *Factors affecting B-cell growth and differentiation*. Annu Rev Immunol, 1985. **3**: p. 133-57.
238. Okada, M., M. Kitahara, S. Kishimoto, T. Matsuda, T. Hirano and T. Kishimoto, *IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells*. J Immunol, 1988. **141**(5): p. 1543-9.
239. Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka and V. K. Kuchroo, *IL-17 and Th17 Cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 485-517.
240. Liu, M., S. Guo, and J.K. Stiles, *The emerging role of CXCL10 in cancer (Review)*. Oncol Lett, 2011. **2**(4): p. 583-589.
241. Loetscher, M., P. Loetscher, N. Brass, E. Meese and B. Moser, *Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization*. Eur J Immunol, 1998. **28**(11): p. 3696-705.
242. Qin, S., J. B. Rottman, P. Myers, N. Kassam, M. Weinblatt, M. Loetscher, A. E. Koch, B. Moser and C. R. Mackay, *The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions*. J Clin Invest, 1998. **101**(4): p. 746-54.
243. Menten, P., A. Wuyts, and J. Van Damme, *Macrophage inflammatory protein-1*. Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13**(6): p. 455-481.
244. Deshmane, S.L., S. Kremlev, S. Amini and B. E. Sawaya, *Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview*. J Interferon Cytokine Res, 2009. **29**(6): p. 313-326.
245. Aldinucci, D. and A. Colombatti, *The Inflammatory Chemokine CCL5 and Cancer Progression*. Mediators Inflamm, 2014. **2014**: p. 12.
246. Liu, Q., A. Li, Y. Tian, J. D. Wu, Y. Liu, T. Li, Y. Chen, X. Han and K. Wu, *The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer*. Cytokine Growth Factor Rev, 2016. **31**: p. 61-71.
247. Ziegler, S.F., F. Ramsdell, and M.R. Alderson, *The activation antigen CD69*. Stem Cells, 1994. **12**(5): p. 456-65.
248. Mayr, A., M. Büttner, G. Wolf, H. Meyer and C. Czerny, *Experimental detection of the paraspecific effects of purified and inactivated poxviruses*. Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. J Vet Med. Series B, 1989. **36**(2): p. 81-99.
249. Diamond, D.J., J. York, J.-Y. Sun, C. L. Wright and S. J. Forman, *Development of a Candidate HLA A\*0201 Restricted Peptide-Based Vaccine Against Human Cytomegalovirus Infection*. Blood, 1997. **90**(5): p. 1751-1767.
250. Hanke, T., T. J. Blanchard, J. Schneider, G. S. Ogg, R. Tan, M. Becker, S. C. Gilbert, A. V. Hill, G. L. Smith and A. McMichael, *Immunogenicities of intravenous and intramuscular administrations of modified vaccinia virus Ankara-based multi-CTL epitope vaccine for human immunodeficiency virus type 1 in mice*. J Gen Virol, 1998. **79**(Pt 1): p. 83-90.
251. Fend, L., T. Gatard-Scheikl, J. Kintz, M. Gantzer, E. Schaedler, K. Rittner, S. Cochin, S. Fournel and X. Preville, *Intravenous injection of MVA virus targets CD8+ lymphocytes to tumors to control tumor growth upon combinatorial treatment with a TLR9 agonist*. Cancer Immunol Res, 2014. **2**(12): p. 1163-74.
252. Cella, M., D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia and G. Alber, *Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and*

- enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation.* J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 747-52.
253. Schoenberger, S.P., R. E. Toes, E. I. van der Voort, R. Offringa and C. J. Melief, *T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions.* Nature, 1998. **393**(6684): p. 480-3.
254. Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, C. Van Kooten, I. Durand and J. Banchereau, *Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking.* J Exp Med, 1994. **180**(4): p. 1263-72.
255. Lanzavecchia, A., *Licence to kill.* Nature, 1998. **393**.
256. Vonderheide, R.H. and M.J. Glennie, *Agonistic CD40 antibodies and cancer therapy.* Clin Cancer Res, 2013. **19**(5): p. 1035-1043.
257. Hassan, S.B., J. F. Sorensen, B. N. Olsen and A. E. Pedersen, *Anti-CD40-mediated cancer immunotherapy: an update of recent and ongoing clinical trials.* Immunopharmacol Immunotoxicol, 2014. **36**(2): p. 96-104.
258. Johnson, P., R. Challis, F. Chowdhury, Y. Gao, M. Harvey, T. Geldart, P. Kerr, C. Chan, A. Smith, N. Steven, C. Edwards, M. Ashton-Key, E. Hodges, A. Tutt, C. Ottensmeier, M. Glennie and A. Williams, *Clinical and Biological Effects of an Agonist Anti-CD40 Antibody: A Cancer Research UK Phase I Study.* Clin Cancer Res, 2015. **21**(6): p. 1321-1328.
259. Kuniyoshi, J.S., C. J. Kuniyoshi, A. M. Lim, F. Y. Wang, E. R. Bade, R. Lau, E. K. Thomas and J. S. Weber, *Dendritic Cell Secretion of IL-15 Is Induced by Recombinant huCD40LT and Augments the Stimulation of Antigen-Specific Cytolytic T Cells.* Cell Immunol, 1999. **193**(1): p. 48-58.
260. Trella, E., N. Raafat, C. Mengus, E. Traunecker, V. Governa, S. Heidtmann, M. Heberer, D. Oertli, G. C. Spagnoli and P. Zajac, *CD40 ligand-expressing recombinant vaccinia virus promotes the generation of CD8(+) central memory T cells.* Eur J Immunol, 2016. **46**(2): p. 420-31.
261. Koya, R.C., N. Kasahara, P. M. Favaro, R. Lau, H. Q. Ta, J. S. Weber and R. Stripecke, *Potent maturation of monocyte-derived dendritic cells after CD40L lentiviral gene delivery.* J Immunother, 2003. **26**(5): p. 451-60.
262. Chen, Y., J. Chen, Y. Xiong, Q. Da, Y. Xu, X. Jiang and H. Tang, *Internalization of CD40 regulates its signal transduction in vascular endothelial cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2006. **345**(1): p. 106-117.
263. Banchereau, J., F. Bazan, D. Blanchard, F. Briere, J. P. Galizzi, C. van Kooten, Y. J. Liu, F. Rousset and S. Saeland, *The CD40 antigen and its ligand.* Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 881-922.
264. Clark, E.A. and J.A. Ledbetter, *Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(12): p. 4494-8.
265. Klebanoff, C.A., L. Gattinoni, P. Torabi-Parizi, K. Kerstann, A. R. Cardones, S. E. Finkelstein, D. C. Palmer, P. A. Antony, S. T. Hwang, S. A. Rosenberg, T. A. Waldmann and N. P. Restifo, *Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(27): p. 9571-6.
266. Nonoyama, S., D. Hollenbaugh, A. Aruffo, J. A. Ledbetter and H. D. Ochs, *B cell activation via CD40 is required for specific antibody production by antigen-stimulated human B cells.* J Exp Med, 1993. **178**(3): p. 1097-1102.
267. Murphy, K.M., *Janeway's Immunobiology.* 2011, London, UK: Taylor & Francis Group.
268. Kwa, S., L. Lai, S. Gangadhara, M. Siddiqui, V. B. Pillai, C. Labranche, T. Yu, B. Moss, D. C. Montefiori, H. L. Robinson, P. A. Kozlowski and R. R. Amara, *CD40L-Adjuvanted DNA/Modified Vaccinia Virus Ankara Simian Immunodeficiency Virus SIV239 Vaccine Enhances SIV-Specific Humoral and Cellular Immunity and Improves Protection against a Heterologous SIVE660 Mucosal Challenge.* J Virol, 2014. **88**(17): p. 9579-9589.

269. Malmstrom, P.U., A. S. Loskog, C. A. Lindqvist, S. M. Mangsbo, M. Fransson, A. Wanders, T. Gardmark and T. H. Totterman, *AdCD40L immunogene therapy for bladder carcinoma--the first phase I/IIa trial*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(12): p. 3279-87.
270. Loskog, A., A. Maleka, S. Mangsbo, E. Svensson, C. Lundberg, A. Nilsson, J. Krause, M. Agnarsdottir, A. Sundin, H. Ahlstrom, T. H. Totterman and G. Ullenhag, *Immunostimulatory AdCD40L gene therapy combined with low-dose cyclophosphamide in metastatic melanoma patients*. Br J Cancer, 2016. **114**(8): p. 872-80.
271. Marti, W.R., P. Zajac, G. Spagnoli, M. Heberer and D. Oertli, *Nonreplicating recombinant vaccinia virus encoding human B-7 molecules elicits effective costimulation of naive and memory CD4+ T lymphocytes in vitro*. Cell Immunol, 1997. **179**(2): p. 146-52.
272. Zajac, P., A. Schütz, D. Oertli, C. Noppen, C. Schaefer, M. Heberer, G. C. Spagnoli and W. R. Marti, *Enhanced Generation of Cytotoxic T Lymphocytes Using Recombinant Vaccinia Virus Expressing Human Tumor-associated Antigens and B7 Costimulatory Molecules*. Cancer Res, 1998. **58**(20): p. 4567-4571.
273. Chamberlain, R.S., M. W. Carroll, V. Bronte, P. Hwu, S. Warren, J. C. Yang, M. Nishimura, B. Moss, S. A. Rosenberg and N. P. Restifo, *Costimulation enhances the active immunotherapy effect of recombinant anticancer vaccines*. Cancer Res, 1996. **56**(12): p. 2832-2836.
274. Zhu, M., H. Terasawa, J. Gulley, D. Panicali, P. Arlen, J. Schlom and K. Y. Tsang, *Enhanced activation of human T cells via avipox vector-mediated hyperexpression of a triad of costimulatory molecules in human dendritic cells*. Cancer Res, 2001. **61**(9): p. 3725-34.
275. Chang, J., J. H. Cho, S. W. Lee, S. Y. Choi, S. J. Ha and Y. C. Sung, *IL-12 priming during in vitro antigenic stimulation changes properties of CD8 T cells and increases generation of effector and memory cells*. J Immunol, 2004. **172**(5): p. 2818-26.
276. Henry, C.J., D. A. Ornelles, L. M. Mitchell, K. L. Brzoza-Lewis and E. M. Hiltbold, *IL-12 produced by dendritic cells augments CD8+ T cell activation through the production of the chemokines CCL1 and CCL17*. J Immunol, 2008. **181**(12): p. 8576-8584.
277. Robert-Koch-Institut. *RKI-Ratgeber - Zytomegalievirus-Infektion*. 2014 [cited March 2019; Available from: [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Zytomegalievirus.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Zytomegalievirus.html)].
278. Gulley, J.L., R. A. Madan, R. Pachynski, P. Mulders, N. A. Sheikh, J. Trager and C. G. Drake, *Role of Antigen Spread and Distinctive Characteristics of Immunotherapy in Cancer Treatment*. J Natl Cancer Inst, 2017. **109**(4): p. djw261.
279. Walter, S., T. Weinschenk, A. Stenzl, R. Zdrojowy, A. Pluzanska, C. Szczylik, M. Staehler, W. Brugger, P. Y. Dietrich, R. Mendrzyk, N. Hilf, O. Schoor, J. Fritsche, A. Mahr, D. Maurer, V. Vass, C. Trautwein, P. Lewandrowski, C. Flohr, H. Pohla, J. J. Stanczak, V. Bronte, S. Mandruzzato, T. Biedermann, G. Pawelec, E. Derhovanessian, H. Yamagishi, T. Miki, F. Hongo, N. Takaha, K. Hirakawa, H. Tanaka, S. Stevanovic, J. Frisch, A. Mayer-Mokler, A. Kirner, H. G. Rammensee, C. Reinhardt and H. Singh-Jasuja, *Multipeptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival*. Nat Med, 2012. **18**(8): p. 1254-61.
280. Zippelius, A., P. Batard, V. Rubio-Godoy, G. Bioley, D. Lienard, F. Lejeune, D. Rimoldi, P. Guillaume, N. Meidenbauer, A. Mackensen, N. Rufer, N. Lubenow, D. Speiser, J. C. Cerottini, P. Romero and M. J. Pittet, *Effector function of human tumor-specific CD8 T cells in melanoma lesions: a state of local functional tolerance*. Cancer Res, 2004. **64**(8): p. 2865-73.

