

**Entwicklung neuartiger Influenza-A-subunit-Impfstoffe,
basierend auf rekombinanter *Kluyveromyces lactis***

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Dipl.-Biologin Mandy Gebauer

geb. am 21.02.1986 in Leipzig

öffentlich verteidigt am 04.06.2018

Gutachter:

Prof. Dr. Sven-Erik Behrens

Prof. Dr. Gary Sawers

Prof. Dr. Uwe Truyen

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IV
1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Influenza.....	1
1.1.1 Das Influenza-A-Virus.....	2
1.1.2 Morphologie des Virions und Virusreplikation.....	3
1.1.3 Immunantworten auf Influenza-A-Virusinfektionen.....	7
1.1.4 Das immunodominante Glykoprotein Hämagglutinin des Influenzavirus.....	11
1.1.5 Das konservierte Matrixprotein 1 des Influenzavirus.....	14
1.2 Prävention durch Impfung.....	15
1.2.1 Impfstoffe gegen aviäre Influenza und aktuelle Impfsituation.....	16
1.2.2 Virale Proteine als Untereinheiten für <i>subunit</i> -Impfstoffe.....	16
1.3 Expressionssysteme für die Herstellung von <i>subunit</i>-Impfstoffen.....	17
1.4 Neuartige Tierimpfstoffe auf Basis von <i>Kluyveromyces lactis</i>.....	19
1.4.1 Verwendung von <i>K. lactis</i> als heterologes Expressionssystem.....	20
1.4.2 Expressionskassette.....	21
1.5 Zielstellung.....	23
2. MATERIAL UND METHODEN.....	24
2.1 Materialien.....	24
2.1.1 Geräte.....	24
2.1.2 Verwendete Software.....	25
2.1.3 Chemikalien, Puffer und Verbrauchsmaterial.....	25
2.1.4 Puffer und Lösungen.....	25
2.1.5 Enzyme.....	26
2.1.6 Bakterien- und Hefestämme.....	27
2.1.6.1 <i>Escherichia coli</i>	27
2.1.6.2 <i>Kluyveromyces lactis</i>	27
2.1.7 Plasmide.....	28
2.1.8 Zelllinien.....	28
2.1.9 Synthetische Oligonukleotide.....	28
2.1.10 Antikörper.....	29
2.1.11 Nährmedien.....	29
2.1.11.1 Nährmedien für Hefen.....	29
2.1.11.2 Nährmedien für Bakterien.....	30
2.1.11.3 Nährmedien für die Zellkultur.....	31
2.2 Methoden.....	31
2.2.1 Molekularbiologische Arbeiten mit DNA.....	31
2.2.1.1 Klonierung.....	31
2.2.1.2 <i>Polymerase chain reaction</i> (PCR).....	32
2.2.1.3 Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	32
2.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	32
2.2.1.5 Isolation von DNA aus Agarosegelen.....	33
2.2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten.....	33
2.2.1.7 Transformation von <i>E. coli</i>	33
2.2.1.8 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> (Miniplasmidpräparation).....	34
2.2.1.9 DNA-Sequenzierung.....	34
2.2.1.10 Transformation von <i>K. lactis</i>	35
2.2.1.11 Schnellisolierung genomischer DNA aus Hefezellen.....	36

2.2.2	Zellbiologische Arbeiten	36
2.2.2.1	Anzucht rekombinanter <i>K. lactis</i>	36
2.2.2.2	Indirekte Immunfluoreszenz von Hefen	37
2.2.2.3	Tropfentest.....	38
2.2.2.4	Kultivierung von MDCK-Zellen.....	39
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	39
2.2.3.1	Isolation von Gesamtprotein aus <i>K. lactis</i>	39
2.2.3.2	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (SDS-PAGE).....	40
2.2.3.3	Western-Blot-Analyse	40
2.2.3.4	Semiquantitative Analyse der H1-Konzentration im Zellysate von <i>K. lactis</i>	41
2.2.3.5	Induktionskinetik rekombinanter <i>K. lactis</i> -Stämme	42
2.2.3.6	Deglykosylierung von Hämagglutinin (HA)	42
2.2.4	Arbeiten mit dem Influenza-A-Virus.....	43
2.2.4.1	Bestimmung des Virustiters mit Avicel-Plaque-Test	43
2.2.4.2	Bestimmung des Antikörpertiters mit Virusneutralisationstest	44
2.2.4.3	Erstellung von zytoplasmatischem Extrakt aus MDCK-Zellen	45
2.2.5	Tierexperimentelle Arbeiten	46
2.2.5.1	Artgerechte Haltung von Versuchstieren	46
2.2.5.2	Subkutane Immunisierung von Mäusen.....	47
2.2.5.3	Bestimmung der mittleren Maus-letalen-Dosis (MLD ₅₀).....	47
2.2.5.4	Infektion von BALB/c Mäusen mit Influenza-A-Virus.....	48
2.2.5.5	Serumgewinnung.....	48
2.2.5.6	Mechanische Homogenisierung von Lungengewebe	48
3.	ERGEBNISSE	50
3.1	Charakterisierung rekombinanter <i>K. lactis</i>-Stämme	50
3.1.1	Charakterisierung von VAK952	51
3.1.1.1	H1 _{PR8} -Synthesekinetik in VAK952 nach Geninduktion mit Lactose	52
3.1.1.2	Untersuchungen zum Wachstum von VAK952.....	53
3.1.1.3	H1 _{PR8} -Konzentration pro VAK952-Biotrockenmasse	55
3.1.2	Charakterisierung von VAK1047	56
3.1.2.1	H1 _{CAI} -Synthesekinetik und Wachstum von VAK1047	56
3.1.2.2	Nachweis von H1 in rekombinanten Hefezellen durch Immunfluoreszenz.....	57
3.1.3	Generierung / Charakterisierung von VAK1091 (mH1 _{PR8})	58
3.1.3.1	Generierung von VAK1091 (mH1 _{PR8})	59
3.1.3.2	Nachweis von mH1 _{PR8} und enzymatische Deglykosylierung	59
3.1.3.3	Nachweis von mH1 _{PR8} in VAK1091 durch Immunfluoreszenz.....	60
3.1.3.4	mH1 _{PR8} -Synthesekinetik und Wachstum von VAK1091.....	61
3.2	Evaluierung des immunogenen Potenzials <i>K. lactis</i>-basierter Influenzaimpfstoffe	63
3.2.1	Immunisierung mit H1-rekombinanter <i>K. lactis</i>	64
3.2.2	Erhöhung der Impfdosis von VAK952	65
3.2.3	Evaluierung alternativer Adjuvantien.....	66
3.2.4	Immunisierung mit einer maximalen Impfdosis von VAK952	68
3.3	Nachweis des Impfschutzes von <i>K. lactis</i>-basierten Impfstoffen	69
3.3.1	Nachweis neutralisierender und HA-spezifischer Antikörper	70
3.3.2	Protektion nach Immunisierung mit rekombinanter <i>K. lactis</i>	73
3.4	Dosis-Wirkungs-Analyse des <i>subunit</i>-Impfstoffes VAK952	75
3.4.1	Korrelation zwischen Impfdosis und Antikörpertiter	75
3.4.2	Korrelation zwischen Impfdosis und Schutzwirkung	76
3.5	Evaluierung des Impfschemas.....	78
3.5.1	Antikörper-Nachweis nach Anwendung verkürzter Impfschemata	79
3.5.2	Protektion nach verkürztem Impfschema	80
3.6	Prozessierung <i>K. lactis</i>-basierter <i>subunit</i>-Impfstoffe.....	81

3.6.1	Untersuchungen zur Lagerstabilität des <i>subunit</i> -Impfstoffes VAK952	82
3.6.2	Evaluierung eines geeigneten Sterilisationsverfahrens	83
3.7	Weitere Optimierung <i>K. lactis</i>-basierter Impfstoffe	85
3.7.1	Verfahren zur Insertion eines zusätzlichen Fremdgens	86
3.7.2	Generierung von <i>K. lactis</i> -Stämmen mit zwei Fremdontigenen	87
3.7.2.1	Charakterisierung von <i>K. lactis</i> mit zwei $H1_{PR8}$ -Genkopien und Promoter-Modifikation.....	88
3.7.2.2	Analyse des immunogenen Potenzials von VAK1255	91
3.7.2.3	Charakterisierung von <i>K. lactis</i> mit je einer Genkopie von $H1_{PR8}$ und $M1_{PR8}$	92
3.7.2.4	Analyse des immunogenen Potenzials von VAK1283	94
4.	DISKUSSION	97
4.1	<i>K. lactis</i> als Expressionssystem für das virale Glykoprotein Hämagglutinin.....	97
4.1.1	Stabile Expression von Hämagglutinin in <i>K. lactis</i>	97
4.1.2	N-terminal verkürztes H1-Protein zeigt Instabilität in <i>K. lactis</i>	101
4.2	Immunisierung gegen Influenza mit <i>K. lactis</i>-basierten <i>subunit</i>-Impfstoffen.....	103
4.2.1	Influenzavirus-spezifische Antikörper induzieren eine Schutzwirkung.....	103
4.2.2	Das Adjuvans hat einen entscheidenden Einfluss auf den Erfolg der Immunisierung.....	106
4.2.3	Schutzwirkung bei Verwendung verschiedener Impfschemata	108
4.3	Herstellung und Stabilität von <i>K. lactis</i>-basierten <i>subunit</i>-Impfstoffen	109
4.4	Otimierung von <i>K. lactis</i>-basierten Impfstoffen	113
4.4.1	Generierung multivalenter Impfstoffe	113
4.4.2	Verbessertes Wachstum durch gezielte Veränderung von $P_{LAC4-12}$	116
4.5	Evaluierung des Potenzials <i>K. lactis</i>-basierter Impfstoffe	117
5.	ZUSAMMENFASSUNG	120
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	122
7.	ANHANG	133
7.1	Bestimmung der MLD_{50} in BALB/c Mäusen.....	133
7.2	Nukleotidsequenzen.....	133
7.2.1	$H1_{PR8}$ ($mH1_{PR8}$)	133
7.2.2	$H1_{CAI}$	134
7.2.3	$M1_{PR8}$	134
7.3	Vergleich der Primärstrukturen von $H1_{PR8}$, $mH1_{PR8}$ und $H1_{CAI}$	135

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

aa	Aminosäuren	NK	Natürliche Killerzellen
ad	lat. „zu“	NLS	<i>nuclear localization signal</i>
AI(V)	aviäre(s) Influenza (Virus)	NP	Nukleoprotein
α	Alpha, anti	NS	Nichtstrukturprotein
AK	Antikörper	N-Terminus	Amino-Terminus
APC	<i>antigen presenting cells</i>	NTP	Nukleosidtriphosphat
A/PR/8/34, PR8	A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)	OD(E)	optische Dichte (Einheiten)
APS	Ammoniumperoxiddisulfat	PA	Polymerase <i>Acidic</i>
Asn	Asparagin	PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
BCR	<i>basal control region</i>	PB	Polymerase <i>Basic</i>
BSA	Bovines Serumalbumin	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
BVDV	Virus der bovinen viralen Diarrhoe	PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
Cal	A/California/04/2009 (H1N1)	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>	RBS	Rezeptorbindestelle
CPE	<i>cytopatic effect</i>	RdRp	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus	RNA	<i>ribonucleic acid</i>
CTL	<i>cytotoxic T lymphocytes</i>	RNP	Ribonukleoprotein
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	rpm	<i>rotations per minute</i>
DC	<i>dendritic cells</i>	RT	Raumtemperatur
dd	doppelt destilliert	S	Sedimentationskoeffizient
DIVA	<i>differentiating infected from vaccinated animals</i>	ss	<i>single-stranded</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>	SA	<i>sialic acid</i>
ds	<i>double-stranded</i>	SALT	<i>skin-associated lymphoid tissue</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	SP	Signalpeptid
ER	Endoplasmatisches Retikulum	TBS	<i>Tris buffered saline</i>
evtl.	eventuell	Thr	Threonin
g	Erdbeschleunigung	TPCK	N-Tosyl-L-phenylalaninchloromethylketon
ggf.	gegebenenfalls	U	<i>unit</i>
GlcNAc	N-Acetylglucosamin	u.a.	unter anderem
GOI	<i>gene of interest</i>	UAS, U	<i>upstream activating sequences</i>
GRAS	<i>generally regarded as safe</i>	UV	ultraviolett
HA, H	Hämagglutinin	Vgl.	Vergleich
IFN	Interferon	VLP	<i>virus like particle</i>
i.d.R.	in der Regel	Vol	Volumen
IBDV	<i>infectious bursal disease virus</i>	v/v	Volumen pro Volumen
inkl.	inklusive	WT	Wildtyp
kDa	Kilodalton	w/v	Masse pro Volumen
kGy	Kilogray	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
M	Matrixprotein		
m	modifiziert		
Mbp	<i>megabase pair</i>		
MCS	<i>multiple cloning site</i>		
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i>		
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>		
Mio.	Million		
MLD ₅₀	mittlere Maus-letale-Dosis		
NA, N	Neuraminidase		
nAK	neutralisierende Antikörper		
NEP	<i>nuclear export protein</i>		

1. EINLEITUNG

Viren sind ubiquitäre Parasiten, die keinen eigenen Metabolismus besitzen und für ihre Vermehrung auf Wirtszellen, d.h. intrazelluläre Prozesse wie z.B. Transkription, Translation, Replikation oder Sekretion angewiesen sind. Außerhalb der Zelle wird das Viruspartikel als Virion bezeichnet. Dieses besteht im einfachsten Fall aus einer Nukleinsäure (einzel- oder doppelsträngige RNA oder DNA) und einem die Nukleinsäure ummantelnden Proteinkapsid. Einige Viren sind zudem von einer Lipidhülle zellulären Ursprungs umgeben und werden als umhüllte Viren bezeichnet [76, 93].

1.1 Influenza

Die „echte Virusgrippe“ wird von Influenzaviren verursacht, welche in die Familie der *Orthomyxoviridae* eingeordnet werden. Influenzaviren zählen zu den weltweit wichtigsten respiratorischen Viruspathogenen, welche unterschiedlichste Wirtsspezies (inkl. den Menschen) infizieren können (**Abb. 1A**) [150]. Das Virus ist hoch kontagiös und wird durch Tröpfcheninfektion, d.h. aerogen durch virushaltige Sekrete der Atemwege sowie durch sogenannte Schmierinfektion über kontaminierte Oberflächen übertragen [136]. Nach Replikation, z.B. in den Epithelzellen im respiratorischen Trakt von Vögeln oder Säugetieren, als primäre Zielzellen, die dabei absterben können, verbreitet sich das Virus. Als Reaktion auf das Pathogen initiiert das Immunsystem des Wirtsorganismus einen Entzündungsprozess (siehe 1.1.3), wodurch es zur typischen Pathogenese (z.B.: Rhinitis, Tracheitis, Pneumonie) kommt [146]. Die Symptomatik bei Mensch und Tier ist dabei abhängig vom Virussubtyp und der Wirtsspezies und kann bei schwerem Verlauf, oft in Verbindung mit bakteriellen Sekundärinfektionen, zum Tod des Wirtsorganismus führen [136, 146]. Humane Influenzaviren führen jährlich zu wiederkehrenden Epidemien mit schätzungsweise 3-5 Mio. schweren Erkrankungen und rund 500.000 Todesfällen. Infektionen mit pandemischem Charakter treten sporadisch auf [144, 194].

Influenzaviren werden in die drei Typen: A, B und C unterteilt. Influenza-C-Viren treten beim Menschen selten auf und entsprechende Infektionen haben eine eher milde Symptomatik [136]. Typ-B-Viren zeigen eine ähnliche Pathogenese wie Influenza-A-Viren, verursachen aber aufgrund ihres limitierten Wirtsspektrums (Mensch, marine Säuger) keine Pandemien [124]. Typ-A-Viren können neben dem Menschen auch andere Säugetierarten (z.B. Schweine, Pferde) sowie Vögel infizieren und eine

Pathogenese auslösen, die teilweise mit hoher Mortalität einhergehen kann und sind daher von enormer medizinischer und ökonomischer Bedeutung [75, 186].

1.1.1 Das Influenza-A-Virus

Influenza-A-Viren werden aufgrund zweier antigenen Determinanten, den Membranproteinen Hämagglutinin (HA, H) und Neuraminidase (NA, N), in verschiedene Subtypen, nach dem Muster: Virustyp/Isolierungsort/Stammisolat/Isolierungsjahr (HxNx) eingeteilt. Derzeit werden 18 HA- und 11 NA-Proteine unterschieden. Basierend auf Sequenzunterschieden werden die HAs phylogenetisch in zwei Gruppen unterteilt [38, 128] (**Abb. 1B**). Influenza-A-Viren sind umhüllte Viren mit einzelsträngiger,

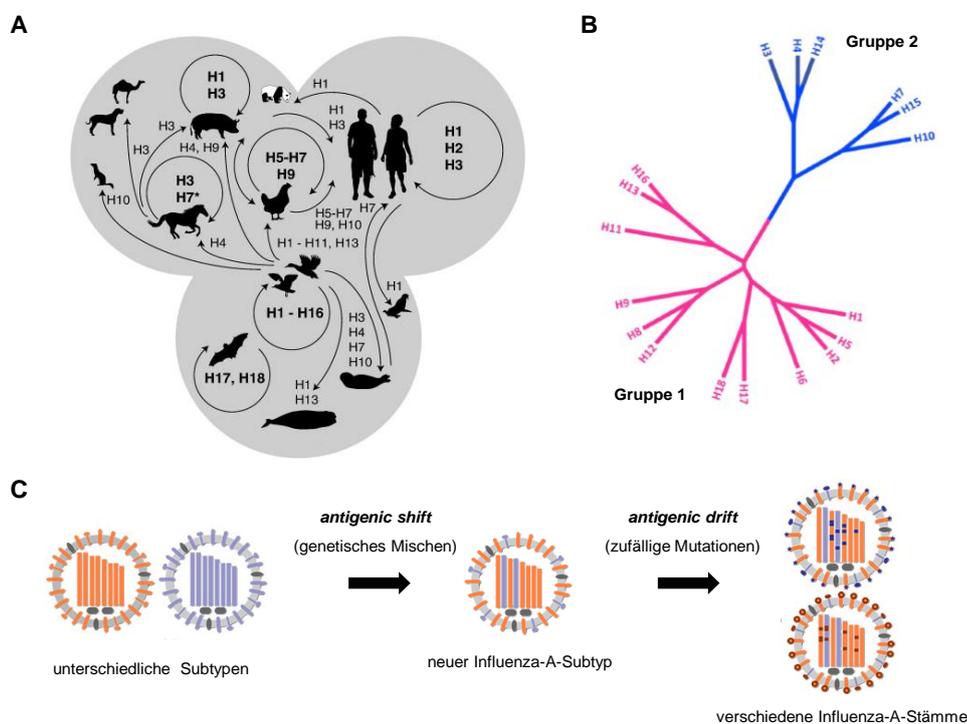


Abbildung 1: Influenza-A-Viren. Modifiziert nach [38, 150, 195]. **(A)** Reservoirs von Influenza-A-Viren. Infektionen mit artspezifischen Influenzaviren (kreisförmiger Pfeil, Subtypen fett gedruckt) und Interspezies-Übertragung (direkte Pfeile, Subtypen nicht fett gedruckt). **(B)** Phylogenetische Klassifizierung der Hämagglutinine H1 bis H18 in die Gruppen 1 (rosa) und 2 (blau). **(C)** Entstehung genetischer Vielfalt von Influenza-A-Viren. Influenzaviren können sich durch zufällige Punktmutationen im viralen Genom während der Virusreplikation, hervorgerufen durch die hohe Fehlerrate der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase, verändern (*antigenic drift*). Im Vergleich dazu kann der Austausch von RNA-Segmenten zwischen verschiedenen Influenza-A-Viren (*antigenic shift*) zum Auftreten neuer Subtypen führen.

segmentierter RNA von negativer Polarität ((-)ssRNA). Das segmentierte Genom begünstigt die Entstehung von Reassortanten, d.h. von Viren, deren genomische Segmente sich von zwei oder mehr verschiedenen Elternviren ableiten und die eine Zelle koinfizieren [152]. Dieser Vorgang der Reassortierung wird auch als *antigenic shift* bezeichnet [146] (**Abb. 1C**). Diese Kombinationsvielfalt führt dazu, dass insbesondere

reassortante Influenzaviren mit neuen genetischen und biologischen Eigenschaften zu pandemischen Infektionen (weltweite Pandemien) führen können, da keine Immunität gegen die neu kombinierten Virusnachkommen vorhanden ist [15, 146]. Orthomyxoviren replizieren mittels einer viruseigenen RNA-abhängigen RNA-Polymerase (*RNA-dependent RNA polymerase*, RdRp), die keine *proof-reading*-Aktivität aufweist. So kann es zum weniger exakten Ablesen des Elternstrangs und damit auftretenden Punktmutationen im Genom der Virusnachkommen kommen [146]. Werden diese Mutationen auch durch den Austausch von Aminosäuren phänotypisch wirksam, spricht man von einem *antigenic drift* [146, 195] (**Abb. 1C**). Mutationen an multiplen antigenischen Positionen können in einem Virusstamm resultieren, der nicht länger durch Antikörper des Wirtsorganismus, die spezifisch für das Elternvirus sind, erkannt wird (Immunevasion) und der Wirt daher suszeptibel für eine Infektion mit dem „*drift*“-Virusstamm wird [15]. Der *antigenic drift* trägt ebenfalls zur hohen Variabilität von Influenzaviren bei, in dessen Folge es wiederholt zu Epidemien kommt [195]. Ausgehend von Wasservögeln (dem ursprünglichen Reservoir) verbreiten sich Influenzaviren auf viele verschiedene Tierspezies, einschließlich den Menschen (**Abb. 1A**) [150]. Im letzten Jahrhundert entwickelten sich durch Interspezies-Übertragungen drei neue Influenza-A-Subtypen (H1, H2 und H3), die beim Menschen zu Pandemien führten. So verursachte 1918 ein H1N1-Subtyp die bisher schwerste Pandemie beim Menschen („Spanische Grippe“), 1957 wurden Viren vom Subtyp H2N2 („Asiatische Grippe“) und 1968 vom Subtyp H3N2 („Hongkong Grippe“) festgestellt. Die jüngste Pandemie wurde 2009 von einem H1N1-Subtyp hervorgerufen („Pandemische Influenza (H1N1) 2009“, pdm09). Seitdem zirkulieren Stämme vom Subtyp H3N2 und H1N1 beim Menschen [26, 146].

1.1.2 Morphologie des Virions und Virusreplikation

Influenzavirionen sind pleomorphe (ellipsoide oder filamentöse) Partikel mit einem Durchmesser von 80-120 nm (**Abb. 2B**) [54, 120]. Umhüllt wird das Virion von einer Lipiddoppelschicht zellulären Ursprungs. In diese sind die Glykoproteine Hämagglutinin, Neuraminidase etwa im Verhältnis 4:1 und zu einem kleinen Anteil das Matrixprotein 2 (M2) im M2:HA-Verhältnis von 1:10¹-10² eingelagert (**Abb. 2A**) [15, 46]. Die Oberflächenproteine HA und NA ragen als „Spikes“ über die Virusmembran hinaus [185]. M2 bildet eine kanalförmige Struktur, tritt zu einem geringen Teil aus der Virusmembran hervor und erfüllt die Funktion eines Ionenkanals [129]. Die acht RNA-Segmente des Influenza-A-Virions liegen einzeln, jedes komplexiert mit Nukleoprotein (NP)-Molekülen in helikaler Struktur innerhalb des Virions vor (**Abb. 2A**). Jedes RNA-Segment besitzt hoch konservierte, komplementäre Sequenzbereiche am 5'- und 3'-Ende, die eine

sogenannte RNA *panhandle*-Struktur bilden [86]. Es wird angenommen, dass der virale Promoter von den 5'- und 3'-terminalen Sequenzen der viralen RNA (vRNA)-Segmente geformt wird [167]. Der viruseigene Polymerasekomplex formt sich aus den drei Proteinen: Polymerase *Basic Protein* 1 (PB1), Polymerase *Basic Protein* 2 (PB2) und Polymerase *Acidic Protein* (PA). Als Ribonukleoprotein (RNP) wird die Assoziation aus je

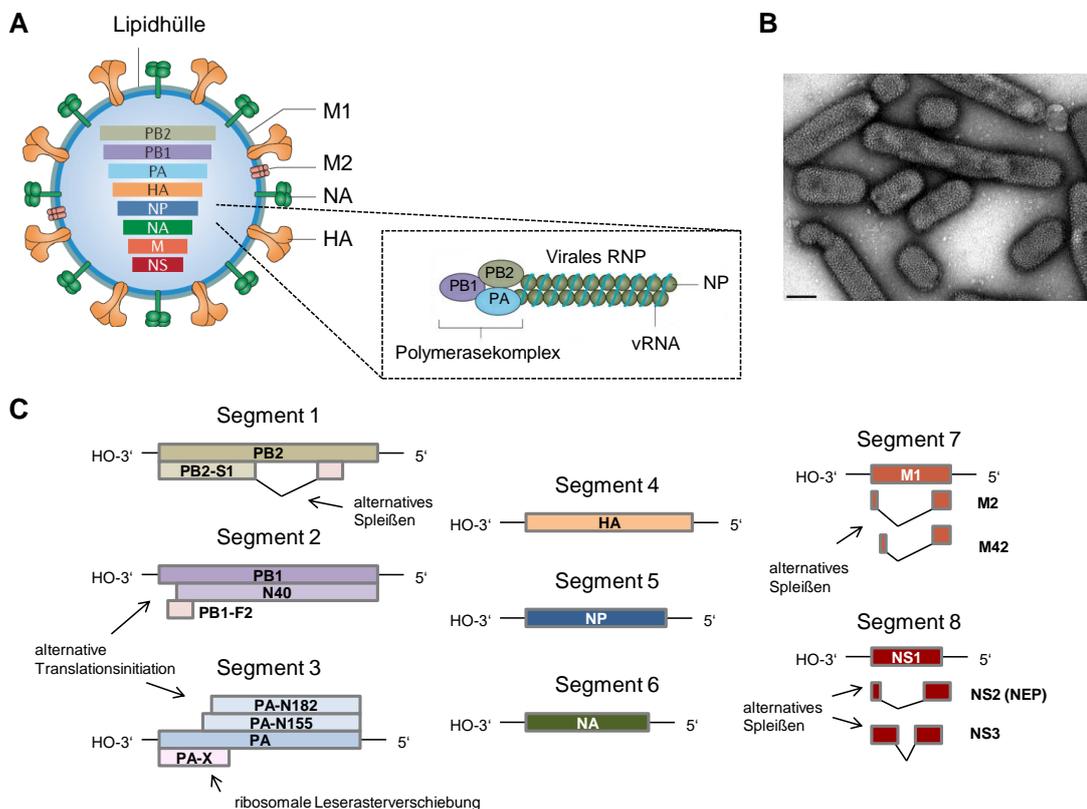


Abbildung 2: Morphologie des Influenza-A-Virus und Darstellung der viralen RNA-Segmente. (A) Schematische Darstellung der Virusstruktur und des Ribonukleoproteins (RNP). Verändert nach [148]. Das Virion wird von einer Lipidhülle umgeben, in welche die Glykoproteine Hämagglutinin (HA), Neuraminidase (NA) und das Matrixprotein 2 (M2) eingelagert sind. Das Matrixprotein 1 (M1) bildet eine Matrix an der Innenseite der Virusmembran. Das virale Genom besteht aus acht (-)ssRNA-Segmenten. Das RNP besteht aus je einem RNA-Segment, Nukleoproteinen (NP) und einem RNA-Polymerasekomplex (Polymerase *Basic Protein* 1 (PB1), Polymerase *Basic Protein* 2 (PB2), Polymerase *Acidic Protein* (PA)). (B) Transmissions-Elektronenmikroskopie eines Influenza-A(H1N1)-Virus. Negativkontrastierung. Maßstab = 100 nm; Quelle: Norbert Bannert, Lars Möller / RKI. (C) Schematische Darstellung des viralen Genoms. Verändert nach [6, 147]. Die RNA-Segmente kodieren für ein bis drei virale Proteine, welche durch alternatives Spleißen, alternative Translationsinitiation oder ribosomale Leserasterverschiebung gebildet werden (siehe Text). NS: Nichtstrukturproteine; NEP: *nuclear export protein*.

einem RNA-Segment, Nukleoproteinen und einem Polymerase-Komplex bezeichnet (**Abb. 2A**) [146]. Das Matrixprotein 1 (M1) kleidet die Innenseite der Virushülle aus und unterstützt die Gestalt und die strukturelle Integrität des Viruspartikels. Es interagiert mit den zytoplasmatischen Domänen der Oberflächenproteine und verbindet zudem das RNP mit der Lipidhülle [15, 165].

Influenzavirionen erkennen und binden über das virale HA-Protein Sialinsäuren (*sialic acid*, SA), die sich an den Termini vieler Glykokonjugate auf der Wirtszelloberfläche befinden und als Rezeptoren fungieren. Influenzavirus-abhängig zeigt das HA dabei präferentielle Bindenspezifität für α 2,3- oder α 2,6-glykosidisch verknüpfte SA [15]. Die Verteilung entsprechend verknüpfter SA-Rezeptoren variiert im Gewebe zwischen den Wirtsspezies. In Vögeln finden sich z.B. α 2,3- und α 2,6-SA sowohl im respiratorischen, als auch im intestinalen Trakt [15]. Im Vergleich dazu ist der obere respiratorische Trakt im Menschen reich an α 2,6-SA, wohingegen das bronchiale Epithel einen höheren Anteil an α 2,3-SA aufweist [52]. In der Konsequenz können Menschen mit aviären Influenzaviren (AIV) infiziert werden, wenn auch zumeist nur mit geringer Effizienz [15, 193]. Die unterschiedlichen Bindungseigenschaften des viralen HAs sind daher wichtige Determinanten der Wirtsbreite sowie des Zell- und Gewebetropismus von Influenzaviren [52, 103]. Nach Erkennung und Bindung der Sialinsäurereste (*attachment*) wird das Virus durch zellvermittelte Endozytose in die Wirtszelle aufgenommen (*viral entry*) (**Abb. 3**, Seite 10). Durch das M2-Protein werden Wasserstoffionen aus dem Endosom in das innere des Viruspartikels gepumpt. Das dadurch entstandene saure Milieu führt zu einer Konformationsänderung des M1-Proteins, was zur Dissoziation des Proteins von der Virusmembran und dem RNP führt [41, 58]. Das saure Milieu im Endosom führt zu einer Konformationsänderung im HA-Protein, wodurch ein Fusionspeptid exponiert und die Fusion zwischen viraler und endosomaler Membran vermittelt wird [151]. Durch die entstandene Pore wird das RNP aus der viralen Matrix in das Zytoplasma der Wirtszelle freigesetzt (*uncoating*). Die zwei putativen Kernlokalisierungssignale (NLS, *nuclear localization signal*) des viralen NPs werden durch zelluläre Importine erkannt und das RNP in den Zellkern importiert [28, 197]. Im Zellkern der Wirtszelle nutzt die virale RdRp die virale (-)RNA als Templat, um zwei (+)RNA-Spezies zu synthetisieren, die *messenger* RNA (mRNA) und die *complementary* RNA (cRNA).

Um die viralen Gene zu transkribieren, spaltet die RdRp die 7-Methylguanosin-*cap*-Struktur am 5'-Ende von zellulären prä-mRNAs ab, welche zur Initiation der viralen mRNA-Synthese verwendet werden. Dieser Prozess wird als *cap snatching* bezeichnet [15]. Die monozistronischen RNA-Segmente kodieren i.d.R. für ein Protein (HA, NP, NA) (**Abb. 2C**). Durch alternatives Spleißen der mRNA, die aus den vRNA-Segmenten M, PB2 und NS hervorgeht, werden z.T. zwei bis drei Proteine pro Segment synthetisiert (M1, M2 und M42; PB2 und PB2-S1 sowie die Nicht-Strukturproteine NS1, NS2 (NEP, *nuclear export protein*) und NS3) [34, 146, 198]. Das M42-Protein kann die

Ionenkanalfunktion von M2 funktional ersetzen [34]. PB2-S1 und NS1 sind an der Inhibierung der antiviralen Immunantwort im Wirt beteiligt [53, 198]. NEP vermittelt den Transport des vRNPs aus dem Wirtszellkern (siehe unten) und NS3 hat wahrscheinlich eine Funktion bei der Adaption des Influenzavirus an andere Wirtsorganismen [15, 147]. Neben dem Spleißen der mRNA trägt die RNA-Editierung, eine weitere Form der posttranskriptionalen Modifikation, zur Diversität des Transkriptoms bei. Hierbei werden im Falle von Influenza-A-Viren z.B. die drei Proteine PB1, PB1-F2 und N40, ausgehend von derselben mRNA durch Verwendung alternativer Startcodone gebildet [34, 166]. Bei diesem sogenannten *leaky scanning* wird das initiale AUG-Startcodon von der 40S-Untereinheit des Ribosoms ausgelassen und ein nachfolgendes Startcodon für die Translationsinitiation verwendet [166]. PB1-F2 trägt zur Virulenz des Influenzavirus bei, indem es die Apoptose infizierter Zellen induziert [166]. Für N40 wurde bisher noch keine Funktion beschrieben [166]. Die Proteine PA, PA-X sowie PA-N155 und PA-N182 werden von derselben mRNA durch Verwendung alternativer Startcodone (PA-N155 und PA-N182, siehe oben) oder durch ribosomale Leserasterverschiebung (PA-X) gebildet [34, 118]. Letzteres führt durch „Verrutschen“ des Ribosoms in 5'- oder 3'-Richtung während der Translation zur Verschiebung des Leserasters, wodurch eine zum ursprünglichen PA-Protein abweichende C-terminale Region (X) entsteht [56]. PA-X ist an der viralen Replikation und der Suppression der antiviralen Immunantwort im Wirt beteiligt [56] und PA-N155 sowie PA-N182 übernehmen wahrscheinlich wichtige Funktionen im Replikationszyklus des Virus [178].

Die Polyadenylierung der mRNA erfolgt durch Transkription der 5-7 Uracilreste, die nahe des 5'-Endes des vRNA-Templats lokalisiert sind, durch die virale RdRp, was zu einem wiederholten Einfügen von Adenosinmonophosphat (AMP) und der Generierung eines 3'-Poly(A)-Endes führt [167]. Die Translation der mRNA erfolgt im Zytoplasma an Ribosomen. Integrale, virale Membranproteine (HA, NA, M2) werden kotranslational in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transloziert. Im ER werden die Proteine gefaltet und für weitere posttranskriptionale Modifikationen in den Golgi-Apparat überführt. Über diesen sogenannten sekretorischen Weg gelangen die Proteine in die apikale Membran der Wirtszelle [15]. Die neu synthetisierten Proteine PA, PB1, PB2, NP, M1 und NS1 werden nach der Proteinsynthese im Zytoplasma durch die in der Proteinsequenz enthaltenen NLS in den Zellkern zurückgeführt oder gelangen durch passive Diffusion, wie das NEP in den Zellkern zurück [89].

In einem späteren Stadium, in dem die Konzentration neu synthetisierter viraler Proteine, insbesondere des NPs, hoch ist, dient die vRNA als Matritze der RdRp für die Synthese von cRNA, welche wiederum für die Synthese weiterer Kopien der vRNA verwendet wird [15]. Die Replikation der vRNA wird durch Anhängen eines Nukleosidtriphosphats (NTPs) am 3'-Ende des ersten initierenden NTPs (terminale Initiation) oder eines intern gelegenen NTPs (interne Initiation) eingeleitet [167]. Erstere Initiationsform erfolgt bei der Synthese der cRNA und letztere bei der Synthese der vRNA. Aus den neu gebildeten vRNA-Segmenten und viralen Proteinen (NP, PB1, PB2, PA) formen sich RNP-Komplexe [146]. Der C-Terminus des ebenfalls neu synthetisierten M1-Proteins assoziiert mit dem RNP sowie dem NEP, welches den Export der M1-RNP-Komplexe über das zelluläre Exportin Crm1 (*chromosome region maintenance 1*) durch die Kernpore in das Zytoplasma vermittelt [15, 135]. Die M1-RNP-Komplexe werden zur Zellmembran transportiert, wo der N-Terminus von M1 mit den zytoplasmatischen Bestandteilen der Glykoproteine interagiert und sich neue Virionen formen, die von der Zellmembran knospen (*budding*) [59, 146]. Nach der Virusreplikation werden durch die Enzymaktivität der NA Sialinsäuren von Glykoproteinen auf der Zelloberfläche infizierter Zellen abgespalten, sodass die Virusnachkommen in den extrazellulären Raum freigesetzt werden (*release*) und eine erneute Bindung an die geschädigte Wirtszelle verhindert wird [47].

1.1.3 Immunantworten auf Influenza-A-Virusinfektionen

Infektionen mit Inflenzaviren führen i.d.R. zur Initiierung einer angeborenen und adaptiven (erworbenen) Immunantwort im Wirtsorganismus, die sich gezielt gegen das Pathogen richtet um dieses zu beseitigen [79]. Beide Immunantworten bestehen jeweils aus zellulären und löslichen (humoralen) Komponenten, die sich gegenseitig regulieren und sich in grundlegenden Aspekten unterscheiden (siehe unten) [146]. Zur angeborenen Immunität gehören zudem mechanische Barrieren, wie z.B. die Schleimhaut (Mukosa), welche durch Sekretion des adhäsiven, Mucin-haltigen *mucus*, Viruspartikel immobilisieren und eine Infektion der Wirtszellen inhibieren kann [79]. Kommt es dennoch zu einer erfolgreichen Infektion der Epithelzellen durch das Virus im respiratorischen Trakt, ist die angeborene Immunität sofort wirksam. Der Reaktionsablauf ist dabei bei jedem nachfolgenden Kontakt mit dem Antigen gleich. Im Unterschied zur angeborenen, wirkt die adaptive Immunität durch Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses (*memory*) in Form von B- und T-Zellen, bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Antigen, schneller und effizienter (*booster-Effekt*) im Vergleich zum Erstkontakt (*prime*) [62, 146]. Daher führen klassische *prime-boost-*

Immunreaktionen, die man in Form eines Impfschemas auch künstlich in Form einer Immunisierung einsetzen kann (siehe Resultate), i.d.R. zu einem ausreichenden Immunschutz. Phagozyten („Fresszellen“), die Partikel aufnehmen und prozessieren können, werden im Rahmen der adaptiven Immunität aktiviert und erkennen über Mustererkennungsrezeptoren (PRR, *pattern recognition receptors*) charakteristische Strukturmerkmale des Pathogens (PAMP, *pathogen-associated molecular pattern*) [146]. Infektionen mit Influenza-A-Viren werden z.B. durch *toll-like*-Rezeptoren (TLR), die verschiedene RNA-Spezies wie ssRNA (TLR7) oder dsRNA (TLR3) binden, intrazellulär erkannt. TLR2 und TLR4 befinden sich auf der Zelloberfläche und erkennen virale Glykoproteine, wie das HA oder NA, extrazellulär [175]. Zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion werden neu produzierte, *uncapped* 5'-Triphosphat-Enden der viralen mRNA von *retinoic acid inducible gene-1* (RIG-I)-Rezeptoren, die ubiquitär und nicht nur in Zellen des Immunsystems vorkommen, intrazellulär erkannt [175]. In der Folge der PAMP-Erkennung durch PRR werden antivirale Signalkaskaden initiiert, die in der Produktion von Zytokinen, wie Interferonen (IFN- α und - β), resultieren. Diese Interferone wirken auf IFN- α/β -Rezeptoren derselben oder von benachbarten Zellen und aktivieren Signalkaskaden, welche zur Transkription verschiedener Gene führen, die z.B. für antivirale Proteine kodieren. Antiviral wirksame Proteine können die Replikation des Virus limitieren, indem sie die Struktur des vRNPs stören (z.B. *Myxovirus resistance gene A*, MxA) oder die zelluläre mRNA-Translation inhibieren, wodurch die virale Proteinbiosynthese verhindert wird (z.B. Proteinkinase R, PKR) [97, 175]. Virusinfizierte Zellen können durch alveoläre Makrophagen in der Lunge phagozytiert werden, was zur Reduktion der Virusausbreitung beiträgt [74]. Aktivierte alveoläre Makrophagen produzieren in der Lunge hohe Konzentrationen an inflammatorischen Zytokinen, wie dem Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α). Dessen entzündungsfördernde Eigenschaften tragen in Kombination mit den direkten Effekten der viralen Replikation auf das infizierte Gewebe zur Virus-induzierten Pathologie bei [74, 91]. Natürliche Killerzellen (NK) übernehmen in den ersten Infektionstagen, noch bevor CD8⁺-zytotoxische T-Lymphozyten (*cytotoxic T lymphocytes*, CTL) effektiv zur Verfügung stehen, die Lyse infizierter Zellen. Die Erkennung erfolgt dabei über den CD16-Rezeptor der NK-Zellen, welcher an das Fc-Fragment (*fragment crystallizable*) von Antikörpern (AK) bindet, die an virale Antigene auf mit Influenza-A-Virus infizierten Zellen gebunden sind. Dieser Prozess wird als *antibody dependent cellular cytotoxicity* (ADCC) bezeichnet [175]. Dendritische Zellen (*dendritic cells*, DC), die sich unterhalb der Epithelbarriere des respiratorischen Trakts und oberhalb der Basalmembran befinden, können Virionen über

ihre Dendriten und sich auf der Zelloberfläche befindende PRR auch im Lumen der Atemwege erkennen. DC sind die leistungsfähigsten Antigen-präsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APC) und können Antigene über zwei unterschiedliche Mechanismen prozessieren. Zum einen können DC direkt von Influenza-A-Viren infiziert werden [175]. Über Proteasomen im Zytosol der DC werden die viralen Proteine degradiert und die entstandenen Peptide ins ER transportiert. Dort werden sogenannte Haupthistokompatibilitätskomplexe-I (MHC, *major histocompatibility complex*) mit den Peptiden beladen. Die MHC-I-Peptid-Komplexe werden danach über den Golgi-Apparat zur Zellmembran transportiert und von den DC präsentiert, wo sie über den T-Zellrezeptor von CTL erkannt werden können, was wiederum zur Proliferation, Reifung und Aktivierung der Antigen-sepezifischen CTL führt [2, 175]. Zum anderen können Viruspartikel oder virusinfizierte Zellen von DC phagozytiert werden. Die Antigene werden anschließend im Endosom / Lysosom zu Peptiden degradiert, von MHC-II-Molekülen gebunden und die MHC-II-Peptid-Komplexe auf der Zelloberfläche präsentiert. Die Komplexe werden von $CD4^+$ -T-Lymphozyten erkannt, die wiederum B-Zellen aktivieren. Über diesen Antigen-Prozessierungsweg können DC ebenfalls Epitope über MHC-I-Peptid-Komplexe an CTL präsentieren. Dieser Prozess wird als Kreuzpräsentation bezeichnet [2, 175]. Als Indikator für die Ausbildung $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen wird vorwiegend das von beiden Zelltypen sekretierte Zytokin $IFN-\gamma$ verwendet. Dabei handelt es sich um einen immunregulatorischen Faktor, der z.B. Makrophagen aktiviert und die Präsentation von Antigen-Peptiden über MHC-Komplexe steigert [62, 175]. CTL tragen durch die zellvermittelte Zytotoxizität zur Tilgung der Influenza-A-Viren bei, indem sie in infizierten Zellen die Apoptose einleiten [2]. $CD4^+$ -T-Zellen stimulieren über die Sekretion von Zytokinen wie IL-2 oder $IFN-\gamma$ die Aktivierung und Proliferation von CTL sowie die Ausbildung einer robusten CTL *memory*-Antwort [2]. B-Zellen, die selbst auch als APC agieren können, werden in enger Interaktion mit den spezifisch aktivierten $CD4^+$ -T-Zellen durch Erkennung des Antigens über den B-Zellrezeptor aktiviert. Nach Vermehrung (klonale Expansion) differenzieren entsprechend aktivierte B-Zellen zu AK-produzierenden B-Zellen (Plasmazellen) [115]. Die gebildeten AK verhindern oder reduzieren Infektionen durch das Pathogen. Des Weiteren fördern AK zusammen mit Faktoren des Komplementsystems, einem komplexen Verteidigungssystem der angeborenen Immunantwort aus Plasma und membran-assoziierten Serumproteinen [35], die Opsonophagozytose extrazellulärer Pathogene durch Makrophagen [132]. So spielen AK auch eine wesentliche Rolle beim Schutz gegen das Influenzavirus. I) AK die gegen das immundominante HA gerichtet

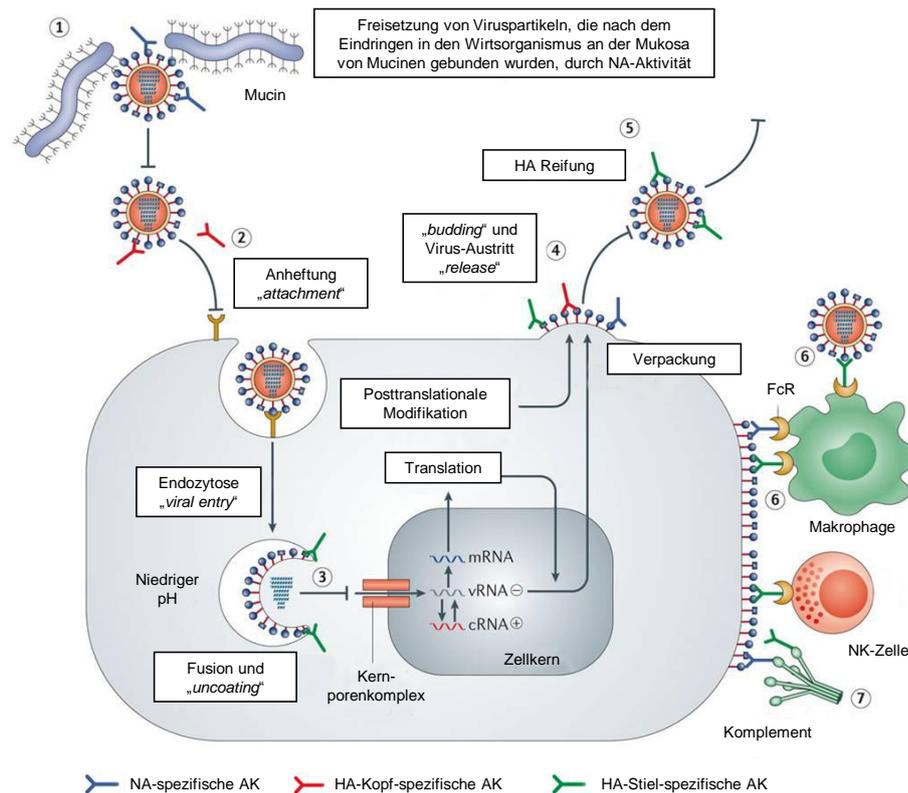


Abbildung 3: Replikation von Influenza-A-Viren und Mechanismus der Wirkung HA- und NA-spezifischer Antikörper. Verändert nach [78]. Nach Eindringen des Virus in den Wirtsorganismus kann dieses von Proteinen der Mukosa (Mucine) gebunden werden (1). Durch enzymatische Aktivität des Oberflächenproteins Neuraminidase (NA) wird das Virus aus der Schleimschicht gelöst. Diese Aktivität der NA kann durch Bindung von NA-spezifischen Antikörpern (AK) an das Protein inhibiert werden. AK, die an die globuläre Kopfdomäne des Hämagglutinins (HAs) binden, können die Rezeptorbindung des HAs sterisch verhindern (2). AK, welche an die Stielregion des HAs binden, blockieren die Ausbildung des Fusionspeptids, wodurch die Fusion der viralen mit der endosomalen Membran blockiert wird (3). Kopf-, Stiel- und NA-reaktive AK verhindern das Abknospen (*budding*) und Austreten neuer Viruspartikel aus der Wirtszelle (4). Stiel-bindende AK behindern sterisch die Reifung des HAs (5). Sowohl Stiel- als auch NA-reaktive AK können durch AK-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (6) oder die Komplement-anhängige Zytotoxizität wirken (7), die zur Apoptose bzw. Lyse der Zelle führen. cRNA: *complementary RNA*; FcR: *fragment crystallizable*-Rezeptor; NK: Natürliche Killerzellen; vRNA: virale RNA.

sind, binden vorwiegend an die gut exponierte sogenannte globuläre Kopfdomäne des Proteins und verhindern dadurch die Bindung des Glykoproteins an den Wirtszellrezeptor [196]. Das Virus kann nicht in die Wirtszelle eindringen und eine Infektion wird verhindert. II) AK, die gegen die sogenannte Stieldomäne des HAs gerichtet sind, können die Anheftung und die Replikation des Virus inhibieren [160]. III) AK, die gegen die anderen beiden Glykoproteine NA und M2 gerichtet sind, können zur Reduktion der Virusproduktion beitragen, indem sie die Freisetzung neugeformter Viruspartikel verhindern oder die Virusreplikation reduzieren [78, 79] (zusammengefasst in **Abb. 3**). In der Summe werden derart agierende AK als neutralisierende Antikörper (nAK) bezeichnet, da sie in der Lage sind, einen Organismus vor einer viralen Infektion zu schützen [7, 77, 79]. Einige AK können Kreuzreaktionen zeigen [62]. Dabei binden AK,

die nach Infektion mit einem Influenzavirus gebildet wurden, an konservierte Regionen des Antigens, eines gleichen Subtyps (homolog) oder eines anderen Subtyps (heterolog) des Influenzavirus. Entsprechende AK werden als kreuzreaktive bzw. kreuzprotektive AK bezeichnet.

1.1.4 Das immunodominante Glykoprotein Hämagglutinin des Influenzavirus

Das HA ist ein trimerer Proteinkomplex, bestehend aus drei identischen Monomeren (**Abb. 4A**). Das Protein wird als Polypeptidkette (HA0-Vorläuferprotein) synthetisiert und durch zelluläre, trypsinähnliche Proteasen in die Untereinheiten HA1 (aa 18-343) und HA2 (aa 345-566) gespalten, welche über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden bleiben. Dieser proteolytische Reifungsprozess des HA-Proteins ist essentiell für die Aktivierung des Membran-Fusions-Potenzials und daher für die Infektiosität des Virus [47]. Das Fusionspeptid wird gebildet von den aa 343-352. Die Suszeptibilität des HA0-Moleküls für spezifische zelluläre Proteasen determiniert den Gewebetropismus und die Virulenz des Virus [179]. Monobasische Spaltstellen, die eine basische Aminosäure (Arginin, selten Lysin) an der Spaltstelle im HA0-Protein enthalten, werden während des *budding*-Prozesses oder der Infektion der Wirtszelle durch sekretierte bzw. membran-gebundene wirtseigene Proteasen (z.B. Plasmin oder Trypsin) erkannt und gespalten [156]. Solche Proteasen finden sich hauptsächlich im respiratorischen und gastrointestinalen Trakt. Multibasische Spaltstellen, die mehrere basische Aminosäuren aufweisen, wie sie in einigen hochpathogenen aviären H5- und H7-Influenzasubtypen zu finden sind, können durch Proteasen, wie Furin, bereits intrazellulär im Golgi-Vesikel erkannt und gespalten werden. Aufgrund des Vorkommens dieser Proteasen in einer Vielzahl von verschiedenen Wirtszellen kann die Infektion bei hochpathogenen aviären Influenzaviren zu einer systemischen Ausbreitung des Virus führen [47, 156]. Jedes HA-Monomer besteht aus einer Ektodomäne, die sich aus einer nach außen exponierten globulären Kopfdomäne (*head*), die von einem Großteil der HA1-Domäne gebildet wird, und einer Stieldomäne (*stalk*), die Teile der HA1- und der HA2-Domäne umfasst, zusammensetzt [156]. An der distalen Spitze der globulären Kopfdomäne befindet sich die Rezeptorbindestelle (RBS), welche für die Bindung des HA-Proteins an Sialinsäurerezeptoren der Wirtszelle relevant ist. Diese ist umgeben von den meist konformationsabhängigen antigenen Bereichen Sa, Sb, Ca1, Ca2 und Cb, welche vom Immunsystem des Wirts durch AK erkannt werden [156]. Mutationen in diesen Regionen führen oft dazu, dass Virus-neutralisierende AK nicht mehr binden können. Nahe des C-Terminus des HA-Proteins befindet sich eine Transmembrandomäne (TM, aa 530-550), über welche das Protein in der Membran verankert wird, und eine

zytoplasmatische Region (ZP, aa 551-566). Die im Text angegebenen Aminosäuren basieren auf der H1-Nummerierung von Influenza A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) (A/PR/8/34). Eine schematische Darstellung des H1-Proteins ist in **Abb. 4C** aufgeführt. Die Proteinsynthese des HA0-Vorläuferproteins beginnt im Zytoplasma der Wirtszelle an freien Ribosomen. Nach Synthese der N-terminalen Signalsequenz (aa 1-17, A/PR/8/34) wird diese spezifisch durch ein sogenanntes Signalerkennungspartikel erkannt, welches

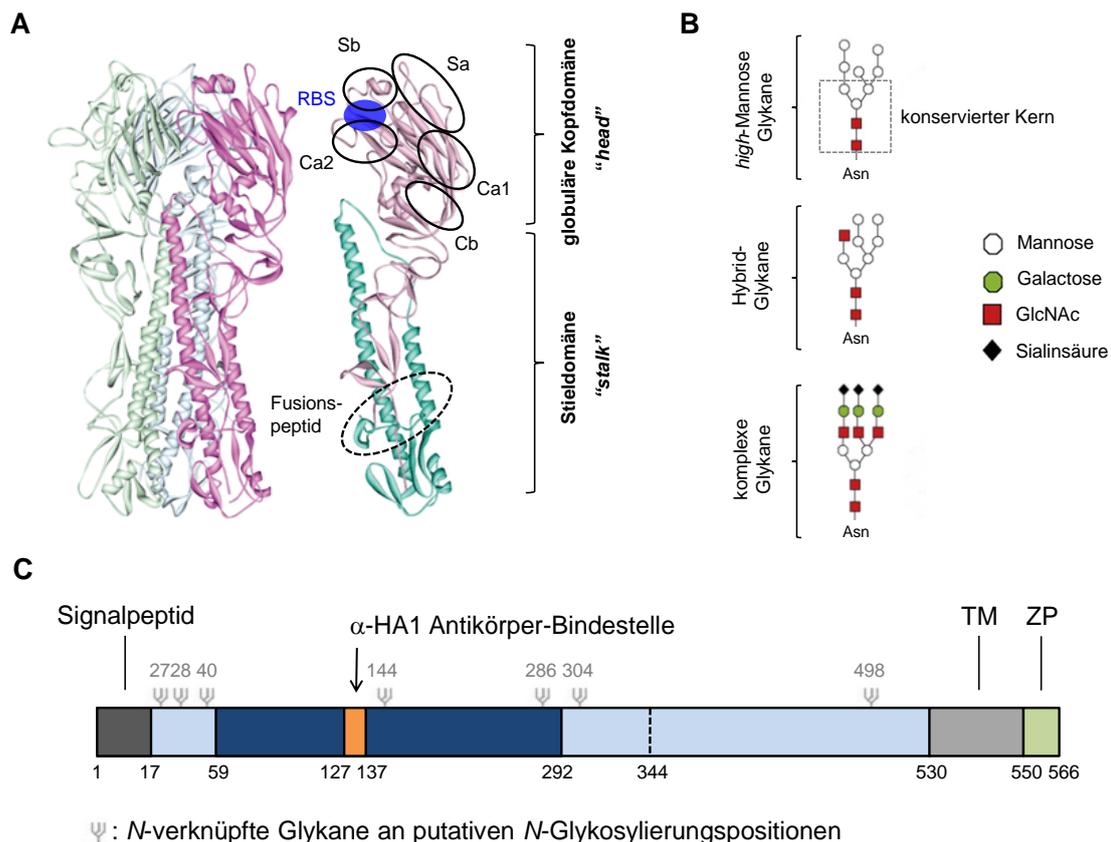


Abbildung 4: Das Hämagglutinin des Influenzavirus. (A) Bändermodell eines H1-Monomers (rechts) und -Trimers (links). Die globuläre Kopfdomäne wird von der HA1-Domäne gebildet und beinhaltet die Rezeptorbindestelle (RBS). Diese wird umgeben von fünf antigenischen Regionen Sa, Sb, Ca1, Ca2 und Cb. Die Stieldomäne wird von Teilen der HA1- und der HA2-Domäne gebildet und enthält das Fusionspeptid. Verändert nach [15, 48]. (B) N-Glykan-Typen. Die Prozessierung der N-verknüpften Oligosaccharide findet im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Golgi-Apparat statt. Nach Trimmung der Glucose im ER, sind die *high*-Mannose Glykane zugänglich für die weitere Prozessierung und Trimmung durch Glykosidasen und Mannosidasen, um die Strukturen: *high*-Mannose, Hybrid- oder komplexe Glykane zu generieren. Das konservierte Kern-Pentasaccharid (gestrichelter Rahmen) kommt in allen N-verknüpften Oligosacchariden vor. Verändert nach [179]. (C) Schematische Darstellung des H1-Proteins, bestehend aus dem Signalpeptid (dunkelgrau), der Kopf- (dunkelblau) und Stielregion (hellblau) der Ektodomäne, der Transmembrandomäne (TM, hellgrau) und einer zytoplasmatischen Region (ZP, grün). N-Glykane sind in grau eingezeichnet. Aminosäure-Nummerierung basierend auf dem H1 von A/PR/8/34 (NCBI: NP_040980.1). Verändert nach [36]. GlcNAc: N-Acetylglucosamin; Asn: Asparagin.

das Ribosom zur Membran des ERs leitet. Das naszierende Polypeptid wird kotranslational in das ER transloziert und das Signalpeptid durch Signalpeptidasen abgespalten [15, 69]. Die Faltung und Oligomerisierung des HA0-Vorläuferproteins

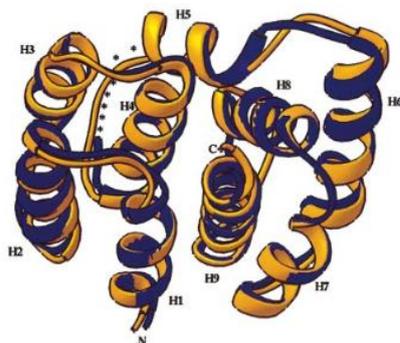
erfolgt bereits kotranslational [98] und wird durch die Bildung von Disulfidbrücken und die Glykosylierung beeinflusst. Bei der in der Wirtszelle stattfindenden *N*-Glykosylierung werden Kohlenhydrate in Form von Mono- bis Polysacchariden (Glykane) an Proteine gebunden. Initiiert wird die *N*-Glykosylierung im ER. Dabei wird ein Oligosaccharid, bestehend aus 3 Glucose-, 9 Mannose- und 2 GlcNAc (*N*-Acetylglucosamin)-Resten an das Amidstickstoffatom eines Asparaginrestes des entstehenden Polypeptids, mit dem Erkennungsmotiv Asn-X-Ser/Thr (X ist jede andere aa außer Prolin), kovalent gebunden [180, 189]. Die *N*-glykosidische Bindung entsteht dabei zwischen dem Asparagin und einem GlcNAc [189]. Einige Monosaccharide werden während der Reifung des Proteins, die im ER beginnt und im Golgi-Apparat fortgesetzt wird, durch Glykosidasen und Mannosidasen abgespalten (trimmen). Zusätzliche Monosaccharide wie GlcNAc, Fucose, Galactose und Sialinsäuren werden durch Glykosyltransferasen im Golgi-Apparat angefügt [180]. Abhängig von der Prozessierung der Glykoproteine resultieren unterschiedliche Oligosaccharide: *high*-Mannose (Mannose-reiche), komplexe (verzweigte Strukturen aus verschiedenen Monosacchariden) oder Hybrid-Glykane (Oligosaccharide mit Eigenschaften beider zuvor genannter Varianten) (**Abb. 4B**) [164, 180]. Während die Glykoproteine in Säugerzellen vorwiegend komplexe Glykane aufweisen, dominieren in Hefen hauptsächlich Glykane vom *high*-Mannos-Typ, die durch Hinzufügen einer großen Anzahl von bis zu 200 Mannoseresten zu einer Hypermannosylierung des Proteins führen können [189, 201]. Das virale HA-Protein wird im ER und im Golgi-Apparat in einem ähnlichen Prozess, wie die zelleigenen Glykoproteine der Wirtszelle *N*-glykosyliert. Die Beschaffenheit der Glykane an den verschiedenen *N*-Glykosylierungspositionen im HA-Protein wird dabei durch die jeweilige Wirtszelle sowie durch das Ausmaß der intrazellulären Prozessierung determiniert. Das HA kann eine Mischung aus allen drei oben genannten Glykan-Typen aufweisen. Aufgrund der enzymatischen Aktivität der viralen NA fehlt komplexen Glykanen, die an das virale HA gebunden sind, die Sialinsäure [164]. Die molekulare Masse eines HA-Monomers beträgt etwa 60 kDa (nicht glykosyliert), welche abhängig von der Anzahl und Komplexität der Glykosylierung zunimmt [156]. Obwohl Modifikationen der *N*-Glykosylierungspositionen die Struktur und Stabilität des HA-Proteins sowie dessen Spaltbarkeit beeinflussen können, variiert die Anzahl und Lokalisation in der globulären Kopfdomäne zwischen den HA-Proteinen verschiedener Influenzaviren z.T. stark [183]. Eine zusätzliche *N*-Glykosylierungsposition oder deren Verlust kann sowohl die Rezeptorbindung durch Modulierung der Bindeaffinität und der Rezeptorspezifität des HA-Proteins, als auch die Erkennung durch Antikörper beeinflussen [179, 189]. Das HA-Protein ist die immunodominante Determinante bezüglich der Ausbildung einer

schützenden humoralen Immunantwort des Wirts gegen das Influenzavirus [67]. Entsprechende nAK, die durch Immunisierung oder natürliche Infektion mit dem Influenzavirus gebildet werden, sind vorwiegend gegen die fünf antigenen Regionen nahe der RBS in der globulären Kopfdomäne des HA-Proteins gerichtet (siehe oben) [23, 196]. Im Unterschied zur variablen Kopfdomäne zeigen AK, die gegen die Stiel-domäne gerichtet sind und die unter natürlichen Bedingungen nur in geringen Konzentrationen generiert werden, entsprechend häufiger eine Kreuzaktivität gegen HA-Proteine verschiedener Virusstämme oder Virus-Subtypen (Breitband-Wirkung) [36, 160]. Aufgrund der hohen Variabilität des HAs, insbesondere aber der globulären Kopfregion, bieten aktuelle Impfstoffe nur einen limitierten Schutz gegen vom Impfstamm abweichende Virusstämme oder andere HA-Subtypen.

1.1.5 Das konservierte Matrixprotein 1 des Influenzavirus

Das M1-Protein wird nicht glykosyliert und hat eine molekulare Masse von etwa 28 kDa (Monomer). Das Protein besteht aus einer Membranbindedomäne (aa 1-164) und einer

A



B

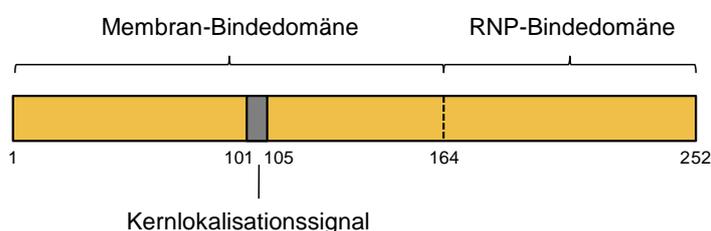


Abbildung 5: Das Influenzavirus Matrixprotein 1 (M1). (A) Kristallstruktur der N-terminalen Domäne (aa 1-162) des M1-Monomers bei neutralem pH (blau) und bei saurem pH-Wert (gelb). Helices (H1-H9) sowie N- und C-Termini sind bezeichnet. Die *loop*-Regionen des natürlich vorkommenden Monomers (neutraler pH-Wert) unterscheiden sich von denen unter sauren Bedingungen. Es fehlen die aa 70-76 nach H4 (dargestellt durch Asteriske) und die repositionierten *loops* nach H5 und zwischen H8 und H9 sowie der C-Terminus [55]. (B) Schematische Darstellung des M1 von Influenza A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), bestehend aus der Membran-Bindedomäne und der Ribonukleoprotein (RNP)-Bindedomäne. Das Kernlokalisations-signal ist grau hervorgehoben. Nummerierung der Aminosäuren basierend auf dem M1 von A/PR/8/34 (NCBI: NP_040978.1).

RNA-Bindedomäne (aa 165-252), über welche das Protein mit den viralen Glykoproteinen oder dem RNP interagiert [59, 146] (**Abb. 5**). Das Kernlokalisations-signal wird gebildet von den aa 101-105. Die im Text angegebenen Aminosäuren basieren auf der M1-Nummerierung von A/PR/8/34. Das M1-Protein ist stark konserviert zwischen verschiedenen Influenza-A-Subtypen und in der Lage, die Generierung kreuzprotektiver

Virus-spezifischer CTL zu induzieren [12, 168]. Zudem ist beschrieben, dass die Proteine M1 und HA, bei Koexpression der kodierenden Gene, zusammen hoch immunogen wirken, was möglicherweise durch die Ausbildung von *virus like particles* (VLPs) bedingt wird [45, 95], und für die vorliegende Arbeit von Interesse ist. VLPs bilden Strukturen des Virus nach, enthalten aber kein virales genetisches Material und sind entsprechend nicht replikationsfähig. Sie werden aber oft besser vom Immunsystem erkannt und führen i.d.R. zu einer stärkeren Immunantwort als das lösliche Antigen [68, 115]. M1 ist daher neben dem HA als virale Untereinheit für die Herstellung von *subunit*-Impfstoffen gegen Influenza sehr attraktiv und möglicherweise als Basis für die Entwicklung universell wirksamer Influenzaimpfstoffe geeignet [153].

1.2 Prävention durch Impfung

Die Immunisierung gilt als wichtigste und effektivste Strategie für die Prävention und Kontrolle der Influenza [111]. Ziel der Impfung ist im optimalen Fall die Induktion einer ausgeglichenen adaptiven Immunität von humoraler (d.h. B-Zell / AK-vermittelten) und zellulärer (d.h. antigenspezifische T-Zell-vermittelten) Immunantwort sowie eines immunologischen Gedächtnisses. Für die präventive Impfung gegen Viruserkrankungen werden traditionell attenuierte Viren mit verminderter Virulenz (Lebendimpfstoffe) oder inaktivierte Erreger (Totimpfstoffe) eingesetzt. Obwohl diese Impfstoffe sehr wirksam sind, wird aktiv an Alternativen geforscht. Gründe dafür sind die potenzielle Reaktivierung der virulenten Form des Erregers durch Mutationen (Reversion). Des Weiteren besteht z.B. bei Influenzaviren, insbesondere bei der Verwendung von Lebendimpfstoffen, die Gefahr, dass neue Virusvarianten durch Reassortierung des Impfvirus mit anderen im Impfling bereits vorhandenen Viren (Feldviren) entstehen. Humane Influenzaimpfstoffe werden derzeit präferiert noch in embryonierten Hühnereiern über Reassortierungsverfahren attenuierter Impfstämme mit potenziell epidemischen oder pandemischen, zirkulierenden Stämmen gewonnen [169]. Diese Impfviren tragen dabei die Oberflächenproteine HA und NA der zirkulierenden Stämme und beinhalten ansonsten die Proteine des standardisierten, attenuierten Produktionsstammes, der vor Verwendung inaktiviert wird (Totimpfstoff) [126, 195]. Diese Impfstoffe haben einige Limitationen, wie z.B. eine relativ lange Produktionszeit (etwa 6 Monate) [49, 78], die Abhängigkeit von qualitativ hochwertigen Hühnereiern für die Herstellung und damit eine potenziell limitierte Impfstoffkapazität, wodurch es zu Produktionsengpässen, insbesondere während einer Pandemie, kommen kann [153]. Seit einigen Jahren wird zudem die Möglichkeit genutzt, Impfstämme rekombinant über

gentechnische Verfahren in Zellkulturen herzustellen. Anwendung finden dabei vor allem Säugierzellen, wie MDCK- (*Madin-Darby canine kidney*) und Vero-Zellen (*African green monkey kidney*) [82]. Kontaminationen des Impfstoffes durch das Anzuchtmedium stellen dabei ein hohes Risiko dar [111, 126]. Da wirksame Epitope in einem Impfstoff oft nicht in den Virusvarianten der folgenden Saison präsent sind, wird durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) halbjährlich entschieden, welche zirkulierenden Stämme für die saisonale Grippeimpfung eingesetzt werden [146]. Derzeit angewandte trivalente Impfstoffe im Menschen umfassen zwei Influenza-A-Viren und ein Influenza-B-Virus, quadrivalente beinhalten zusätzlich ein zweites Influenza-B-Virus [128]. Als attenuierter Impfstamm wird seit über 30 Jahren der Stamm Influenza A/PR/8/34 (H1N1) verwendet. Dieser Stamm ist apathogen im Menschen und zeigt ein sehr gutes Wachstum mit hohen Virusausbeuten in embryonierten Hühnereiern [130, 138, 190]. Da seit der Pandemie 2009 weiterhin pdm09-Viren im Menschen zirkulieren, enthalten aktuelle Impfstoffe auch A(H1N1)pdm09 ähnliche Stämme [128].

1.2.1 Impfstoffe gegen aviäre Influenza und aktuelle Impfsituation

Schutzimpfungen gegen hochpathogene AIV der Subtypen H5 und H7, die Erreger der „Geflügelpest“, und niederpathogene Virusvarianten dieser Subtypen sind in der Europäischen Union (EU) verboten [146]. Entsprechend beruht die derzeitige Bekämpfung der AI auf der Früherkennung und Tilgung (Keulung) infizierter Bestände und Kontaktbestände. Diese Maßnahmen gehen in der Nutztierhaltung jährlich mit hohen ökonomischen Schäden im Milliardenbereich einher [150]. Schutzimpfungen dürfen in Ausnahmefällen, wie z.B. bei Zootieren, nur mit einem Markerimpfstoff durchgeführt werden, welche eine Differenzierung infizierter und geimpfter Tiere ermöglichen (DIVA, *differentiating infected from vaccinated animals*) [19, 33, 146]. Gegen AIV, die nicht den Subtypen H5 und H7 angehören, wird beim Auftreten klinischer Symptomatik auch in der EU geimpft [146]. Derzeit lizenzierte Impfstoffe gegen AI sind fast ausschließlich Totimpfstoffe, welche subkutan oder intramuskulär verabreicht werden [100, 163]. Im Hinblick auf die genannten Risiken, die diese Impfstoffe haben, hat die Entwicklung neuer und schnell adaptierbarer Impfstoffe eine große humanitäre und wirtschaftliche Bedeutung.

1.2.2 Virale Proteine als Untereinheiten für *subunit*-Impfstoffe

Aufgrund der bereits angesprochenen offenkundigen Schwächen der derzeit verwendeten Influenzaimpfstoffe (Reversion und Reassortierung, geringe Kreuzprotektivität, mögliche Kontaminationen aus den Anzuchtmedien, DIVA nicht oder

nur schwer realisierbar), wird entsprechend aktiv an Alternativen geforscht. Ziel ist es, risikofreie, effektive und kostengünstige Impfstoffe zu generieren, die in kurzer Zeit in hohen Quantitäten produziert werden können. Hier bieten sogenannte *subunit*-Markerimpfstoffe eine attraktive Möglichkeit, bei welchen mit einem Hauptantigen oder einer definierten Anzahl an Antigenen des Erregers geimpft wird [192]. Solche Antigene sind häufig Proteine der Virushülle oder des Viruskapsids, die auch ohne Anwesenheit des vollständigen Viruspartikels eine Immunantwort induzieren können [11]. Die Vorteile von *subunit*-Impfstoffen sind eindeutig: Es wird nicht mit vermehrungsfähigen, kompletten Erregern (attenuiert oder inaktiviert), sondern mit Teilkomponenten (Markern) des Pathogens immunisiert. Sie sind daher sehr sicher und im Vergleich zu Lebendimpfstoffen deutlich stabiler. *Subunit*-Impfstoffe sind zusätzlich attraktiv, weil sie nach ihrem Einsatz eine Differenzierung von immunisierten und natürlich infizierten Individuen erlauben (DIVA-Strategie). Nachteile sind die bisher oft unzureichende Immunogenität, was den Einsatz von Adjuvantien erfordert, und die aufwändige, zeitintensive Herstellung sowie kostenintensive Aufreinigung des Antigens [115, 192]. Die bisherige Entwicklung von *subunit*-Impfstoffen gegen Influenza kann in zwei Linien eingeteilt werden: (1) Generierung von Virus-neutralisierenden AK, die gegen strukturelle und / oder konservierte Bereiche des HA- bzw. des M2-Proteins gerichtet sind, und (2) Induktion einer kreuzprotektiven T-Zell Antwort gegen konservierte, interne Proteine wie z.B. M1 oder NP [12]. Für einige rekombinante virale Antigene wurde gezeigt, dass diese zu VLPs (siehe auch 1.1.5) assemblieren. Solche VLPs können sowohl die humorale, als auch die zelluläre Immunantwort effektiv stimulieren und gelten daher als besonders potente *subunit*-Impfstoffe [67, 184].

1.3 Expressionssysteme für die Herstellung von *subunit*-Impfstoffen

Die Möglichkeit Gene *in vitro* zu synthetisieren, erlaubt es diese gezielt zu verändern. Dadurch können Proteine mit verbesserten Funktionen und / oder in höheren Quantitäten erzeugt werden. Für die Produktion von rekombinanten Proteinen wird i.d.R. das zugehörige kodierende Gen über einen Expressionsvektor (Plasmid) in eine Wirtszelle eingebracht und das Protein in dieser hergestellt [180]. Nachteile sind, dass für die Selektion der gentechnisch veränderten Mikroorganismen oft Antibiotika eingesetzt oder für sich anschließende Aufreinigungsprozesse das Protein mit einem *tag* (Markierung aus kurzen Aminosäuresequenzen) versehen wird. Aufgrund zunehmender Resistenzen gegen Antibiotika bzw. möglicher Veränderungen der nativen Struktur des Proteins durch bestehende *tags*, ist deren Einsatz nicht erwünscht [3, 109]. Zudem

liegen heterologe Proteine, aufgrund fehlender posttranslationaler Modifikationen im Expressionssystem oder sich anschließender Aufreinigungsprozesse oft fehlgefaltet oder denaturiert vor. Der Erfolg einer Immunisierung hängt aber von der Generierung nAK und damit unmittelbar von der Ausbildung der nativen Struktur des Antigens ab. Da die meisten therapeutischen Proteine (60 %) nativ glykosyliert vorliegen [143], sind Organismen für die Expression von großer Relevanz, die entsprechende posttranslationale Modifikationen der rekombinanten Proteine erlauben [181]. Entsprechend sind prokaryotische Organismen wie *Escherichia coli* (*E. coli*), nur bedingt geeignet. Zur heterologen Genexpression werden häufig eukaryotische Produktionsplattformen, z.B. Insektenzellen wie Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) in Kombination mit dem Baculovirus oder Pflanzen wie *Nicotiana tabacum* bzw. *Nicotiana benthamiana* eingesetzt [29, 111, 176]. Diese Expressionssysteme erlauben qualitativ gute Antigenausbeuten. Nachteilig sind jedoch die im Vergleich zu prokaryotischen Systemen kostenintensiven Produktionssysteme, stark variierenden Produktionschargen, die nur durch aufwändige Methoden, wie speziell konstruierte Viren oder langwierig generierte transgene Organismen, kontrollierbar werden sowie die niedrigen Wachstumsgeschwindigkeiten. Zudem besteht das Risiko der Kontamination der zur Immunisierung eingesetzten Komponenten mit Substanzen, u.a. auch Viren, aus Kulturmedien bzw. der Pflanze [7, 29, 70].

Hefen sind eine verbreitete Alternative zu prokaryotischen und höheren eukaryotischen Expressionssystemen und werden seit über 30 Jahren für die Herstellung rekombinanter Proteine verwendet [104]. Hefen kombinieren die Vorteile der Anzucht von Prokaryoten (rasantes Wachstum, kostengünstige Nährmedien, einfache genetische Manipulation) mit wichtigen Eigenschaften höherer Eukaryoten (posttranskriptionale Modifikation, Proteinsekretion). Hefen sind eine taxonomisch uneinheitliche Gruppe von eukaryotischen, einzelligen Pilzen, die sich genetisch, morphologisch und physiologisch z.T. erheblich voneinander unterscheiden. Die Zellwand von Hefen besteht zu 95 % aus Polysacchariden. Davon sind 40 % Mannane (β -1,4-glykosidisch verknüpfte Mannose-Polymere), kovalent an Zellwandproteine gebunden; etwa 60 % Glucane (β -1,3- und β -1,6-glykosidisch verknüpfte Glucose-Polymere) und 1-3 % Chitin [8]. Derartige Polysaccharide werden von höheren eukaryotischen Zellen nicht synthetisiert und vom tierischen und humanen Immunsystem durch PRR, wie *toll-like*-, Dectin-1- und Mannan-Rezeptoren, z.B. auf DC als PAMPs erkannt, wodurch die Phagozytose der Hefezellen initiiert wird [2, 7, 173]. Rekombinant in Hefe hergestellte Proteine können in das Medium sekretiert und anschließend aufgereinigt, oder in der Zelle verbleibend appliziert werden

(siehe 1.4). Für die heterologe Genexpression werden verschiedene Hefen der Gattungen *Saccharomyces*, *Komagataella* (*Pichia*), *Kluyveromyces*, *Hansenula* oder *Yarrowia* verwendet. Diese Hefen differieren hinsichtlich ihres Metabolismus und sind daher unterschiedlich gut für die heterologe Proteinsynthese geeignet. Das erste rekombinant in Hefen produzierte virale Oberflächenprotein, das HBsAg (*Hepatitis B surface antigen*), wurde in der „Bäckerhefe“ *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) hergestellt und aufgereinigt als Impfstoff gegen das Hepatitis-B-Virus verwendet [104]. Seit einigen Jahren wird zudem aktiv an der Entwicklung Hefe-basierter Impfstoffe geforscht. So werden z.B. Antigene in *S. cerevisiae* mit dem Ziel produziert, die rekombinanten Hefen direkt als Impfstoff zur Immunisierung gegen Krebs und HI (*human immunodeficiency*)- oder HB (Hepatitis-B)-Viren einzusetzen [2]. Entsprechende Impfstoffe befinden sich derzeit in klinischen Studien [2]. Ein wesentlicher Nachteil von *S. cerevisiae* ist eine reduzierte Ausbeute an Biomasse und Protein, die durch eine hohe Ethanolsynthese unter aeroben Anzuchtbedingungen hervorgerufen wird [18, 119]. Die methylotrophen Hefen *Hansenula polymorpha* und *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) werden oft als alternative Hefen für die Proteinsynthese verwendet, da sie zu höheren Zelldichten wachsen und eine geringere Hypermannosylierung (siehe 1.1.4) der rekombinanten Proteine aufweisen. Der dabei notwendige Einsatz von Methanol als Kohlenstoffquelle erfordert aber den Einsatz spezieller, explosionssicherer Fermenter [24, 177]. Für *Yarrowia lipolytica* sind zwar einige genetische Marker bekannt, welche die Entwicklung eines effizienten Systems für die heterologe Genexpression ermöglichen, die Hefe kann aber nur wenige Zucker (hauptsächlich Glucose) verwerten, wodurch das Substratspektrum stark limitiert ist (Vgl. 1.4.1) [119]. Neben *S. cerevisiae* ist die Hefe *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*) eines der vielversprechendsten Systeme für die heterologe Genexpression [155, 177].

1.4 Neuartige Tierimpfstoffe auf Basis von *Kluyveromyces lactis*

Angesichts weltweit hoher ökonomischer Schäden durch Virusinfektionen bei Nutztieren, besteht ein großer Bedarf an wirksamen und sicheren Impfstoffen im Veterinärbereich. Als Impfstoffplattform im Projekt „VEROVACCiNES“ dienen patentierte *K. lactis*-Stämme, die Fremdartigene, wie virale Proteine, produzieren können. Die Gene von *subunits* des Virus werden über eine neu entwickelte Technik schnell und effizient in das Genom der Hefe eingebracht und die Expression des Fremdgens über Zugabe von Lactose in das Anzuchtmedium induziert. Als innovatives Verfahren werden die gesamten Zellen in inaktivierter Form direkt subkutan als Impfstoff eingesetzt. Zeit- und kostenintensive

Antigen-Extraktionsschritte entfallen. Die subkutane Applikation bietet den Vorteil, dass nur eine geringe Belastung für den Impfling entsteht und die Haut als immunologisch aktives Organ genutzt wird. Tieferliegende Hautschichten sind reich an APC des SALTs (*skin-associated lymphoid tissue*), welche die rekombinante Hefe nach Injektion erkennen und phagozytieren können [2].

1.4.1 Verwendung von *K. lactis* als heterologes Expressionssystem

Die sogenannte „Milchhefe“ *K. lactis* gehört wie *S. cerevisiae* zu den knospenden Hefen. Beide Hefen haben sich vor etwa 150 Mio. Jahren auseinander entwickelt [9, 177]; sie gehören zu den „food grade Hefen“ mit dem GRAS-Status (*generally regarded as safe*), der die Verwendung als Zusatzstoff in der Lebensmittelindustrie oder als Futterzusatz erlaubt [155, 177]. Als Expressionssystem für eine Vielzahl verschiedener, heterologer Proteine aus unterschiedlichen Spenderorganismen (Bakterien, Pilze, Viren, Pflanzen, Säuger) [177], bietet *K. lactis* als „nicht-konventionelle“ Hefe speziell gegenüber *S. cerevisiae* wichtige Vorteile. Im Unterschied zu *S. cerevisiae* weist *K. lactis* einen Crabtree-negativen Charakter auf [17]. D.h., dass das Wachstum unter aeroben Bedingungen weniger von einer Glucoserepression respiratorischer Gene und Ethanolbildung geprägt ist. *K. lactis* kann entsprechend bei hohen Glucose-Konzentrationen mit hohen Biomasse- und Proteinausbeuten produziert werden [17, 18, 143]. Durch ein Repertoire an Genen (siehe 1.4.2), die in *S. cerevisiae* nicht präsent sind, besitzt *K. lactis* ein breiteres Substratspektrum [18]. Neben Mikroorganismen, wie Milchsäure- und Enterobakterien, ist *K. lactis* daher in der Lage, das kostengünstige Substrat Lactose (Milchzucker) als Energie- und Kohlenstoffquelle zu verwerten [137]. Das Lactose-spaltende Enzym β -Galactosidase aus *K. lactis* findet Anwendung bei der Herstellung von Lactose-freien Molkereiprodukten [18, 24, 177]. Das erweiterte Substratspektrum bietet die Möglichkeit, *K. lactis* großtechnisch im Fermenter in hohen Zellkulturdichten mit ergiebigen Konzentrationen an rekombinantem Protein zu produzieren [155]. Im Vergleich zu *S. cerevisiae* weist das Genom von *K. lactis* keine intensiven Genduplikationen auf und zeigt eine außergewöhnlich hohe Stabilität [17, 39]. Das haploide Genom besteht aus 6 Chromosomen mit einer Größe von 1,1 bis 2,6 Mbp und ist vollständig sequenziert [18, 24]. Der starke *LAC4-12*-Promoter ($P_{LAC4-12}$) ist optimal für die heterologe Genexpression in *K. lactis* und wird durch Zugabe von Lactose oder Galactose in das Anzuchtmedium induziert [24]. *S. cerevisiae* fehlen derart starke, streng regulierte Promotoren [143].

Bei der Anwendung von *K. lactis* für die Entwicklung von *subunit*-Impfstoffen auf der Grundlage von Hefe (im Folgenden als Hefe- bzw. *K. lactis*-basierte *subunit*-Impfstoffe bezeichnet), wird eine Reihe von Eigenschaften kombiniert, die entscheidende Vorteile bei der *subunit*-Immunisierung bieten. 1. Die Impfstämme (im Folgenden bezeichnet mit der Abkürzung „VAK“) können in hohen Zelldichten und damit kostengünstig kultiviert werden. 2. Durch die Integration des Fremdgens in das Genom dieser Stämme und durch die Verwendung induzierbarer Promotoren wird das Antigen unter kontrollierten Bedingungen in konstanter Quantität pro Hefezelle produziert. 3. Die Selektion der transgenen Stämme erfolgt ohne Einsatz von Antibiotika. 4. Durch Kultivierung der Stämme im synthetischen Medium lassen sich Kontaminationen tierischer Herkunft im Anzuchtmedium ausschließen. 5. Die direkte Verwendung des kompletten Materials der inaktivierten Hefezellen zur Immunisierung ist einfach und kostengünstig. 6. Die Verwendung molekularbiologisch manipulierbarer Hefestämme erlaubt eine schnelle Veränderung eines Impfstoffes (innerhalb von Tagen) und Testung innerhalb weniger Wochen.

Die Verwendbarkeit von *K. lactis* zur Impfstoffentwicklung wurde innerhalb des Projektes bereits erfolgreich mit einem Hefestamm demonstriert, der das Kapsidprotein-Antigen VP2 des Geflügelpathogens *Infectious bursal disease virus* (IBDV), einem Virus der unbehüllten Klasse, produziert. Nach subkutaner Applikation der Hefe im Zieltier Huhn, wurde in nachfolgenden Infektionsstudien mit IBDV eine 90-100 % Protektion der Tiere festgestellt [4, 5].

1.4.2 Expressionskassette

Für die Generierung von *K. lactis*-Impfstämmen wurde ein Wirts-Vektorsystem entwickelt, das auf dem hoch-fermentierbaren Abkömmling des Stammes CBS 2359, VAK367-D4 (VAK556) und dem integrativen *K. lactis*-Vektor Klp3 basiert. Das System ermöglicht die gezielte Integration eines Fremdgens am *lac4::ScURA3*-Locus in nur einem Schritt [80] (**Abb. 6**). Im Wildtyp (WT) VAK367 wurde das 5'-Ende des *LAC4*-Gens so durch ein *ScURA3*-Markergen disruptiert, dass keine funktionsfähige β -Galactosidase gebildet werden kann und *K. lactis* nicht mehr in der Lage ist, Lactose als Kohlenstoffquelle zu verwerten (VAK556) [5, 80]. Der Klp3-Vektor enthält die Expressionskassette, in welcher das *GOI* (*gene of interest*) 5'- durch den *LAC4*-Promoter (P_{LAC4}) und 3'- durch den *AgTEF1*-Terminator (T_{AgTEF1}), den *KIGal80*-Promoter ($P_{KIGAL80}$) und die in VAK556 fehlende 5'-Region des *LAC4*-Gens (*lac4'*) flankiert wird [4]. Zur Vereinfachung der Klonierung wurde eine *multiple cloning site* in

den Vektor eingeführt (Klp3-MCS) [5]. Nach Restriktion des *GOI* tragenden Klp3-Vektors, mit einem Restriktionsenzym, welches im P_{LAC4} und im *lac4'*-Genfragment schneidet, wird das resultierende DNA-Fragment in VAK556 transformiert.

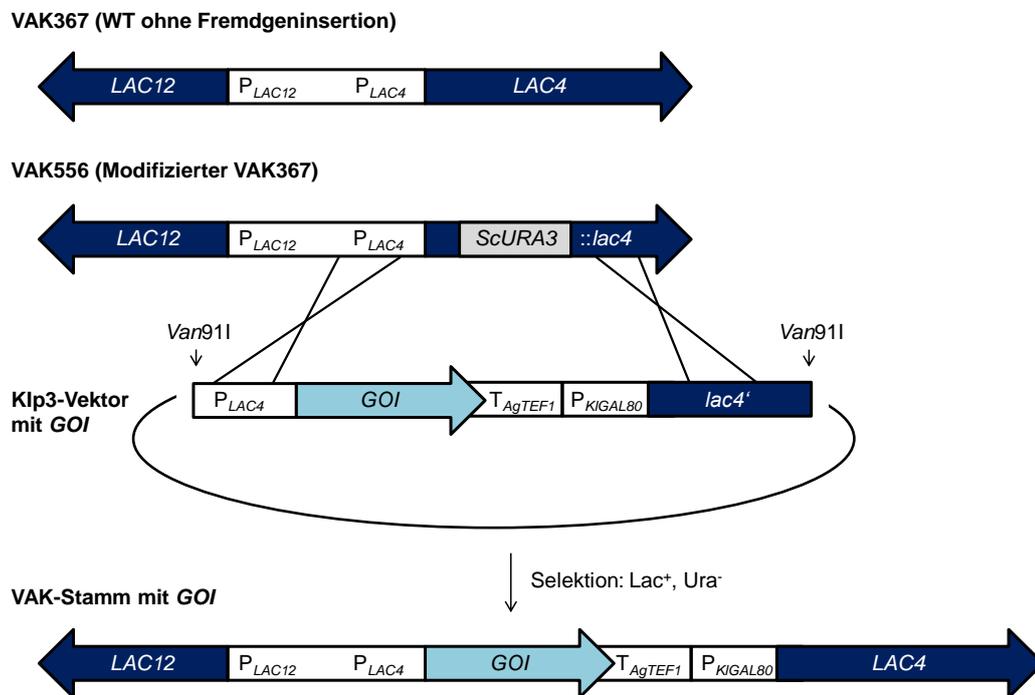


Abbildung 6: Prinzip der Erstellung rekombinanter *K. lactis*-Stämme. Schematische Darstellung der genomischen Anordnung der *LAC*-Gene im Wildtyp (WT) VAK367, VAK556 und im *H1*-rekombinanten VAK952 sowie im Klp3-Vektor. Die Lokalisation und Transkriptionsrichtung der Gene *LAC12* (Lactose-Permease) und *LAC4* (β -Galactosidase) sowie des Fremdgens *GOI* (*gene of interest*) werden durch Pfeile dargestellt. Beim Stamm VAK556 ist das *LAC4*-Gen durch Insertion des *S. cerevisiae URA3*-Markergens disrupted (*::lac4*), wodurch der Stamm Lactose als Kohlenstoffquelle nicht verwerten kann. Durch das eingeführte *URA3*-Gen kann VAK556 Uracil synthetisieren. Die Expressionskassette des Klp3-Vektors beinhaltet nacheinander angeordnet: *LAC4*-Promoter, *GOI*, *TEF1*-Terminator aus *Ashbya gossypii*, *GAL80*-Promoter sowie den in VAK556 disruptierten Bereich von *LAC4* (*lac4'*). Für die Generierung rekombinanter *K. lactis*-Stämme wird der Klp3-Vektor mit einem Restriktionsenzym (z.B. *Var911*) hydrolysiert und in VAK556 transformiert. Nach erfolgreicher homologer Rekombination enthält der resultierende Stamm das *GOI*, kann Lactose verwerten (Lac^+) und ist Uracil-auxotroph (Ura^-). Verändert nach [4, 80].

In Folge der homologen Rekombination wird das *GOI* in das Genom von *K. lactis* inseriert und steht anschließend unter Kontrolle des *LAC4-12*-Promoters ($P_{LAC4-12}$). Zudem wurde das *LAC4*-Gen rekonstituiert und befindet sich anschließend unter Kontrolle des schwächeren Promoters $P_{KIGAL80}$. Beide Promotoren sind regulierbar durch den Transkriptionsaktivator *KIGal4* und dessen Repressor *KIGal80* [4]. *KIGal4* bindet als Homodimer an vier *upstream activating sequences* (UAS, U) in der komplexen intergenischen Kontrollregion von $P_{LAC4-12}$, welche die Transkription der divergierenden Gene *LAC4* und *LAC12* koreguliert [80]. Ist keine Lactose oder Galactose im Medium vorhanden (nicht-induzierte Bedingungen), wird *KIGal4* durch die Bindung von *KIGal80*

reprimiert und die Transkription von *LAC4* bzw. dem Fremdgen bleibt nahezu aus. Unter induzierten Bedingungen dissoziiert KIGal80 von KIGal4 ab und die Transkription der Zielgene wird aktiviert [51]. Die intergenische Region beinhaltet zudem die *basal control region* (BCR) (siehe auch **Abb. 30** Seite 86), die als Binderegion für die Transkriptionsaktivatoren KICat8 und KISip4, welche die basale Expression der *LAC*-Gene unter nicht-induzierten Bedingungen (Glucose) vermitteln, dient. Eine Deletion der kompletten BCR (im Folgenden als LR2 bezeichnet) führt zu einem vollständigen Verlust der basalen *LAC4*-Transkription in Abwesenheit des induzierenden Zuckers [81, 107]. Die Selektion rekombinanter Hefestämme erfolgt auf Lactose-haltigem Nährmedium. Die aktive Aufnahme des Disaccharids Lactose wird durch die Lactose- / Galactosepermease (kodiert durch *LAC12*) vermittelt [17, 141]. Lactose wird durch das Enzym β -Galactosidase (Lactase, *LAC4*) in Glucose und Galactose hydrolysiert. Als weiterer Selektionsmarker dient die erworbene Uracil-Auxotrophie (Ura⁺), durch Verlust des *ScURA3*-Gens nach erfolgreicher homologer Rekombination. Entsprechende *K. lactis*-Stämme können auf Nährmedium ohne Uracil-Supplementation nicht wachsen [80].

1.5 Zielstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten H1-rekombinante Hefestämme erstellt und charakterisiert, sowie deren immunogenes Potenzial in einem Immunisierungs- und Belastungsmodell in BALB/c Mäusen evaluiert werden. Dabei sollte untersucht werden, ob *K. lactis*-basierte *subunit*-Impfstoffe für die Immunisierung gegen Influenza-A-Viren geeignet sind. Hierbei galt es, ein möglichst breites Informationsspektrum abzufragen bezüglich a) Wirksamkeit (AK-Generierung, Viruslast, Schutzwirkung), b) Dosis-Wirkung des Hefe-basierten Impfstoffes, c) Wirkung von Adjuvantien, d) Anwendbarkeit verschiedener Impfschemata, e) Lagerstabilität und f) Einsatz eines Verfahrens zur Sterilisation der Impfstoffe. Des Weiteren sollte die Möglichkeit zur Erstellung multivalenter *K. lactis*-basierter *subunit*-Impfstoffe evaluiert werden. Auf Grundlage der gewonnenen Ergebnisse galt es, das Potenzial für die Entwicklung von *K. lactis*-basierten *subunit*-Impfstoffen gegen die aviäre Influenza abzuschätzen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Alle Geräte, die nicht in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet sind, wurden an den entsprechenden Stellen im Text aufgeführt.

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems (Foster City, USA)
5417R, 5424R, 5810 Zentrifugen	Eppendorf AG (Hamburg)
Allegra X-30R Zentrifuge	Beckmann Coulter (Brea, USA)
Avanti J-25 Zentrifuge	Beckmann Coulter
Axiovert 200M Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss (Oberkochen)
Brutschränke für Hefe und Bakterien	Memmert GmbH (Schwabach)
CO ₂ -Inkubator (Brutschrank)	Binder GmbH (Tuttlingen)
Drehschieber-Vakuumpumpe	Vacuubrand GmbH & Co. KG (Wertheim)
DU-640 Spectrophotometer	Beckmann Coulter
Durchflusszytometer (FACSCalibur)	Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)
Durchlichtmikroskop Primo Vert	Carl Zeiss (Oberkochen)
Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH (Osterode)
Gel Doc XR ⁺ Dokumentations-System	Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, USA)
Heizblock	Techne (Stone, UK)
Isotemp 210 Wasserbad	Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
Magnetrührer mit Heizung	IKA Werke GmbH & Co. KG (Staufen)
Multi-Pulse-Vortexer	Glas-Col (Terre Haute, USA)
NanoPhotometer	Implen (München)
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences (Lincoln, USA)
Orbitalmischer	Föbel Labortechnik (Lindau)
pH-Meter und Elektrode	WTW (Weilheim)
Pipetten	Eppendorf AG
Pipettierhelfer	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim)
Power Supply	Bio-Rad Laboratories Inc.
PowerWave XS Microplate Spectrophotometer	Bio Tek Instruments Inc. (Winooski, USA)
Rotina 380 R Tischzentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co.KG (Tuttlingen)
Schnellkochtopf Perfect Plus	WMF Group GmbH (Geislingen an der Steige)
Schüttler	Infors AG (Bottmingen, Schweiz)
Sicherheitswerkbank	Beckmann Coulter
Trockenschrank	Heraeus Holding GmbH (Hanau)
Vakuumpumpe RC6	Vacuubrand GmbH (Wertheim)
VARIOKLAV Dampfsterilisator	HP Medizintechnik GmbH (Oberschleißheim)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc.(Bohemia, USA)
Waage, Feinwaage	Sartorius (Göttingen)

2.1.2 Verwendete Software

Für die Vorbereitung von Klonierungen und der Auswertung generierter Daten wurde folgende Software verwendet: AxioVision (Carl Zeiss), CellQuest Pro (Becton Dickinson), Clone Manager 9 (Scientific & Educational Software, Denver, USA), ImageJ (National Institutes of Health, Wayne Rasband, Bethesda, USA), Image Lab Software (Bio-Rad Laboratories Inc.), KaleidaGraph 4.1 (Synergy, Reading, USA), Odyssey 2.1 (LI-COR Biosciences), Prism 3.0 (Graph Pad Software, La Jolla, USA), SnapGene 2.1 (GSL Biotech LLC, Chicago, USA)

2.1.3 Chemikalien, Puffer und Verbrauchsmaterial

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien von den nachfolgenden Firmen bezogen: AbD Serotec (Düsseldorf), AMS Biotechnology (Abington, UK), AppliChem GmbH (Darmstadt), Becton Dickinson, Bio-Rad Laboratories Inc., Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Clontech Laboratories Inc. (Mountain View, USA), Coriell Institute for Medical Research (Camden, USA), Fluka-Feinchemikalien GmbH (Neu-Ulm), FMC Health & Nutrition (Philadelphia, USA), GE Healthcare Life Sciences (Little Chalfont, UK), Gibco (Gaithersburg, USA), Invitrogen (Carlsbad, USA), LI-COR Biosciences, Merck KGaA (Darmstadt), New England Biolabs GmbH (Ipswich, USA), Roche Deutschland Holding GmbH (Basel, Schweiz), Santa Cruz Biotechnology (Dalles, USA), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA), Worthington Biochemical Corp. (Lakewood, USA), Zymo Research Corp. (Irvin, USA)

2.1.4 Puffer und Lösungen

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Puffer und Lösungen mit doppelt destilliertem Wasser (H_2O_{dd}) erstellt und bei RT gelagert.

Tabelle 2: Übersicht verwendeter Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung; ggf. Lagerung oder Prozessierung
Aceton / Methanol	Im Verhältnis 60:40; -20 °C
Avicel-Lösung	2,4 % (w/v) Avicel (FMC BioPolymer); autoklaviert
B60-Aufschlusspuffer	50 mM HEPES-KOH pH 7,4; 50 mM NaCl; 2 mM Mg-Acetat; 0,1% (w/v) Triton X-100; 10 % (w/v) Glycerol; 1 mM NaF; 20 mM Glycerophosphat; 4 °C; frisch zugesetzt: 1 mM DTT; 1 Tablette / 50 mL Complete Protease Inhibitor (Roche); 1 mM PMSF
<i>Casaamino acids</i>	10 % (w/v) <i>Casaamino acids</i> ; autoklaviert; Endkonzentration: 0,2 %
Entwickler / Fixierer	3 L H_2O + 0,76 L Carestream Kodak GBX (Sigma-Aldrich)
Glucose-Lösung	20 % (w/v) Glucose; autoklaviert
Glycerol-Lösung	30 % (w/v) Glycerol
Hepes-Lösung	1 M Hepes; steril filtriert; lichtgeschützt

Kristallviolett (2x)	50 mL Methanol; 300 mL 37 % Formaldehyd; 1,3 g Kristallviolett; 700 mL H ₂ O _{dd} ; Arbeitslösung: 1:2 verdünnt mit 1x PBS
Lactose-Lösung	20 % (w/v) Lactose; steril filtriert
Laufpuffer (10x)	247 mM Tris; 1,92 M Glycin
LiOAc / SDS-Lösung	200 mM LiOAc; 1 % (w/v) SDS
Methionin-Lösung	2 mg/ml Methionin; autoklaviert; Endkonzentration: 20 µg/mL
NaHCO ₃ -Lösung	7,5 % (w/v); steril filtriert
Natriumacetat-Lösung	3 M Natriumacetat pH 4,8 (HCl)
PBS (10x)	1,37 M NaCl; 26,8 mM KCl; 14,69 mM KH ₂ PO ₄ ; 64,8 mM Na ₂ HPO ₄ ; Arbeitslösung: 1x pH 7,2 (HCl); autoklaviert
PBST	1x PBS + 0,05 % (v/v) Tween 20
PLAG-Lösung	40 % (w/v) PEG4000; 0,1 M LiOAc; 10 mM Tris pH 7,5 (HCl); 1 mM EDTA; 15 % (v/v) Glycerol; autoklaviert
Ponceau S-Lösung	0,5 % (w/v) Ponceau S; 10 % (v/v) Essigsäure
Probenpuffer (5x)	300 mM Tris/HCl pH 6,8; 10 % (w/v) SDS; 0,15 % (w/v) Bromphenolblau; 50 % (w/v) Glycerol; 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol; -20°C
Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M Tris; 0,4 % (w/v) SDS; pH 6,8 (HCl)
SDS-Laufpuffer (10x)	247 mM Tris; 1,92 M Glycin; 1 % (w/v) SDS
Sorbitol-Puffer	50 mM Hepes/KOH pH 7,5; 1 M Sorbitol
Sorbitol-Puffer mit Triton	Sorbitol-Puffer; 0,1 % Triton-X100 (v/v)
TAE-Puffer	40 mM Tris pH 7,6 (CH ₃ COOH); 1 mM EDTA
TBS (10x)	1,37 M NaCl; 200 mM Tris
TBST	10 % (v/v) 10x TBS (v/v); 0,1 % (v/v) Tween 20; pH 7,6 (HCl)
TFB I-Puffer	30 mM Kaliumacetat; 100 mM Rubidiumchlorid; 10 mM CaCl ₂ ; 50 mM Manganchlorid; 15 % (w/v) Glycerol, pH 5,8 (CH ₃ COOH); steril filtriert; 4 °C
TFB II-Puffer	10 mM MOPS pH 7,0; 75 mM CaCl ₂ ; 10 mM Rubidiumchlorid; 15 % (w/v) Glycerin; pH 6,5 (KOH); steril filtriert; 4 °C
TPCK-Trypsin	1 mg/mL; über Nacht gerührt; steril filtriert; aliquotiert; -20 °C; Endkonzentration: 1 µg/mL
Transferpuffer	10 % (v/v) Laufpuffer; 20 % (v/v) Methanol; über Nacht bei 4 °C gerührt; 4 °C
Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris; 0,4 % (w/v) SDS; pH 8,8 (HCl)
Uracil-Lösung	2 mg/mL Uracil; autoklaviert; Endkonzentration: 20 µg/mL
Zellaufschlusspuffer	50 mM Tris pH 8,0 (HCl); 100 mM NaCl; 5 mM MgCl ₂ ; frisch zugesetzt; 0,5 % (v/v) Igepal CA-630

2.1.5 Enzyme

Sofern im Text nicht anders vermerkt, wurden alle Enzyme den Herstellerangaben entsprechend verwendet und die vom Hersteller zur Verfügung gestellten Puffer eingesetzt.

Tabelle 3: Verwendete Enzyme

Bezeichnung	Funktion	Hersteller
<i>Ascl</i> , <i>NotI</i> , <i>Sall</i> , <i>Van91I</i> , <i>KpnI</i> , <i>Eco91I</i>	Restriktionsenzyme	Thermo Fisher Scientific
T4-DNA-Ligase (5 Weiss U/µL)	Ligase	
PNGase F (500000 U/mL)	Amydase	New England Biolabs
Zymolyase 100T (100 U/mg)	Lyse Hefezellwand	AMS Biotechnology

2.1.6 Bakterien- und Hefestämme

2.1.6.1 *Escherichia coli*

Aufgrund hoher Transformationseffizienz und stabiler Replikation von Plasmiden mit hoher Kopienzahl wurden für Amplifikationen von Plasmiden im Zuge von Klonierungen die *E. coli* Stämme TOP10 oder HST08 verwendet. Letztere wurden zusammen mit dem *In-Fusion HD Cloning Kit* eingesetzt.

Tabelle 4: Verwendete *Escherichia coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
TOP10	<i>F</i> ⁻ , <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara leu</i>) 7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (StrR), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen
HST08	<i>F</i> ⁻ , <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>phoA</i> , Φ 80 <i>d lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA - argF</i>) U169, Δ (<i>mrr - hsdRMS - mcrBC</i>), Δ <i>mcrA</i> , λ -	Clontech

2.1.6.2 *Kluyveromyces lactis*

Tabelle 5: Verwendete Wildtypstämme (ohne Fremdgeninsertion)

Nr.	Name	Genotyp	Phänotyp	Referenz
367	WT	<i>MATa</i> ; <i>ura3-20</i> ; <i>met5-1</i>	Ura ⁻ , Met ⁻ , Lac ⁺	[80]
556	WT-D4	<i>MATa</i> ; <i>ura3-20</i> ; <i>met5-1</i> ; <i>lac4::ScURA3</i>	Ura ⁺ , Met ⁻ , Lac ⁻	[80]
1139	WT URA3	<i>MATa</i> ; <i>met5-1</i>	Ura ⁺ , Met ⁻ , Lac ⁺	L. Munzel, 2014

Tabelle 6: Verwendete rekombinante Hefestämme (mit Fremdgeninsertion)

Nr.	Name	Genotyp	Phänotyp	Referenz
952	H1 _{PR8}	<i>MATa</i> ; <i>ura3-20</i> ; <i>met5-1</i> ; <i>P</i> _{LAC4-12} :: <i>H1</i> _{PR8} ⁻ <i>T</i> _{AgTEF} ⁻ <i>P</i> _{KIGAL80} :: <i>LAC4</i>	Ura ⁻ , Met ⁻ , Lac ⁺	[123]
1047	H1 _{Cal}	<i>MATa</i> ; <i>ura3-20</i> ; <i>met5-1</i> ; <i>P</i> _{LAC4-12} :: <i>H1</i> _{Cal} ⁻ <i>T</i> _{AgTEF} ⁻ <i>P</i> _{KIGAL80} :: <i>LAC4</i>	Ura ⁻ , Met ⁻ , Lac ⁺	[5]
1091	mH1 _{PR8}	<i>MATa</i> ; <i>ura3-20</i> , <i>met5-1</i> ; <i>P</i> _{LAC4-12} :: <i>mH1</i> _{PR8} ⁻ <i>T</i> _{AgTEF} ⁻ <i>P</i> _{KIGAL80} :: <i>LAC4</i>	Ura ⁻ , Met ⁻ , Lac ⁺	diese Arbeit
1231	H1 _{PR8} URA3	<i>MATa</i> ; <i>met5-1</i> ; <i>P</i> _{LAC4-12} :: <i>H1</i> _{PR8} ⁻ <i>T</i> _{AgTEF} ⁻ <i>P</i> _{KIGAL80} :: <i>LAC4</i>	Ura ⁺ , Met ⁻ , Lac ⁺	L. Munzel, 2015
1243	H1 _{PR8} /LR2	<i>MATa</i> ; <i>ura3-20</i> ; <i>met5-1</i> ; <i>P</i> _{LAC4-12-LR2} :: <i>H1</i> _{PR8} ⁻ <i>T</i> _{AgTEF} ⁻ <i>P</i> _{KIGAL80} :: <i>LAC4</i>	Ura ⁻ , Met ⁻ , Lac ⁺	J. Wieczorek, 2015
1255	2xH1 _{PR8}	<i>MATa</i> ; <i>met5-1</i> ; <i>P</i> _{LAC4-12} :: <i>H1</i> _{PR8} ⁻ <i>T</i> _{AgTEF} ⁻ <i>P</i> _{KIGAL80} :: <i>LAC4</i> ; <i>KIURA3</i> :: <i>P</i> _{LAC4-12} - <i>H1</i> _{PR8} ⁻ <i>T</i> _{AgTEF} ⁻	Ura ⁺ , Met ⁻ , Lac ⁺	diese Arbeit
1256	2x/H1 _{PR8} /LR2	<i>MATa</i> ; <i>met5-1</i> ; <i>P</i> _{LAC4-12} :: <i>H1</i> _{PR8} ⁻ <i>T</i> _{AgTEF} ⁻ <i>P</i> _{KIGAL80} :: <i>LAC4</i> ; <i>KIURA3</i> :: <i>P</i> _{LAC4-12-LR2} - <i>H1</i> _{PR8} ⁻ <i>T</i> _{AgTEF} ⁻	Ura ⁺ , Met ⁻ , Lac ⁺	diese Arbeit
1257	2xH1 _{PR8} /2xLR2	<i>MATa</i> ; <i>met5-1</i> ; <i>P</i> _{LAC4-12-LR2} :: <i>H1</i> _{PR8} ⁻ <i>T</i> _{AgTEF} ⁻ <i>P</i> _{KIGAL80} :: <i>LAC4</i> ; <i>KIURA3</i> :: <i>P</i> _{LAC4-12-LR2} - <i>H1</i> _{PR8} ⁻ <i>T</i> _{AgTEF} ⁻	Ura ⁺ , Met ⁻ , Lac ⁺	diese Arbeit
1283	H1 _{PR8} /M1 _{PR8}	<i>MATa</i> ; <i>met5-1</i> ; <i>P</i> _{LAC4-12} :: <i>H1</i> _{PR8} ⁻ <i>T</i> _{AgTEF} ⁻ <i>P</i> _{KIGAL80} :: <i>LAC4</i> ; <i>KIURA3</i> :: <i>P</i> _{LAC4-12} - <i>M1</i> _{PR8} ⁻ <i>T</i> _{AgTEF} ⁻	Ura ⁺ , Met ⁻ , Lac ⁺	diese Arbeit

2.1.7 Plasmide

Neben den verwendeten Plasmiden sind in der nachfolgenden Tabelle die klonierten DNA-Fragmente (Insert) und die verwendeten Restriktionsschnittstellen aufgeführt.

Tabelle 7: Übersicht verwendeter Plasmide

Nr.	Name	Ausgangsvektor	Insert	Referenz
1934	Klp3_H1 _{PR8}	Klp3	<i>Sall</i> -H1 _{PR8} - <i>XhoI</i>	[123]
2016	Klp3-MCS	Klp3	<i>Sall</i> -Multiple cloning site	[5]
2113	Klp3_mH1 _{PR8}	Klp3-MCS	<i>Sall</i> -mH1 _{PR8} - <i>NotI</i>	diese Arbeit
2281	KlpURA3-P _{L4-12} -Etx.B	pBluescript	<i>Apal</i> -Expressions-kassette- <i>SmaI</i>	H. Hürlimann, 2015
2303	KlpURA3-P _{L4-12-LR2} -Etx.B	KlpURA3-P _{L4-12} -Etx.B	<i>SnaBI</i> -P _{L4-12-LR2} - <i>Bsp1407I</i>	H. Hürlimann, 2015
2316	KlpURA3-P _{L4-12} -H1 _{PR8}	KlpURA3-P _{L4-12} -Etx.B	<i>Sall</i> -H1 _{PR8} - <i>NotI</i>	diese Arbeit
2317	KlpURA3-P _{L4-12-LR2} -H1 _{PR8}	KlpURA3-P _{L4-12-LR2} -Etx.B	<i>Ascl</i> -H1 _{PR8} - <i>NotI</i>	diese Arbeit
2343	pUC57-CDS-M1 _{PR8}	pUC57-CDS	<i>Sall</i> -M1 _{PR8} - <i>NotI</i>	GeneScript (Piscataway, USA)
2352	KlpURA3-P _{L4-12} -M1 _{PR8}	KlpURA3-P _{L4-12} -Etx.B	<i>Sall</i> -M1 _{PR8} - <i>NotI</i>	diese Arbeit

2.1.8 Zelllinien

Für Infektionsanalysen wurden *Madin-Darby canine kidney*-Zellen (MDCK 2., CRL2936) von American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, USA) verwendet.

2.1.9 Synthetische Oligonukleotide

Die aufgelisteten Oligonukleotide wurden unter Verwendung der Software SnapGene 2.1 erstellt, von Eurofins Genomics (Ebersberg) synthetisiert und als Primer für die Amplifikation und Sequenzierung von DNA-Fragmenten eingesetzt.

Tabelle 8: Primer für die DNA-Amplifizierung durch Polymerase-Kettenreaktion

Bezeichnung	Nr.	Sequenz (5' → 3')
oPR8 (18-565) f	VAK5	ACCGTCGACGGCGGCCATGGATACCATTGTATTGGTTATCACGCC
SUMO-oPR8rev	VAK6	TGAGTCGAGGCGGCCGCTCAGATGCAGATTCTACATTGTAATGAAC
PR8opt_Fw	OO134	TAGAAGATTCACCCCTGAAATCGCCG
PR8opt_Rv	OO135	TCAGGGTTACCCAATAACCAACCAGC
Klp3_4126_rev	MAB6	CCCAGATGCGAAGTTAAGTG
T7Pro_Fw	OO148	ACT CACTATAGGGGAATTGTGAGCGG
Klp3_7958_fwd	MAB13	AGGGCGACACGGAAATGTTG
<i>Sall</i> - <i>Ascl</i> -oPR8 f	VAK216	ACGCGTCGACGGCGGCCATGAAGGCCAACTTGTTAGTATTATTG
oPR8- <i>NotI</i> r	VAK217	AAAGAACCATGCGGCCGCTCAGATGCAGATTCTACATTGTAATGAACC
KLURA3-F1_rev	VAK69	TCAGCAAGCATCAATAATCCCCTTGTTTC
KLURA3-T_rev	VAK71	TACAACAGATCACGTGATCTTTTTGTAAG
LAC4p_Fw	OO56	GAGACAAAAGCTGGAATTGTGAGCGG

LAC4P-Klp_fw	VAK208	GCGGATAACAAGCTCAACACTTG
LAC4-P_inside_rev	MA2	GCGGAATTCTCCCTTCTTCG
LAC4_inside_2f	MA5	GGCTGATATTCGCCAGTAAG

Tabelle 9: Primer für die DNA-Sequenzierung

Bezeichnung	Nr.	Sequenz (5' → 3')
LAC4-P_Klp3_seq	MA63	TTAGGAAAGAGCAGAATTTG
PR8opt_Fw	OO134	TAGAAGATTCACCCCTGAAATCGCCG
T-TEF_Rv	OO57	TTCTGCGCACTTAACTTCGCATCTGG
Klp3_4032_fwd	MAB5	GGCGTTAGTATCGAATCGAC
H1_qrt_fwd	MA74	GGTTTCTGGACATCTGGAC
LAC4P-Klp_fw	VAK208	GCGGATAACAAGCTCAACACTTG
LAC4p_Fw	OO56	GAGACAAAAGCTGGAATTGTGAGCGG
oM1-fw	VAK273	GTGCTGTTACTACTGAAGTTGC

2.1.10 Antikörper

Tabelle 10: Primärantikörper

Bezeichnung	Spezifität	Wirtsspezies	Verdünnung	Referenz
CM1-1, WC00009	HA1 _{PR8}	Maus, mk	1:500	Coriell Institute for Medical Research
H37-66, WC00026	H1 _{PR8}	Maus, mk	1:512-1:131072	Coriell Institute for Medical Research
Nop1 (28F2)	ScNop1p	Maus, mk	1:5000	Santa Cruz Biotechnology
MCA401	M1 _{PR8}	Maus, mk	1:4000	AbD Serotec

mk: monoklonal; Sc.: *Saccharomyces cerevisiae*

Tabelle 11: Sekundärantikörper

Bezeichnung	Spezifität	Wirtsspezies	Verdünnung	Referenz
Goat anti-Mouse IgG (H+L), HRP	IgG	Maus, pk	1:4000	Thermo Fisher Scientific
Goat anti-Mouse IgG1, Alexa Fluor ⁵⁵⁵	IgG1	Maus, pk	1:250	
Donkey anti-Mouse IgG (H+L), IRDye800CW	IgG	Maus, pk	1:5000	LI-COR Biosciences

HRP: horseradish peroxidase; IR: infrared; pk: polyklonal

2.1.11 Nährmedien

2.1.11.1 Nährmedien für Hefen

Die verwendeten Hefestämme wurden bei 30 °C inkubiert und Flüssigkulturen bei 140 rpm schüttelnd inkubiert. Eine längerfristige Lagerung der Hefen erfolgte in Kryostocks bei -70 °C. Hierfür wurden 5 mL YPD-Flüssigmedium mit einer Einzelkolonie angeimpft, über Nacht inkubiert und 700 µL der Kultur in sterile Kryoröhrchen mit 300 µL 30 % Glycerol-Lösung überführt. Ausgehend von den Kryostocks wurden die Hefestämme auf YPD-Nähragarplatten ausplattiert, für 48 h bei 30 °C inkubiert und bei 4 °C gelagert. Die Stämme wurden in einem Intervall von zwei Wochen auf neue YPD-Platten

ausgestrichen. Vor dem Animpfen von Flüssigkulturen wurden die bei 4 °C gelagerten Hefestämme frisch auf YPD-Nähragarplatten ausgestrichen und für 48 h bei 30 °C oder für 72 h bei RT inkubiert. Für die Anzucht wurde Vollmedium (YP, *Yeast-extract, peptone*) und synthetisches Minimalmedium (S, *synthetic*) supplementiert mit den jeweils benötigten Aminosäuren und Nukleotiden verwendet.

YP-Medium: 1 % *Bacto yeast extract* (w/v); 2 % Pepton (w/v)

S-Medium: 0,67 % *Yeast nitrogen base without amino acids* (w/v)

Kohlenstoffquelle: 2 % Glucose (D, Dextrose; w/v), 2% Lactose (L; w/v)

Zusätze: 20 µg/mL Uracil (Ura); 20 µg/mL Methionin (Met); 0,2 % *Casaamino acids*; 2 % Agar-Agar (w/v); 40 µg/mL X-Gal

2.1.11.2 Nährmedien für Bakterien

Die verwendeten Bakterienkulturen wurden bei 37 °C inkubiert und Flüssigkulturen bei 140 rpm schüttelnd inkubiert. Für die Anzucht wurde Vollmedium (LB, *lysogeny broth*) nach MILLER (1972) verwendet [112].

LB- Medium: 1 % Trypton (w/v); 0,5 % *Bacto yeast extract* (w/v); 0,5 % NaCl (w/v)

Zusätze: 2 % Agar-Agar (w/v)

Um Bakterienstämme mit Ampicillin-Resistenz zu selektieren, wurde das zuvor autoklavierte Medium mit dem Antibiotikum versetzt. Die verwendete Stammlösung und Endkonzentration im Medium sind der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 12: Antibiotikum mit Stammlösung und Endkonzentration im Medium

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/mL 50 % Ethanol	100 µg/mL

Für die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien zum Zwecke der Transformation, wurde das Komplexmedium *super optimal broth* (SOB) verwendet. Das Medium wurde vor der Verwendung autoklaviert. Die Zusammensetzung des Mediums ist nachfolgend aufgelistet.

SOB-Medium: 2 % Trypton (w/v); 0,5 % *Bacto yeast extract* (w/v); 10 mM MgCl₂; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl

2.1.11.3 Nährmedien für die Zellkultur

Sofern im Text nicht anders vermerkt, wurden alle Medien für die Zellkultur vor der Verwendung im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die nachfolgenden Medien wurden für die Kultivierung von MDCK-Zellen verwendet.

MEM Medium

1x *Minimal essential medium-Earle's salts & L-glutamine* (Gibco)

Zusätze: 10 % fötales Kälberserum (v/v) (PAN-Biotech, Aidenbach); 100 U/mL Penicillin (Gibco); 100 µg/mL Streptomycin (Gibco); 2 mM L-Glutamin

2x overlay-Medium

Es wurde 1x MEM mit 0,04 M Hepes; 4 mM L-Glutamin; 0,15 % NaHCO₃-Lösung (v/v); 200 U/mL Penicillin und 200 µg/mL Streptomycin versetzt. Das Medium wurde zur Herstellung des Avicel-*overlay*-Mediums verwendet und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Avicel-*overlay*-Medium

Es wurde eine 2,4 % Avicel-Lösung 1:1 mit dem 2x *overlay*-Medium gemischt. Das Medium diente zur Überschichtung von MDCK-Zellen nach erfolgter Virusinfektion, um die Virusausbreitung zu verhindern. Vor der Verwendung wurde dem Medium frisch 1 µg/mL TPCK-Trypsin zugesetzt. Trypsin wird für die Spaltung / Aktivierung von HA und eine erfolgreiche Replikation des Virus benötigt.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Arbeiten mit DNA

2.2.1.1 Klonierung

Um DNA-Sequenzen zu modifizieren wurde das DNA-Fragment gewünschter Größe mit Restriktionsendonukleasen aus einem Ausgangsvektor ausgeschnitten (siehe 2.2.1.3), oder unter Verwendung Gen-spezifischer Primer aus dem Vektor durch Polymerase-Kettenreaktion (siehe 2.2.1.2) amplifiziert. Das über Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigte DNA-Fragment (siehe 2.2.1.5) wurde über kompatible Restriktionsschnittstellen anschließend in den zuvor linearisierten Zielvektor ligiert (siehe 2.2.1.6) und zur Amplifikation in *E. coli*-Zellen transformiert (siehe 2.2.1.7). Synthetische Gene wurden von GeneScript (Piscataway, USA) hergestellt und in einem

Ausgangsvektor zur Verfügung gestellt. Für die gleichzeitige Insertion mehrerer DNA-Fragmente wurde das *In-Fusion HD Cloning Kit* (Clontech) den Herstellerangaben entsprechend verwendet. Für die DNA-Sequenzanalysen wurde die Software SnapGene 2.1 und Clone Manager 9 verwendet.

2.2.1.2 Polymerase chain reaction (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion kam analytisch und präparativ zum Einsatz. Es wurde die *Taq*-Polymerase (*FastStart PCR Master* (Roche)) oder die *Phusion*-Polymerase (*High-Fidelity PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific)) verwendet. Der Standard-Reaktionsansatz für sämtliche PCRs setzte sich wie folgt zusammen:

	<u>Stammlösung</u>	<u>finale Konzentration</u>
<i>Taq</i> - oder <i>Phusion</i> -Mastermix	2x	1x
Primer (<i>forward</i> und <i>reverse</i>)	10 µM	0,5 µM
Templat	-	10-100 ng
H ₂ O _{dd}	-	ad 20 oder 50 µL

Verwendetes Temperaturprogramm für PCR:

	<u><i>Taq</i>-Polymerase</u>	<u><i>Phusion</i>-Polymerase</u>
1. Hot Start	95 °C, 5 min	-
2. initiale Denaturierung	95 °C	98 °C
3. Denaturierung	95 °C, 30 s	95 °C, 10 s
4. <i>annealing</i>	56-62 °C, 30 s	56-65 °C, 30 s
5. <i>extension</i>	72 °C (30 s/1 kb)	72 °C (30 s/1 kb)
	Schritt 3-5: 30-37 Zyklen	Schritt 3-5: 37 Zyklen
6. finale <i>extension</i>	72 °C, 10 min	72 °C, 10 min
Ende	10 °C	10 °C

2.2.1.3 Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die analytische und präparative Restriktion von DNA erfolgte unter Verwendung kommerziell verfügbarer Enzyme. Reaktionsansätze wurden den Herstellerangaben entsprechend unter Verwendung der mitgelieferten Puffer angesetzt. Die verwendeten Enzyme sind in Tabelle 3 aufgelistet.

2.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Für analytische bzw. präparative Zwecke wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Der Anteil an Agarose variierte je nach Fragmentgröße zwischen 0,8-2 %.

Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V. Eine entsprechende Menge Agarose wurde in TAE-Puffer in der Hitze gelöst. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit dem DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Puffer 6x *EZ-Vision DNA Dye & buffer* (Amresco, Solon, USA) versetzt, Endkonzentration 1x. Als Größenstandard wurde der *GeneRuler DNA-Ladder Mix* (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Nach der Auftrennung erfolgte der Nachweis der DNA mit UV-Licht (Gel Doc XR⁺ Dokumentations-System, Bio Rad) und der Software Image Lab (Bio Rad). Bei präparativen Auftrennungen wurde anschließend eine Isolation der Bande aus dem Gel und Elution der DNA durchgeführt (siehe 2.2.1.5).

2.2.1.5 Isolation von DNA aus Agarosegelen

Nach präparativer Agarose-Gelelektrophorese wurden DNA-Fragmente spezifischer Größe aus dem Gel isoliert und unter Verwendung des *Zymoclean Gel DNA Recovery Kits* (Zymo Research) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die DNA-Konzentration wurde spektrometrisch durch die Absorption bei 260 nm bestimmt (A_{260}). Als Spektrophotometer diente das NanoPhotometer (Implen). Es wurde angenommen, dass eine A_{260} von 1,0 etwa 50 µg/mL DNA entspricht. Zusätzlich wurde der Quotient A_{260} / A_{280} bestimmt, der eine Abschätzung über Verunreinigungen mit Proteinen (Quotient < 1,7) in der Präparation ermöglicht.

2.2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen wurden in einem molaren Verhältnis von Insert (DNA-Fragment) und Vektor 3:1 in einem Gesamtvolumen von 20 µL unter Verwendung der T4-DNA-Ligase und Ligationspuffer (beides Thermo Fisher Scientific, siehe Tabelle 3) den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt.

2.2.1.7 Transformation von *E. coli*

Kompetente *E. coli* wurden mit Calciumchlorid hergestellt. 100 mL frisches SOB-Medium wurde mit einer OD_{600} von 0,02 aus einer 3 mL Übernachtskultur der *E. coli* TOP10-Zellen angeimpft und für 10 h bei 37 °C inkubiert. Die Hauptkultur wurde in 100 mL frischem SOB-Medium mit einer OD_{600} von 0,002 aus der Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,4-0,5 bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 1500 g, 4 °C) und das Pellet in 30 mL eiskaltem TFB I-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert und die Zellen anschließend erneut zentrifugiert (5 min, 3000 g, 4 °C). Das Pellet wurde in 4 mL TFB II-Puffer gelöst und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in vorgekühlte 1,5 mL-Gefäße

zu 150 µL aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert.

Für die Transformation der kompetenten *E. coli* TOP10-Zellen wurde ein Aliquot der Zellen mit der entsprechenden Plasmid-DNA (1 µL) gemischt, für 20 min auf Eis belassen und danach einem Hitzeschock unterzogen (45 s, 42 °C). Nach einer weiteren Inkubation auf Eis für 2 min wurde die Suspension mit 200 µL frischem LB-Medium versetzt. Es folgte eine Regenerationsphase der Zellen für 1 h schüttelnd bei 37 °C. Eine geeignete Menge der transformierten Zellen wurde auf Selektionsmedium (LB-Nähragarplatten mit Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Transformation im Zuge der *In-Fusion*-Klonierung erfolgte unter Verwendung des mitgelieferten Mediums und der beigefügten kompetenten *E. coli* HST08-Zellen den Herstellerangaben entsprechend.

2.2.1.8 Plasmid isolation aus *E. coli* (Miniplasmidpräparation)

Um Plasmide zu präparieren, die zur Weiterbehandlung mit Restriktionsendonukleasen bestimmt waren oder als Templat für die PCR dienen sollten, wurde eine Plasmid isolation durchgeführt. Die Anzucht der entsprechenden *E. coli*-Zellen erfolgte über Nacht in 5 mL mit Ampicillin versetztem LB-Medium, das mit einer Einzelkolonie der Zellen angeimpft wurde. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 1500 g, RT) geerntet. Für die Isolation der Plasmid-DNA wurde das *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Fisher Scientific) den Herstellerangaben entsprechend verwendet. Die DNA-Konzentration wurde mit dem NanoPhotometer (Implen) bestimmt. Die Lagerung der Plasmide erfolgte bei -20 °C.

2.2.1.9 DNA-Sequenzierung

Nach Konstruktion von Plasmiden mit neu integriertem DNA-Insert wurde das entsprechende DNA-Fragment unter Verwendung spezifischer Primer aus dem Plasmid amplifiziert und anschließend sequenziert. Für die Sequenzierung wurde das *BigDye Terminator v1.1. Cycle Sequencing Kit* (Thermo Fisher Scientific) den Herstellerangaben entsprechend verwendet. Die Amplifikation und Markierung der DNA erfolgte in einer PCR. Der Standardansatz ist nachfolgend aufgeführt.

	<u>Stammlösung</u>	<u>finale Konzentration im Ansatz</u>
<i>Ready Reaction Premix</i>	2,5x	1x
<i>BigDye Sequencing Buffer</i>	5x	1x
Primer (<i>forward</i> und <i>reverse</i>)	2 µM	4 µM
Templat	-	500 ng
H ₂ O _{dd}	-	ad 20 µL

Verwendetes Temperaturprogramm für PCR:

1. initiale Denaturierung	95 °C, 5 min
2. Denaturierung	95 °C, 45 s
3. <i>annealing</i>	56 °C, 45 s
4. <i>extension</i>	60 °C, 4 min
	Schritt 2-4: 40x Zyklen
Ende	10 °C

Nach erfolgter PCR wurde die DNA gefällt. Hierzu wurde der komplette PCR-Ansatz mit 100 µL H₂O_{dd} versetzt und in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 10 µL 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) und 250 µL 96 % Ethanol wurde die DNA ausgefällt und durch Zentrifugation (20 min, 17900 g, RT) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde getrocknet und die Sequenz im 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) analysiert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der Software CloneManager 9 ausgewertet.

2.2.1.10 Transformation von *K. lactis*

Für die Transformation von *K. lactis* wurde ein Protokoll nach AKADA (2000) verwendet [1]. Für die Erstellung chemisch kompetenter Hefezellen wurde eine 50 mL YPD-Kultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 (entspricht etwa $1,4 \times 10^7$ Zellen pro mL) bei 30 °C kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 3200 g, 4 °C) geerntet und das Pellet in 2 mL PLAG-Lösung resuspendiert. Um die DNA-Ausbeute zu erhöhen und deren Bindung an die Membran zu verhindern, wurde die Suspension mit 2,5 mg RNA, extrahiert aus *E. coli* TOP10, versetzt. Die Suspension wurde zu 200 µL aliquotiert und die Zellen bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert.

Für die genomische Integration von DNA-Fragmenten in den *lac4::ScURA3*-Locus wurden 5 µg linearisierte Plasmid-DNA (siehe 2.2.1.3) zu den noch gefrorenen

Hefezellen gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 45 min bei 37 °C und 450 rpm schüttelnd inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 20 min bei 42 °C, um die Transformationseffizienz zu erhöhen. Zur Regeneration wurden die Hefezellen auf YPD-Nähragarplatten über Nacht (16 h) kultiviert und am Folgetag auf Selektionsmedium ausplattiert. Für die genomische Insertion von DNA-Fragmenten in den *URA3*-Locus wurde der Transformationsansatz auf SD-Nähragarplatten, supplementiert mit 0,2 % *Casaamino acids* ausplattiert. Die jeweiligen Selektionsplatten wurden für 48-72 h bei 30 °C inkubiert.

2.2.1.11 Schnellisolation genomischer DNA aus Hefezellen

Um genomische DNA aus *K. lactis* für analytische Zwecke zu isolieren, wurde ein Protokoll von LÖOKE (2011) verwendet [94]. Hierfür wurde eine Einzelkolonie in 100 µL LiOAc / SDS-Lösung gelöst und für 5 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 300 µL 96 % Ethanol versetzt und für 3 min bei 15000 g zentrifugiert um Zelltrümmer zu pelletieren. Das Pellet wurde einmal mit 70 % Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 100 µL H₂O_{dd} resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (15 s, 15000 g) wurden 2 µL der Lösung als Templat in der PCR (siehe 2.2.1.2) eingesetzt.

2.2.2 Zellbiologische Arbeiten

2.2.2.1 Anzucht rekombinanter *K. lactis*

Standardprotokoll für die Anzucht von Impfstämmen

Für Immunisierungsstudien wurden die *K. lactis*-Stämme frisch auf YPD-Nähragarplatten ausgestrichen und für 48 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde eine 50 mL YPD-Vorkultur mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht (16 h) kultiviert. Eine zweite YPD-Vorkultur mit 100 mL wurde mit Zellen aus der ersten Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,7 angeimpft und für 10 h inkubiert. Eine 500 mL YPL-Hauptkultur wurde mit Zellen der zweiten Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,3 angeimpft und die Hefezellen für die gewünschte Zeit bei 30 °C induziert. Anschließend wurde die OD₆₀₀ bestimmt und die Hefe in sterilen Zentrifugenbechern unter Verwendung der Zentrifuge Avanti J-25 (Beckman Coulter) für 10 min bei 4 °C und 6300 g pelletiert. Das Pellet wurde mit sterilem H₂O_{dd} resuspendiert und in sterile, vorgewogene 50 mL-Reaktionsgefäße überführt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, 3700 g, 4 °C) unter Verwendung der Zentrifuge Allegra X-30R (Beckman Coulter) wurde die Biofeuchtmasse (BFM) bestimmt und das Hefepellet für 24 h bei -20 °C gelagert. Das gefrorene

Hefepellet wurde danach für 24 h in der Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH) und unter Verwendung der RC6 Vakuumpumpe (Vacuubrand) für 24 h lyophilisiert. Nach Zerstoßen des getrockneten Hefematerials in einem Mörser unter Verwendung eines Pistills wurde die Hefe für 2 h bei 90 °C inaktiviert und anschließend die Biotrockenmasse (BTM) bestimmt. Die Hefe wurde bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert und direkt als Impfstoff subkutan verwendet. Dieses Anzucht- und Inaktivierungsverfahren wird nachfolgend als „Standardprotokoll“ bezeichnet. Abweichungen oder Änderungen von diesem Protokoll sind an den entsprechenden Textstellen aufgeführt. Für die Chargenkontrolle wurden vor Beginn der Immunisierungstudie 30 OD-Einheiten der getrockneten BTM abgewogen, die Proteine extrahiert (siehe 2.2.3.1) und im Western-Blot die rekombinanten Proteine spezifisch nachgewiesen (siehe 2.2.3.3).

Sterilisation von *K. lactis* mit ionisierender Strahlung

Für die Gamma-Sterilisation wurde das Hefematerial in Polyethylenterephthalat-Röhrchen überführt und auf Trockeneis an die Firma Synergy Health Radeberg GmbH in Radeberg geliefert. Für den Sterilisationsprozess wurde eine Cobalt-60-Quelle verwendet. In Anlehnung an die pharmazeutischen Regeln der *European Pharmacopoeia* (Ph. Eur.) wurden Zieldosen von 25 kGy bzw. 50 kGy eingesetzt. Die Bestrahlung wurde auf Trockeneis (-78 °C) durchgeführt.

Herstellung von Hefezelllysat für Immunisierungen

Für die Erstellung eines Hefelysats zum Zwecke der Immunisierung wurden zwei Proben mit je 6,5 mg Hefe mit 300 µL sterilen Glasperlen (0,4-0,6 mm; Sartorius, Göttingen) in 650 µL sterilem PBS aufgeschlossen. Dies entsprach einer Hefekonzentration von 10 mg/mL. Der Aufschluss wurde wie unter 2.2.3.1 durchgeführt. Von jeder Probe wurden 300 µL abgenommen und vereinigt. Davon wurden 300 µL mit 1200 µL sterilem PBS versetzt ($c = 2 \text{ mg/mL}$) und unmittelbar für die Immunisierung verwendet (siehe 2.2.5.2).

2.2.2.2 Indirekte Immunfluoreszenz von Hefen

Die Immunfluoreszenz diente der Lokalisation von Fremdprotein in der Hefezelle. Hierfür wurde eine YPL-Hauptkultur in einem Volumen von 5 mL auf eine OD_{600} von 0,01 angeimpft und für 12 h inkubiert. Am Folgetag wurden 2 OD-Einheiten der Kultur für 2 min bei 3200 g geerntet. Zur Fixierung der Proteine und Aufrechterhaltung der

Zellstruktur wurde das Pellet in 1 mL sterilem H_2O_{dd} resuspendiert und im 50 mL-Reaktionsgefäß in einer 5 % Formaldehyd-Lösung für 3 h bei 30 °C schüttelnd fixiert. Anschließend wurden die Zellen für 1 min bei 3200 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde einmal mit 1 M Sorbitol-Puffer gewaschen (1 min, 3200 g). Die Glucane der Zellwand wurden in 1 M Sorbitol-Puffer mit 100 µg/mL Zymolyase für 30 min bei 37 °C hydrolysiert und die Protoplasten pelletiert (1 min, 3200 g). Für die Permeabilisierung der Protoplasten wurden diese in 1 mL 1 M Sorbitol-Puffer mit 0,1 % Triton X-100 resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach zwei Waschschritten (1 min bei 3200 g) wurden die Protoplasten in 1 mL 1 M Sorbitol-Puffer resuspendiert und 10 µL der Suspension auf 0,1 % Poly-L-Lysin (w/v) beschichteten Objektträgern fixiert. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, wurden die Protoplasten nach drei Waschschritten mit PBS, mit 10 µL Blockierlösung (3 % BSA in PBST) versetzt und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Protoplasten mit 10 µL des α -HA1_{PR8}-Primärantikörpers (CM1-1) 1:25 in Blockierlösung über Nacht (16 h) bei 4 °C inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit PBST erfolgte die Inkubation mit 10 µL des Sekundärantikörpers (*Goat anti-Mouse IgG1*, Alexa Fluor⁵⁵⁵) 1:250 verdünnt in Blockierlösung für 90 min bei RT. Anschließend wurde der Objektträger viermal mit PBST gewaschen. Um das restliche Tween 20 und das PBS von den Protoplasten zu entfernen, wurden die Objektträger anschließend dreimal mit H_2O_{dd} gewaschen. Die Anfärbung der Zellkerne mit DAPI und die Fixierung der Protoplasten erfolgte mit 4 µL *ProLong Gold antifade* Reagens (Invitrogen, Carlsbad, USA). Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten am Axiovert 200M Fluoreszenzmikroskop mit der AxioCam MRm Kamera und der Imaging Software AxioVison (Carl Zeiss).

2.2.2.3 Tropfentest

Für Wachstumsanalysen von Hefestämmen wurde ein Tropfentest durchgeführt. Hierfür wurden die Hefestämme zunächst auf YPD-Nähragarplatten ausgestrichen und für 48 h inkubiert. Anschließend wurde das Zellmaterial in 1 mL sterilem H_2O_{dd} auf 1 OD-Einheit pro mL verdünnt und 200 µL der Zellsuspension jeweils in ein *well* einer 96-*well*-Mikrotiterplatte überführt. Davon ausgehend wurde eine serielle 1:10 Verdünnungsreihe (10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4}) erstellt und 2 µL der Hefe-Zellsuspension auf YPD / L- oder Methionin- und Uracil-supplementierte SD / L-Nähragarplatten getropft. Die Platten wurden anschließend für zwei Tage bei 30 °C kultiviert.

2.2.2.4 Kultivierung von MDCK-Zellen

Die zu kultivierenden *Madin-Darby canine kidney* (MDCK)-Zellen wurden zweimal in sieben Tagen 1:10 oder 1:12 verdünnt in 10 cm Kulturschalen passagiert. Hierfür wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, anschließend mit 1 ml 0,25 % EDTA-Trypsin überschichtet und die Zellen im CO₂-Inkubator (nachfolgend als Brutschrank bezeichnet) bei 37 °C, 5 % CO₂ und ca. 90 % Luftfeuchte für 10 min inkubiert. Die Zellen wurden in 5 mL 1x MEM mit Zusätzen (siehe 2.1.11.3) aufgenommen und in der gewünschten Verdünnung auf neue 10 cm Kulturschalen ausgesät.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Isolation von Gesamtprotein aus *K. lactis*

Um Totalprotein aus Hefezellen für sich anschließende Analysen im Western-Blot zu isolieren, wurden 30 OD-Einheiten einer YPL-Flüssigkultur pelletiert (5 min, 3200 g, 4 °C) oder nach erfolgter Gefriertrocknung und Hitzeinaktivierung von dem getrockneten Hefematerial abgewogen. Die Berechnung der abzuwiegenden Hefemenge erfolgte unter Verwendung der nachstehenden Formeln.

$$(1) \text{ ODE}_{\text{HK}} = \text{OD}_{600} \text{ der HK} \cdot V_{\text{HK}}$$

$$(2) \text{ Hefe (g)} = \frac{(\text{BTM (g)} \cdot 30 \text{ ODE})}{\text{ODE}_{\text{HK}}}$$

BTM; Biotrockenmasse; HK: Hauptkultur; ODE: optische Dichte (Einheiten); V: Volumen

Das Hefematerial wurde in 400 µL B60-Puffer resuspendiert und mit 300 µL Glasperlen (0,4-0,6 mm; Sartorius) versetzt. Das Gemisch wurde viermal für 3 min im Multi-Pulse-Vortexer (Glas-Col) bei maximaler Stufe aufgeschlossen und zwischen jedem Aufschluss für 5 min auf Eis abgekühlt. Danach wurden 200 µL der Suspension zentrifugiert (20 min, 18000 g, 4 °C). 100 µL des Überstandes wurden abgenommen (lösliche Proteinfraction) und das Pellet (unlösliche Proteinfraction) in 200 µL B60-Puffer resuspendiert. Die quantitative Bestimmung des Totalproteins in der löslichen Fraktion erfolgte nach der Methode von BRADFORD (1976) [16]. Hierfür wurde das *Protein Assay Dye Reagent-Konzentrat* (Bio-Rad) den Herstellerangaben entsprechend verwendet und die Kalibrierung mit dem Standardprotein BSA durchgeführt. Die Messung der Proben erfolgte am DU-640 Spectrophotometer (Beckman Coulter). Beide Proteinfractionen wurden mit Probenpuffer versetzt (Endkonzentration 1x) und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.3.2 *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)*

Zur analytischen Auftrennung von Proteinen wurde ein diskontinuierliches und denaturierendes System nach Protokoll von LAEMMLI (1970) verwendet [84]. Für die Elektrophorese wurden die im reduzierenden Probenpuffer gelösten Proben vor dem Beladen des Gels für 5 min bei 95 °C erhitzt und 2 min auf Eis gestellt.

<u>Sammelgel</u>	<u>Trenngel</u>
250 mM Tris / HCl pH 6,8	750 mM Tris / HCl pH 8,8
0,2 % (w/v) SDS	0,2 % (w/v) SDS
5 % (v/v) Acrylamid:Bisacrylamid (37,5:1)	10-12 % (v/v) Acrylamid:Bisacrylamid (37,5:1)
0,02 % (v/v) APS	0,25 % (v/v) APS
0,1 % (v/v) TEMED	0,1 % (v/v) TEMED

Als Größenstandart wurde der *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Auftrennung erfolgte für 1 h bei konstanter Spannung von 200 V.

2.2.3.3 *Western-Blot-Analyse*

Die zuvor in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine (Antigene) wurden auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm (Immobilon-P, Merck Millipore, Billerica, USA) transferiert und spezifisch über Markierung mit Immunglobulinen (Antikörpern) nachgewiesen. Für das Blotting der Proteine wurde das SDS-Gel zusammen mit der Membran und Blottingpapier (Heinemann Labortechnik, Duderstadt) in eine Gelhalterkassette gespannt und in eine mit Transferpuffer gefüllte *Mini Trans-Blot Cell* Apparatur (Bio-Rad) überführt. Der Proteintransfer erfolgte für 1-2 h bei konstanter Spannung von 110 V bei 4 °C. Um freie Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurde selbige über Nacht in Blockierlösung (3 % BSA (w/v), 5 % Milchpulver (w/v) in TBST) bei 4 °C leicht schwenkend inkubiert. Für die Markierung der Proteine mit spezifischen Primärantikörpern wurde die Membran in Blockierlösung mit den Antigen-spezifischen Antikörpern in der entsprechenden Verdünnung (Tabelle 10) für 2 h bei RT leicht schwenkend inkubiert. Anschließend wurden die ungebundenen Immunglobuline durch vier Waschschrinen mit 1x TBST entfernt. Um den an das spezifische Protein gebundenen Primärantikörper zu detektieren, wurde die Membran in Blockierlösung mit dem entsprechenden Sekundärantikörper in der jeweiligen Verdünnung (Tabelle 11) für 1 h bei RT leicht schwenkend inkubiert. Anschließend

wurde die Membran viermal mit 1x TBST gewaschen, um überschüssige Immunglobuline zu entfernen. Um evtl. auftretende Hintergrundsignale durch das Detergens Tween 20 zu reduzieren, wurde die Membran in einem weiteren Waschschrift mit 1x TBS inkubiert. Die Membran wurde getrocknet und anschließend im Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences) analysiert. Für Analysen, die eine sensitivere Nachweismethode erforderten, wurde die noch feuchte Membran mit dem *ECL Prime Western Blotting Detection Reagens* (GE Healthcare) inkubiert und die Signale anschließend durch Auflegen eines Röntgenfilms (CEA RP *New Medical X-Ray screen*, Agfa Health Care, Mortsel, Belgien) und anschließender Inkubation in Entwickler- und Fixier-Lösung (Carestream Kodak GBX, Sigma-Aldrich) detektiert. Zur Visualisierung der durch SDS-PAGE aufgetrennten und anschließend durch Western-Blot auf die Membran übertragenen Proteine, wurde die Membran für 10 min in Ponceau S-Lösung leicht schwenkend inkubiert und der Hintergrund anschließend durch Inkubation in H₂O_{dd} ausreichend entfärbt.

2.2.3.4 Semiquantitative Analyse der H1-Konzentration im Zellysats von *K. lactis*

Die H1-Konzentration in der löslichen und unlöslichen Proteinfraction des Hefezellysats wurde durch densitometrische Analyse der Signalintensität von H1-spezifischen Banden im Western-Blot ermittelt. Hierfür wurden 30 OD-Einheiten der lyophilisierten und hitzeinaktivierten Hefe nach dem unter 2.2.3.1 beschriebenen Protokoll aufgeschlossen und die Proteine in einer SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 2.2.3.2). Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran und der spezifischen Immunmarkierung von H1 (siehe 2.2.3.3) wurden die Fluoreszenz-Signale mit dem Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences) detektiert. Die relative Intensität der Bandensignale (integrale Peakflächen) wurde unter Verwendung der Software ImageJ nach Protokoll des Herstellers ermittelt. Die H1-Konzentration wurde anhand der mitgeführten Verdünnungsreihe des H1-Standards (aa 1-528; Sino Biological Inc., Peking, China) mit bekannter Proteinkonzentration indirekt bestimmt (**Abb. 10**). Die H1-Konzentration pro mg Hefe wurde anhand der nachfolgenden Gleichungen berechnet.

$$(3) \text{ ODE}_{\text{HK}} = \text{OD}_{600} \cdot V_{\text{HK}}$$

$$(4) \text{ ODE pro mg Hefe} = \frac{\text{ODE}_{\text{HK}} \cdot 1 \text{ mg}}{\text{BTM (mg)}}$$

$$(5) \mu\text{g H1 pro mg Hefe} = \frac{(\text{ODE pro mg Hefe} \cdot \mu\text{g H1 pro ODE})}{1 \text{ mg}}$$

BTM: Biotrockenmasse; HK: Hauptkultur; ODE: optische Dichte (Einheiten); V: Volumen

2.2.3.5 Induktionskinetik rekombinanter *K. lactis*-Stämme

Zur Analyse der Fremdproteinsynthese nach Beginn der Geninduktion mit Lactose wurde eine Induktionskinetik durchgeführt. Hierfür wurden 40 mL frisches YPD-Medium mit einer OD₆₀₀ von 0,7 aus einer 20 mL Übernachtkultur der Hefestämme angeimpft und für 12 h bei 30 °C inkubiert. Ausgehend von dieser zweiten Vorkultur wurde die erste YPL-Hauptkultur (300 mL) mit einer OD₆₀₀ von 0,3 angeimpft. Die OD₆₀₀ wurde nach 10 h, 12 h und 15 h mit dem DU-640 Spectrophotometer (Beckman Coulter) gemessen und 30 OD-Einheiten der Kulturen zu den genannten Zeitpunkten geerntet (5 min, 3200 g, 4 °C). Ebenfalls ausgehend von der zweiten Vorkultur wurden 40 mL frisches YPD-Medium mit einer OD₆₀₀ von 0,7 angeimpft und für 12 h bei 30 °C über Nacht inkubiert. Ausgehend von dieser dritten Vorkultur wurden die zweite (3 h, 6 h, 8 h) und dritte (24 h) YPL-Hauptkultur mit einer OD₆₀₀ von 0,3 angeimpft. Zu den aufgeführten Zeitpunkten wurde die OD₆₀₀ bestimmt und 30 OD-Einheiten geerntet (5 min, 3200 g, 4 °C). Die genommenen Kulturproben wurden, wie unter 2.2.3.1 beschrieben, aufgeschlossen und anschließend im Western-Blot untersucht.

2.2.3.6 Deglykosylierung von Hämagglutinin (HA)

Die Deglykosylierung des HA-Proteins erfolgte mit dem Enzym PNGase F und den mitgelieferten Puffern nach dem Protokoll des Herstellers (New England Biolabs GmbH). Es wurden 0,5 bzw. 30 OD-Einheiten einer Hefekultur geerntet (5 min bei 3200 g, 4 °C) und das Pellet nach einem Waschschrift mit H₂O_{dd} in 9 µL bzw. in 90 µL H₂O_{dd} aufgenommen. Zu der Suspension wurden 1 µL bzw. 10 µL Denaturierungspuffer gegeben und der Ansatz für 10 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden folgende Reagenzien zum Ansatz gegeben:

	<u>PNGase F</u>	<u>Kontrollansatz</u>
10x NP40-Puffer	2 µL (20 µL)	2 µL
10x G7-Reaktionspuffer	2 µL (20 µL)	2 µL
PNGase F	2 µL (5 µL)	-
H ₂ O _{dd}	<i>ad</i> 20 µL (200 µL)	<i>ad</i> 20 µL

Nach erfolgter Inkubation der Ansätze über Nacht bei 37 °C wurden diese mit Probenpuffer versetzt (Endkonzentration 1x) und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Analyse der Proben erfolgte wie unter 2.2.3.2 und 2.2.3.3 beschrieben. Es wurden 0,125 bzw. 7,5 OD-Einheiten des Reaktionsansatzes analysiert.

2.2.4 Arbeiten mit dem Influenza-A-Virus

Für die Infektionsversuche wurde ein Virusstock von Influenza A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. Thorsten Wolff vom Robert Koch-Institut in Berlin, verwendet. Das Virus wurde bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.4.1 Bestimmung des Virustiters mit Avicel-Plaque-Test

Um die Konzentration von Influenza-A-Viruspartikeln für die Durchführung des Virusneutralisationstests sowie für die Belastungsinfektion in BALB/c Mäusen zu ermitteln, wurde unmittelbar vor Beginn einer Versuchsreihe ein Avicel-Plaque-Test durchgeführt. Der dabei bestimmte Titer wird mit der Einheit Plaque bildende Einheiten (PFU, *plaque forming units*) angegeben, da der Nachweis infektiöser Partikel über die entstehenden Lysishöfe in einem konfluenten Zellrasen („Plaques“) erfolgt. Dabei kommt es aufgrund des zytopathischen Effekts (*cytopathic effect*, CPE) des Influenzavirus nach Infektion zur Lyse der infizierten Zellen. Freigesetzte Viruspartikel dringen in angrenzende Zellen ein, wodurch diese ebenfalls lysieren und sich das Virus weiter ausbreitet. Das Testsystem wurde basierend auf der von MATROSOVICH (2006) beschriebenen Methode entwickelt [102]. Für den Test wurden MDCK-Zellen am Vortag 1:4 verdünnt auf 12- bzw. 24-*well*-Mikrotiterplatten ausgesät, um am Folgetag etwa 95 % Konfluenz zu erhalten. Von der zu untersuchenden Viruslösung wurden abhängig vom Untersuchungsschwerpunkt unterschiedliche Verdünnungsreihen in MEM-Medium mit TPCK behandeltem Trypsin (Endkonzentration: 1 µg/mL) erstellt. Für die Bestimmung des Virustiters eines verwendeten Virusstocks wurde eine serielle 1:10 Verdünnungsreihe (10^{-1} - 10^{-10}) erstellt. Für die Bestimmung der Viruskonzentration in der für die Belastungsinfektion verwendeten Viruslösung (Rücktitration) wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe (1:2-1:4096) erstellt. Je 100 µL der Verdünnung wurden pro *well* als Inokulum verwendet. Die Platten wurden vorsichtig geschwenkt und für 1 h im Brutschrank inkubiert. Um eine gleichmäßige Verteilung der Viruspartikel im *well* zu begünstigen, wurden die Platten alle 15 min vorsichtig geschwenkt. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und danach mit 1 mL Avicel-*overlay*-Medium überschichtet, um die Diffusion von Viruspartikeln in der Lösung zu verhindern. Die Inkubation erfolgte für weitere 48 h im Brutschrank. Danach wurde das Avicel-*overlay*-Medium abgenommen und Avicel-Reste vorsichtig mit PBS von den Zellen gespült. Durch Zugabe von eiskaltem Aceton-Methanol-Gemisch (60:40) wurden die Zellen für 10 min fixiert und anschließend mit Kristallviolett für 10 min angefärbt.

Rückstände der Färbelösung wurden durch zweimaliges Waschen der Zellen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ entfernt. Die Plaques wurden ausgezählt und der Virustiter in PFU pro mL unter Verwendung der Formel 6 berechnet. Unter Verwendung der Formel 7 wurden die PFU pro g Lunge im Überstand von mechanisch homogenisiertem Lungengewebe (siehe 2.2.5.6) berechnet und als \log_{10} im Balkendiagramm angegeben. Aufgrund der logarithmischen Auftragung wurde den Proben, in denen keine Viren durch Plaque-Formierung nachgewiesen werden konnten, der Wert $\log_{10}(2) = 0,3$ zugeordnet. Unter Verwendung des *Student's t-Test* wurden die Daten auf Signifikanz überprüft (siehe 2.2.4.2).

$$(6) \text{ PFU pro mL} = \frac{\text{Anzahl Plaques}}{\text{Verdünnungsstufe} \cdot \text{Volumen Viruslösung pro well (mL)}}$$

$$(7) \text{ PFU pro g Lunge} = \text{PFU pro mL} \cdot \frac{\text{Endvolumen Kulturüberstand Lunge (mL)}}{\text{Masse Lunge (g)}}$$

2.2.4.2 Bestimmung des Antikörpertiters mit Virusneutralisationstest

Für den Virusneutralisationstest (VNT) wurde eine Variante des Avicel-Plaque-Tests verwendet. Dabei wird eine definierte Anzahl an Viruspartikeln mit dem Antiserum inkubiert. Im Antiserum enthaltene Virus-spezifische Antikörper binden an das Viruspartikel und inhibieren die Anheftung des Virus an die Wirtszelle. Das Virus wird neutralisiert und kann daher die Wirtszelle nicht infizieren bzw. replizieren. In der Folge reduziert sich die Plaque-Anzahl abhängig von der Antikörperkonzentration. Die Konzentration an Virus-neutralisierenden Antikörpern (nAK) wird durch Titration des Antiserums bestimmt. Die Konzentration, bei der die Antigenbindung auf 50 % des Maximalwertes abfällt, wird als Titer des Antiserums bezeichnet und ist definiert als Serumverdünnung, bei welcher die Anzahl der Plaques im Vergleich zur Antiserum-freien, Virus-infizierten Kontrolle noch um 50 % reduziert werden kann (nAK-Titer₅₀). Für den VNT wurden MDCK-Zellen am Vortag 1:4 verdünnt auf 24-well-Mikrotiterplatten ausgesät. Der ca. 95 % konfluente Zellrasen wurde am Folgetag mit dem Serum-Virus-Gemisch überschichtet. Hierfür wurden die Seren zunächst in einer 96-well-Mikrotiterplatte seriell 1:2 (1:2-1:65536) in 25 μL MEM-Medium mit TPCK behandeltem Trypsin (MEM / TPCK-Trypsin) verdünnt. Anschließend wurden 25 μL einer zuvor erstellten Virussuspension mit definierter Konzentration an Viruspartikeln (60 PFU pro 25 μL MEM / TPCK-Trypsin) zu jeder Verdünnungsstufe zugesetzt. Die Platten wurden vorsichtig geschwenkt und für 1 h im Brutschrank inkubiert. Die am Vortag ausgesäten MDCK-Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, mit dem Serum-Virus-Gemisch in

finaler Verdünnung von 1:4-1:131072 überschichtet und die Platten nach vorsichtigem Schwenken im Brutschrank für 1 h inkubiert. Um die Verteilung der Viruspartikel im *well* zu begünstigen, wurden die Platten in einem Intervall von 15 min vorsichtig geschwenkt. Als absolute Negativkontrolle wurden scheininfizierte Zellen mitgeführt, welche anstelle mit Virus nur mit PBS inkubiert wurden. Als Infektionskontrolle dienten Serum-unbehandelte Zellen, welche mit der Virussuspension infiziert wurden. Als absolute Positivkontrolle für Virus-nAK diente der α -H1_{PR8} Antikörper (H37-66, Coriell Institute for Medical Research), welcher ebenfalls seriell 1:2 verdünnt wurde. Des Weiteren wurde in jedem Test eine Probe mitgeführt, welcher nur Serum ohne Virus zugesetzt wurde. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass im Serum selbst keine Viruspartikel enthalten sind. Durch eine Rücktitration der eingesetzten Virussuspension sollten die tatsächlich eingesetzten PFU pro *well* bestimmt werden, daher wurde diese in jedem Test separat als Doppelbestimmung mitgeführt. Hierfür wurden 400 μ L der Virussuspension (960 PFU) seriell 1:2 in MEM / TPCK-Trypsin verdünnt und jeweils 400 μ L als Inokulum verwendet. Nach erfolgter Inkubation wurde das Serum-Virus-Gemisch von den MDCK-Zellen entfernt und diese erneut einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 mL Avicel-*overlay*-Medium überschichtet und für weitere 48 h im Brutschrank inkubiert. Die Fixierung und Färbung der Zellen erfolgte wie unter 2.2.4.1 beschrieben. Anschließend wurden die Plaques in den *wells* ausgezählt und die prozentuale Neutralisation unter Verwendung der Formel 8 [20] berechnet.

$$(8) \text{ prozentuale Neutralisation} = \left(1 - \frac{\text{prozentuale Infektion}}{\text{prozentuale Infektion in Kontrolle}} \right) \cdot 100\%$$

Der nAK-Titer₅₀ wurde unter Verwendung der Werte für die prozentuale Neutralisation und der Software KaleidaGraph 4.1 berechnet und als \log_2 der entsprechenden Serumverdünnung im Dot-Blot-Diagramm angegeben. Aufgrund der logarithmischen Auftragung wurde Serumproben ohne nachweisbare nAK der Wert $\log_2(2) = 1$ zugeordnet. Unter Verwendung des *Student's t*-Test wurden die Daten auf Signifikanz überprüft. Dabei ist $p \leq 0,05$ signifikant (*), $p \leq 0,01$ sehr signifikant (**) und $p \leq 0,001$ hoch signifikant (***).

2.2.4.3 Erstellung von zytoplasmatischem Extrakt aus MDCK-Zellen

Um H1-spezifische Antikörper in murinem Antiserum nachzuweisen, wurde zytoplasmatischer Extrakt von scheininfizierten und Virus-infizierten MDCK-Zellen als Antigen im Western-Blot verwendet. Für die Erstellung des Extrakts wurden MDCK-Zellen 1:2 verdünnt auf 10 cm-Kulturschalen ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen

einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 6×10^5 PFU Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1) in einem Volumen von 5 mL MEM / TPCK-Trypsin für 1 h infiziert. Für die Scheininfektion wurde dem Medium PBS anstelle von Virus zugesetzt. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, mit Avicel freiem *overlay*-Medium überschichtet und für weitere 48 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Überstand in ein 15 mL-Reaktionsgefäß überführt, der verbliebene Zellrasen einmal mit PBS gewaschen, die Zellen mit einem Zellkratzer von der Platte abgelöst und ebenfalls in das Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Zentrifugation (5 min, 1000 g, 4 °C) wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 500 µL PBS gelöst und in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min, 1000 g, 4°C) wurde der Überstand vollständig abgenommen und das Pellet in 100 µL eiskaltem Zellaufschlusspuffer gelöst. Durch leichtes Schnipsen des Reaktionsgefäßes wurde die Zellmembran zerstört und der Ansatz anschließend für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (2 min, 13500 g, 4 °C) wurde der Überstand (zytoplasmatischer Extrakt, zE) in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Die Konzentrationsbestimmung des Totalproteins in der löslichen Fraktion erfolgte nach der Methode von BRADFORD (1976) wie unter 2.2.3.1 beschrieben. Anschließend wurde der Extrakt mit Probenpuffer (Endkonzentration 1x) versetzt, für 10 min bei 95°C denaturiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.5 Tierexperimentelle Arbeiten

Die nachfolgend beschriebenen Infektionsversuche wurden entsprechend der Sicherheitseinstufung des verwendeten Erregers (A/PR/8/34 (H1N1), Risikogruppe 2) nach GenTSV § 5 Absatz 6 und der TRBA 462 Arbeitnehmerschutzrichtlinie 2000/54/EG in der Versuchstierhaltung im Biozentrum durchgeführt. Die für die Durchführung notwendigen Maßnahmen wurden vom Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt, Fachbereich 2 / Hygiene abgenommen. Die experimentellen Arbeiten am lebenden Tier erfolgten mit Genehmigung des Landesverwaltungsamtes in Sachsen-Anhalt (Tierversuchsantrag: AZ:42502-2-1088MLU G) in Zusammenarbeit mit der Tierärztin Dr. Martina Behrens. Um unnötiges Leid zu vermeiden, wurden alle Eingriffe am Tier unter Verwendung einer effektgesteuerten Inhalationsnarkose mit 1,5 % Isofluran und 1 L Sauerstoff pro Minute durchgeführt.

2.2.5.1 Artgerechte Haltung von Versuchstieren

Verwendet wurden weibliche BALB/c-Mäuse (Charles River Laboratories, Wilmington, USA) im Alter von 9 Wochen bzw. 15 Wochen. Die Haltung der Tiere erfolgte in Käfigen

Typ III zu je (2-)5 Tieren pro Gruppe unter kontrollierten Bedingungen (22 °C, 55 % Luftfeuchte und Hell-Dunkel-Rhythmus mit künstlichem Licht von 12 h) nach Haltungsempfehlungen der GV-SOLAS. Die Versorgung der Tiere erfolgte mit Haltungsdiätfutter für Mäuse (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage) und Wasser *ad libitum*. Die Tiere wurden täglich auf ihr Wohlbefinden hin kontrolliert, einmal wöchentlich in frisch gereinigte Käfige überführt und alle zwei Wochen das Körpergewicht (Körpermasse) dokumentiert.

2.2.5.2 Subkutane Immunisierung von Mäusen

Für die Immunisierung wurde die entsprechende Konzentration an Hefe oder Formalin-inaktiviertem Virus A/PR/8/34 (H1N1) (Charles River Laboratories) in PBS gelöst. Vom Hefezelllysate wurden 50 µL (2 mg pro mL) der Suspension eingesetzt. Die *complete* (initiale Immunisierung) oder *incomplete* (booster-Immunisierungen) Freund-Adjuvans (Sigma-Aldrich) bzw. AddaVax™ (InvivoGen, San Diego, USA) enthaltenden Impfstoffe wurden durch Emulgieren des in 50 µL PBS gelösten Antigens 1:1 in 50 µL des Adjuvans präpariert. Die mit Montanide ISA 720 VG (Seppic, Paris, Frankreich) verabreichten Proben wurden wie die anderen Emulsionen erstellt, aber das Antigen in 30 µL PBS aufgenommen und mit 70 µL des Adjuvans präpariert. Um die Handhabung zu vereinfachen, wurde ein Vielfaches der beschriebenen Verhältnisse präpariert. Es wurden 100 µL des Impfstoffes subkutan mit einer 23G-Kanüle (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) appliziert.

2.2.5.3 Bestimmung der mittleren Maus-letalen-Dosis (MLD₅₀)

Um die Versuchstiere mit einer letalen Virusdosis zu infizieren, wurde die Virusdosis von Influenza A/PR/8/34 (H1N1) bestimmt, die für 50 % der Mäuse letal wäre (mittlere Maus letale Dosis, MLD₅₀). Alle Tiere, die innerhalb kurzer Zeit einen Gewichtsverlust von ≥ 20 % ihres Start-Körpergewichts (Tag der Belastungsinfektion) und / oder entsprechend unzumutbare Symptome einer Erkrankung aufwiesen [114], wurden sofort euthanasiert. Eine ausführliche Score-Einteilung der klinischen Symptome ist unter 2.2.5.4 beschrieben. Zur Bestimmung der MLD₅₀ wurden Gruppen von vier 15 Wochen alten, weiblichen BALB/c Mäuse mit Virusdosen von 10¹, 10², 10³, 10⁴ oder 10⁵ PFU, unter einer Sterilwerkbank in einem Gesamtvolumen von 20 µL PBS intranasal infiziert. Um während des Vorgangs eine gleichmäßige und tiefe Einatmung der Virussuspension sicherzustellen, wurden die Tiere zuvor mit Isofluran narkotisiert. Das Körpergewicht sowie klinische Symptome wurden mehrfach täglich über einen Zeitraum von 14 Tagen kontrolliert. Die Berechnung der MLD₅₀ erfolgte nach der Methode von REED und

MUENCH (1938) [134]. Die Resultate für die Titration von Influenza A/PR/8/34 (H1N1) zur Bestimmung der MLD₅₀ in BALB/c Mäusen sind unter 7.1 aufgeführt. Um einen letalen Verlauf der induzierten Influenza nach Infektion mit A/PR/8/34 (H1N1) sicherzustellen, wurde die 5x MLD₅₀ ($2,5 \times 10^2$ PFU pro 20 µL) für alle Belastungsinfektionen eingesetzt.

2.2.5.4 Infektion von BALB/c Mäusen mit Influenza-A-Virus

Verwendet wurden weibliche BALB/c-Mäuse, die nach Immunisierung im Alter von 15 Wochen mit der 5x MLD₅₀ von Influenza A/PR/8/34 (H1N1) infiziert wurden. Hierfür wurde die Virussuspension mit $2,5 \times 10^2$ PFU pro 20 µL Virus in PBS erstellt und, wie unter 2.2.5.3 beschrieben, intranasal appliziert. Das Körpergewicht sowie klinische Symptome wurden mehrfach täglich über einen Zeitraum von 14 Tagen untersucht. Für die Beurteilung der klinischen Symptome wurde ein klinischer Score von 0-4 festgelegt, welcher final für jede Gruppe gemittelt wurde (0: ohne Auffälligkeiten; 1: Fell glanzlos, leicht gesträubt, Gewichtsverlust >5 % < 10 %; 2: Fell glanzlos und gesträubt, reduzierte Aktivität, Gewichtsverlust 10-15 %; 3: Fell ungepflegt, Bewegungsunlust, gekrümmte Haltung, Körpergewichtsverlust von 15-20 %; 4: Fell ungepflegt, Bewegungsunlust, gekrümmte Haltung, Gewichtsverlust ≥ 20 %). Bei Eintreten der unter 2.2.5.3 genannten Kriterien wurden die Tiere sofort euthanasiert.

2.2.5.5 Serumgewinnung

Für sich anschließende Untersuchungen im VNT oder Western-Blot wurde den Tieren Blut aus der *Vena cava caudalis* final mit einer 26 G-Kanüle (B. Braun Melsungen AG) entnommen und daraus das Serum gewonnen. Hierfür wurde das gewonnene Blut ca. 1 h bei RT inkubiert und danach über Nacht bei 4 °C gelagert. Am Folgetag wurde das geronnene Blut zentrifugiert (1 min 30 s, 10000 g, 4 °C) und das Serum in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das restliche Serum abgenommen und für 30 min bei 56 °C erhitzt, um Komponenten des Komplementsystems zu inaktivieren, welche zu falsch-positiven Ergebnissen führen können. Um Kontaminationen mit Mikroorganismen zu vermeiden, wurde dem Serum Natriumazid in einer finalen Konzentration von 0,02 % zugesetzt.

2.2.5.6 Mechanische Homogenisierung von Lungengewebe

Um den Unterschied in der Viruslast zwischen Tieren zu untersuchen, die mit unterschiedlichen Agenzien immunisiert wurden, wurden Gruppen zu je 5 Mäusen 4 Tage nach Infektion mit dem Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1) euthanasiert. Nach finaler Blutentnahme (siehe 2.2.5.5) wurde die Lunge entfernt. Nach jeder

Organentnahme wurde das Sezierbesteck mit Ethanol gereinigt, um mögliche Kontaminationen zu verhindern. Das Organ wurde einmal mit PBS gewaschen, in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt, gewogen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Verwendung wurde das Organ bei -80 °C gelagert. Der Aufschluss des Gewebes erfolgte mechanisch unter Verwendung des *Pellet pestles cordless Motor* und der *Kimble Kontes Pellet Pestle* von Sigma-Aldrich. Hierfür wurden 0,1 g Lungengewebe in 1 mL PBS aufgenommen und das Gewebe für 2 min homogenisiert. Die Suspension wurde anschließend zentrifugiert (5 min, 3700 g, 4 °C) und der Überstand in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Nach einer weiteren Zentrifugation für 5 min bei 9500 g und 4 °C wurde der geklärte Überstand in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und zur Bestimmung der Konzentration von Influenza-A-Viruspartikeln im Avicel-Plaques-Test analysiert (siehe 2.2.4.1). Um Aufschluss über das Verhältnis des Organs zum finalen Körpergewicht zu erhalten, was wiederum Rückschlüsse auf pathologische Veränderungen zulässt, wurde der Lungenindex unter Verwendung der Formel 9 berechnet.

$$(9) \text{ Lungenindex (\%)} = \left(\frac{\text{Masse Lunge (g)}}{\text{finale Körpermasse Maus (g)}} \right) \cdot 100\%$$

3. ERGEBNISSE

Als immunodominantes Protein für den Influenzaimpfstoff wurde im Vorfeld dieser Arbeit das Hämagglutinin (HA) von A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) als virale Untereinheit ausgewählt und das kodierende Gen in das Genom von *K. lactis* inseriert (VAK952). Der Nachweis des produzierten HA (im Folgenden mit H1_{PR8} bezeichnet) gelang durch Western-Blot-Analyse mit einem geeigneten monoklonalen Antikörper. Zudem konnte gezeigt werden, dass H1_{PR8} in der Hefezelle glykosyliert vorliegt [5]. Durch Hefe-Codon Optimierung ließ sich die Proteinausbeute erheblich steigern [123]. Ebenfalls im Vorfeld wurde ein *K. lactis*-Stamm (VAK1047) generiert, der das Hefe-Codon-optimierte HA-Gen des Influenza A/California/04/2009 (H1N1) exprimiert. Nach anfänglichen Problemen bei der Anzucht konnte bei VAK1047 durch Austausch des Signalpeptids (aa 1-17) von HA gegen das von H1_{PR8} ebenfalls eine gute Proteinausbeute erzielt werden. Durch Austausch der Aminosäure an Position 137 (Threonin → Glutaminsäure) konnte der Nachweis des HA-Proteins (im Folgenden mit H1_{Cal} bezeichnet) durch den H1_{PR8}-spezifischen monoklonalen Antikörper erfolgen. Wie bei H1_{PR8} ließ sich auch eine Glykosylierung von H1_{Cal} nachweisen [5].

In der vorliegenden Arbeit galt es zunächst, die Hefestämme VAK952 und VAK1047 weiter zu charakterisieren. Dabei waren drei Aspekte von besonderem Interesse: a) Lokalisation des H1 Proteins, b) H1-Stabilität und Proteinkonzentration sowie c) Wachstum der rekombinanten Hefe. Zudem galt es, in Immunisierungsexperimenten die folgenden Parameter zu untersuchen: a) Hefe-Dosis, b) Verabreichungsform, c) Adjuvans, d) Impfschema, e) Lagerstabilität und f) Sterilisationsverfahren des Hefebasierten Impfstoffes. Des Weiteren sollten verschiedene Möglichkeiten eruiert werden, mit denen sich die Konzentration des Antigens innerhalb der Hefezelle sowie die Fitness der Hefe weiter optimieren ließen.

3.1 Charakterisierung rekombinanter *K. lactis*-Stämme

Zunächst sollte die intrazelluläre Stabilität des rekombinanten H1 sowie das Wachstum der Hefe näher untersucht werden. Ziel war es, eine hohe Biotrockenmasse der rekombinanten *K. lactis*-Stämme mit maximalen H1-Proteinquantitäten zu produzieren, um in anschließenden Immunisierungsstudien eine ausreichende Konzentration an Fremdartigen applizieren zu können. Nachweis und Analysen des H1-Proteins erfolgten durch Western-Blot. Das Wachstum der *K. lactis*-Stämme wurde in Wachstumskurven (Flüssigmedium) und im Tropfentest (Festmedium) untersucht.

3.1.1 Charakterisierung von VAK952

Nach stabiler Insertion des *H1*-Fremdgens in das Genom von *K. lactis* und Induktion der Proteinbiosynthese durch Wachstum in Lactose (Induktor)-haltigem Medium, konnte die Fremdgenexpression induziert und H1_{PR8} als Produkt sowohl in der löslichen, als auch in der unlöslichen Proteinfraction (Pellet) des Zellysats nachgewiesen werden (**Abb. 7**). Hier soll angemerkt werden, dass als Ladekontrolle in diesem, wie auch in allen folgenden Experimenten, das endogene Nop1-Protein (*KLLA0C04389g*) aus *Kluyveromyces lactis* verwendet wurde. Nop1 ist das zu Säugetieren homologe Hefe-Fibrillarin, ein konserviertes Kernprotein, welches für verschiedene Schritte während der Ribosomen-Biosynthese verantwortlich ist [131, 170]. Aufgrund seiner Kernlokalisation eignete es sich gut als Ladekontrolle für beide Proteinfractionen nach Hefezellaufschluss. Als zusätzliche Ladekontrolle diente Ponceau S angefärbtes Hefe-Totalprotein. Im natürlichen Wirt wird das Hämagglutinin durch Proteasen gespalten.

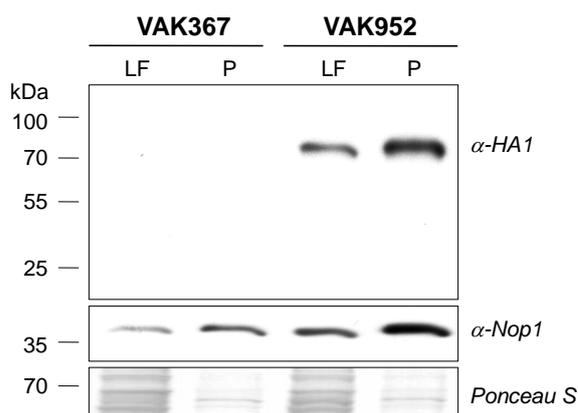


Abbildung 7: Nachweis des rekombinanten H1_{PR8} mit Western-Blot. Die Stämme VAK367 und VAK952 wurden nach dem Standardprotokoll angezogen. 30 OD-Einheiten der Flüssigkultur wurden mit Glasperlen aufgeschlossen. Die lösliche (LF) sowie die unlösliche Proteinfraction (Pellet, P) wurden in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis der Proteine erfolgte unter Verwendung der Primärantikörper α -HA1 (CM1-1) und α -Nop1 sowie dem Sekundärantikörper *Donkey anti-Mouse*-IR-Dye800CW. Die Bildgebung erfolgte über das Odyssey Infrared Imaging System. Ladekontrollen: Nop1, endogenes Hefeprotein; Ponceau S, Anfärbung des Hefe-Totalproteins. Es wurden 20 μ g Hefetotalprotein pro Spur aufgetragen.

Aus dem HA0 (ca. 80 kDa, glykosyliertes Vorläuferprotein) entstehen die beiden Untereinheiten HA1 (~55 kDa) und HA2 (~25 kDa), die durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. In Western-Blots mit Zellextrakt von Humanzellen, die mit Influenzavirus infiziert wurden, lassen sich unter Einsatz von Trypsin-haltigem Kulturmedium entsprechend drei Banden über anti-HA Antiseren detektieren, da die Disulfidbrücke unter reduzierenden Bedingungen aufgespalten wird. Wie gezeigt, ließ sich im Lysat von VAK952 nur ein Signal bei ca. 80 kDa nachweisen. Entsprechend wurde geschlossen, dass eine Spaltung, wenn überhaupt, nur marginal erfolgt. Der überwiegende Anteil des H1_{PR8} wurde in der unlöslichen Fraktion (Pellet) nachgewiesen. Dies war zu erwarten, da das gebildete H1_{PR8} eine Transmembrandomäne enthält, welche das Protein in (z.T. unlösliche) zelluläre Membranen lokalisiert. Bisher konnte

noch nicht vollständig geklärt werden in welche Membran-Kompartimente (ER, Golgi oder Plasmamembran) das H1 in der Hefezelle fraktioniert, zumal nicht auszuschließen ist, dass ein gewisser Anteil des Proteins auch in Form von Aggregaten vorliegt. Durch Verwendung der indirekten Immunfluoreszenz wurden in Vorarbeiten bereits Daten erhalten, die zeigten, dass H1_{PR8} vorwiegend in peripheren Regionen des Zellkerns, wie dem ER, und im Bereich der Plasmamembran lokalisiert [5]. Im direkten Vergleich mit H1_{Cal} wurden diese Daten bestätigt (siehe ausführliches Experiment unter 3.1.2.2; **Abb. 12**).

3.1.1.1 H1_{PR8}-Synthesekinetik in VAK952 nach Geninduktion mit Lactose

In Untersuchungen zur H1-Proteinbiosynthese nach Lactose-Induktion im Vollmedium (YPL) sollten zunächst wichtige Informationen zur Quantität und Stabilität des gebildeten

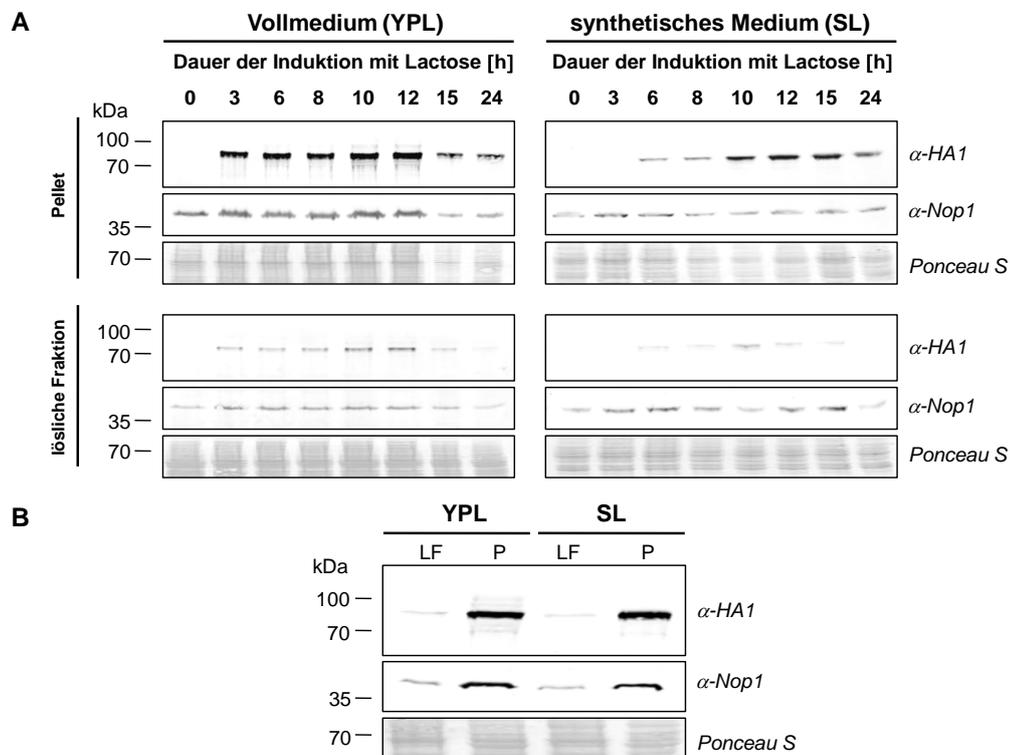


Abbildung 8: Induktionskinetik von VAK952. (A) Der Hefestamm VAK952 wurde im Schüttelkolben in YPD- bzw. SD-Medium angezogen und anschließend über einen Zeitraum von 24 h in YPL- bzw. SL-Medium kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 30 OD-Einheiten der Kultur geerntet und mit Glasperlen aufgeschlossen. Die lösliche (LF) sowie die unlösliche Proteinfraction (Pellet, P) wurden, wie zuvor beschrieben, in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt und im Western-Blot untersucht. (B) Direkter Vergleich der Proben, 12 h nach Lactose-Induktion von VAK952 in YPL- bzw. SL-Medium. Ladekontrollen: Nop1, Ponceau S. Es wurden 20 µg Hefetotalprotein pro Spur aufgetragen.

H1_{PR8} in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit gewonnen werden. Da zudem vorgesehen war, die Produktion der *K. lactis*-basierten Impfstoffe unter regulierten Bedingungen im Fermenter und in chemisch definiertem Medium durchzuführen, wurde

VAK952 diesbezüglich auch in synthetischem Medium (SL) untersucht. Zudem sollte der Zeitpunkt der maximalen H1-Proteinbildung (Signalstärke im Western-Blot) nach Beginn der Fremdgeninduktion bestimmt werden. Hierfür wurde VAK952 über einen Zeitraum von 24 h in beiden Medien kultiviert und zu den in **Abb. 8A** angegebenen Zeitpunkten Kulturproben entnommen. Die Zellproben wurden aufgeschlossen und die lösliche sowie die unlösliche Proteinfraction im Western-Blot untersucht. Wie in der Abbildung gezeigt, ließ sich das rekombinante Protein in YPL über einen Zeitraum von 3-24 h, in SL über 6-24 h und in beiden Proteinfractionen nachweisen. Das H1-Maximum wurde nach 10-12 h erreicht. Wie erwartet, wurde der überwiegende Anteil des Proteins im Pellet detektiert. Bei direktem Vergleich der H1-Signalintensitäten auf derselben Membran zeigte sich, im Vergleich zu Proben aus YPL-Medium, eine wenn überhaupt nur leicht verminderte Konzentration des Fremdantigens nach Anzucht in SL-Medium (**Abb. 8B**).

3.1.1.2 Untersuchungen zum Wachstum von VAK952

In ersten Untersuchungen zum Wachstum von VAK952 auf YPL-Nähragarplatten zeigte sich ein vermindertes Wachstum im Vergleich zur Hefe ohne Fremdgen (VAK367) [5]. Entsprechend wurde vermutet, dass dieser Wachstumsdefekt durch die Fremdgenexpression von *H1* hervorgerufen wird, welche einen zellschädigenden Effekt (*cytopathic effect*, CPE) auf die Hefezelle hat [5]. Um weitere Informationen bezüglich des Wachstumsverhaltens rekombinanter *K. lactis* als Grundlage für spätere Fermentationsprozesse zu erhalten, wurde VAK952 parallel mit dem VAK367 in Flüssigkultur (24 h) bzw. auf Nähragarplatten (48-72 h) in YPL- bzw. SL-Medium kultiviert (**Abb. 9**). Bei Wachstum der Kulturen im Schüttelkolben mit YPL-Medium erreichte VAK367 im Vergleich zum rekombinanten VAK952 eine doppelt so hohe finale Zelldichte in der stationären Phase (**Abb. 9A**). Die Generationszeit (Geschwindigkeit der Zellteilung unter optimalen Bedingungen) des *H1*-exprimierenden Hefestammes verlängerte sich um rund 1 h. Nach 3 h Induktion mit Lactose ließ sich im Western-Blot ein signifikantes Signal von H1_{PR8} detektieren (**Abb. 8A**). Da VAK952 nach 3 h ein deutlich reduziertes Wachstum in YPL-Medium zeigte, konnte der Wachstumsdefekt entsprechend direkt mit der Produktion des Fremdantigens korreliert werden. Interessanterweise zeigten beide Hefestämme bei Kultivierung in SL-Medium ein reduziertes Wachstum und vergleichbare Generationszeiten. So war im Vergleich zum Vollmedium die finale Zelldichte von VAK367 in SL nur halb so groß. Da hier in *batch*-Kultur gearbeitet wurde, dementsprechend keine Stoffe zu- oder abgeführt wurden, ließ sich aus dieser Beobachtung schließen, dass Stoffwechselprodukte, Ansäuerung oder

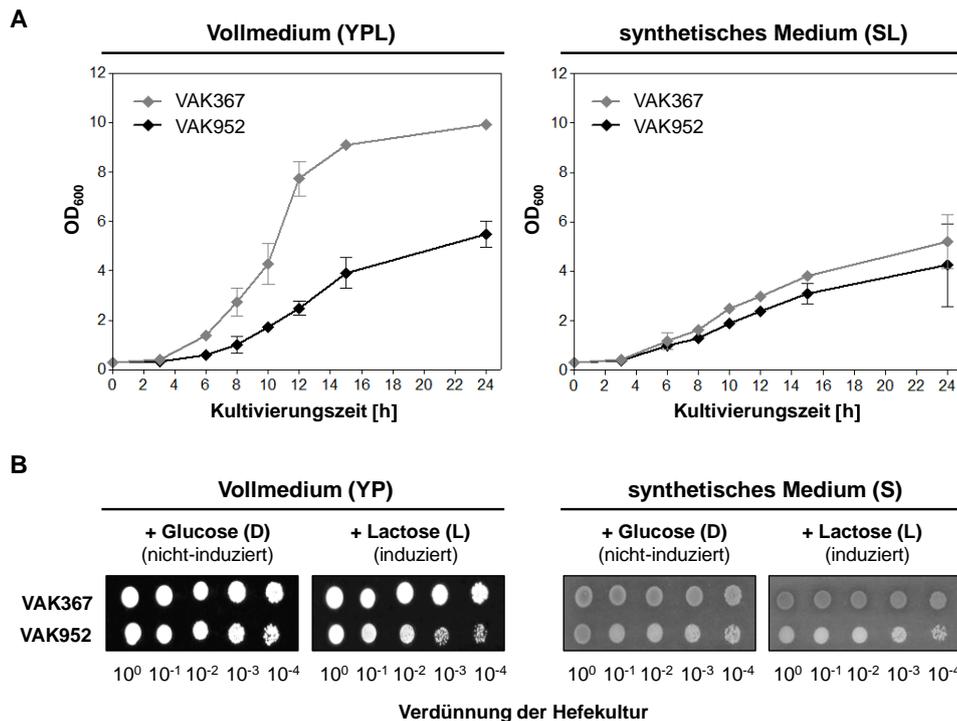


Abbildung 9: Wachstum von VAK952 auf Voll- und synthetischem Medium. (A) Wachstumskurven. Die Stämme VAK367 und VAK952 wurden im Schüttelkolben mit YPD- / SD-Medium angezogen und anschließend in YPL- / SL-Medium über einen Zeitraum von 24 h kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde jeweils die OD₆₀₀ der Kulturen bestimmt. Die angegebenen Daten wurden aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen gemittelt. **(B)** Tropfentest. Die Stämme VAK367 und VAK952 wurden auf YPD-Nähragarplatten für 48 h bei 30 °C inkubiert. Beginnend mit 1 OD-Einheit wurden die Hefestämme seriell verdünnt und anschließend auf YPD- / YPL- bzw. SD- / SL-Nähragarplatten getropft. Die Platten wurden für 48-72 h bei 30 °C kultiviert.

Verknappung von Nährstoffen (z.B. Niacin oder Lactose) die Ursache für dieses verminderte Wachstum von VAK367 sind. In beiden Flüssigmedien verminderte sich nach ca. 12-15 h das Wachstum beider Hefestämme und die Zellen begannen in die stationäre Phase einzutreten. Im Western-Blot von VAK952 reduzierte sich das Signal für H1_{PR8} nach etwa 15 h (**Abb. 8A**). Dies ließ darauf schließen, dass mit dem Phasenübergang in *batch*-Kultur neben der Zellteilungsgeschwindigkeit auch die H1_{PR8}-Proteinbiosynthese verringert wird. Im Tropfentest konnte das im Vergleich zur nicht-rekombinanten Hefe reduzierte Wachstum von VAK952 sowohl auf YPL- als auch auf SL-Nährmedium bestätigt werden (**Abb. 9B**). Auch unter nicht-induzierten Bedingungen (Glucose) wurde für VAK952 auf Nähragarplatten beider Medien ein schwaches Wachstumsdefizit beobachtet. Dieser Effekt wurde durch die Lactose-induzierte Fremdgenexpression verstärkt. Aufgrund der noch ungeklärten Ursachen der Wachstumslimitierung von *K. lactis* in synthetischem Medium und der höheren Zellausbeute bei Kultivierung in Vollmedium wurden alle anschließenden Untersuchungen sowie die Produktion der Impfstämme in Vollmedium durchgeführt.

3.1.1.3 H1_{PR8}-Konzentration pro VAK952-Biotrockenmasse

Durch subkutane oder intramuskuläre Applikation verschiedener Konzentrationen an gereinigtem HA-Protein (10-50 µg pro Tier) konnten andere Arbeitsgruppen im Mausmodell erfolgreich gegen Influenza immunisieren [7, 27]. Dabei zeigte sich ein direkter Zusammenhang zwischen der dabei eingesetzten HA-Konzentration und der Höhe der in den immunisierten Individuen nachgewiesenen Antikörpertitern [7].

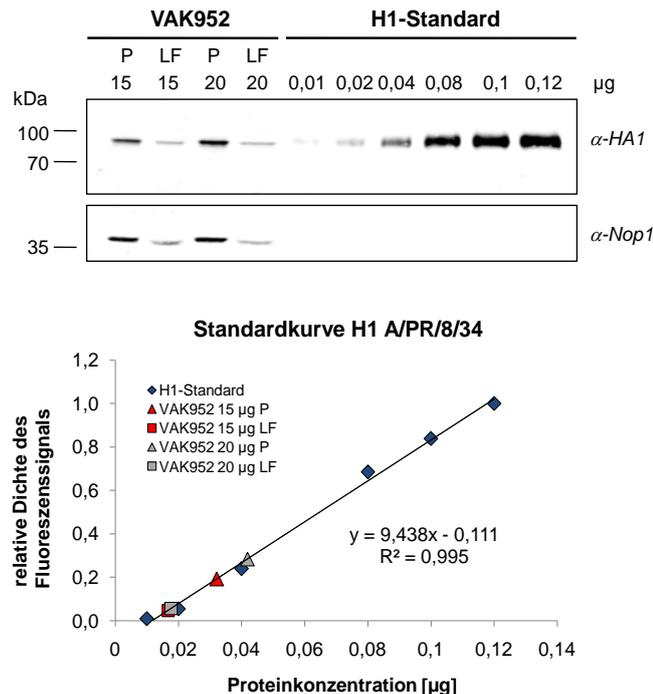


Abbildung 10: Semiquantitative Analyse der H1_{PR8}-Konzentration in *K. lactis*. VAK952 wurde nach dem Standardprotokoll angezogen. Die Induktion mit Lactose erfolgte für 12 h. 30 OD-Einheiten der Biotrockenmasse wurden mit Glasperlen aufgeschlossen und beide Proteinfractionen (lösliche (LF), Pellet (P)) in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Analyse erfolgte im Western-Blot, wie zuvor beschrieben. Die relative Intensität der Bandensignale wurde unter Verwendung der Software ImageJ ermittelt. Die H1-Konzentration wurde anhand der mitgeführten Verdünnungsreihe des H1-Standards (aa 1-528; Sino Biological Inc., Peking, China) mit bekannter Proteinkonzentration, indirekt bestimmt. Unter Verwendung der Werte der finalen OD-Einheiten der Hauptkultur und der Biotrockenmasse der Hefe wurde die H1-Konzentration pro mg Hefe berechnet. Nop1: Ladekontrolle. Es wurden 15 bzw. 20 µg Hefetotalprotein pro Spur aufgetragen.

Entsprechend wichtig war es, Hinweise auf die Quantität von H1-Antigen pro mg gefriergetrockneter Hefe zu erhalten. Dazu wurde VAK952 im Schüttelkolben mit YPL-Medium für 12 h (zuvor ermittelter Zeitpunkt mit maximal pro Hefematerial nachweisbarer Proteinkonzentration an H1) kultiviert und nach dem Standardprotokoll lyophilisiert und hitzeinaktiviert. Von dem Hefepulver wurde eine definierte Menge aufgeschlossen und der H1_{PR8}-Anteil der löslichen sowie der unlöslichen Proteinfraction anhand eines gereinigten H1-Standards im Western-Blot ermittelt. Als Standard wurde die in Humanzellen produzierte H1-Ektodomäne (aa 1-528) von Influenza A/PR/8/34

(H1N1) von Sino Biological Inc. (Peking, China) verwendet. Unter Verwendung der Standardkurve und zwei unterschiedlicher Konzentrationen an Hefetotalprotein konnte jeweils eine Konzentration von rund $0,5 \mu\text{g H1}_{\text{PR8}} \pm 0,02$ pro mg VAK952 ermittelt werden (**Abb. 10**). Bei Immunisierung mit 1 mg Hefe (siehe 3.2) wurden entsprechend $0,5 \mu\text{g}$ H1-Antigen pro Applikation verabreicht.

3.1.2 Charakterisierung von VAK1047

Wie bereits ausgeführt, wurde neben VAK952 im Vorfeld dieser Arbeit der Hefestamm VAK1047 (H1_{Cal}) erstellt, welcher eine modifizierte *H1*-Genvariante des zum A/PR/8/34 (H1N1) homologen Subtyp Influenza A/California/4/2009 (H1N1) exprimiert. Aufbauend auf den für VAK952 gewonnenen Daten galt es, VAK1047 bezüglich der Stabilität des H1_{Cal} in Abhängigkeit von der Zeit sowie das Wachstum zu untersuchen. Ziel war es wiederum, für Immunisierungen eine hohe Biotrockenmasse von VAK1047 (H1_{Cal}) mit maximaler Proteinausbeute an H1 zu produzieren. Da ein intrazellulärer Nachweis des Proteins in *K. lactis* durch Immunmarkierung und Fluoreszenzmikroskopie bisher nicht erfolgreich war, sollte zudem die Lokalisation des H1_{Cal} in den Hefezellen überprüft werden.

3.1.2.1 H1_{Cal} -Synthesekinetik und Wachstum von VAK1047

Um Informationen bezüglich der H1-Proteinbiosynthese / -Stabilität nach Beginn der Lactose-Induktion in Abhängigkeit von der Zeit zu erhalten, wurde VAK1047 über einen Zeitraum von 24 h in YPL-Medium im Schüttelkolben kultiviert. Zu den in **Abb. 11** angegebenen Zeitpunkten wurden Kulturproben entnommen, die Zellen aufgeschossen und das Lysat im Western-Blot untersucht. Nach Geninduktion mit Lactose ließ sich das rekombinante H1_{Cal} sowohl in der löslichen, als auch in der unlöslichen Proteinfraction nachweisen (**Abb. 11A**). Wie zuvor bereits mit H1_{PR8} gezeigt, lag auch hier das rekombinante HA als nicht gespaltene Isoform HA0 mit einer molekularen Masse von 80 kDa vor. Wie im Falle des H1_{PR8} aus VAK952 war der überwiegende Anteil von H1_{Cal} in der unlöslichen Proteinfraction (Pellet) nachweisbar. Ein ähnliches Bild wie für VAK952 ergab sich für VAK1047 auch in der Proteinsynthesekinetik: H1_{Cal} war über einen Zeitraum von 3-24 h im Western-Blot nachweisbar und erreichte ein Maximum nach etwa 12 h (**Abb. 11B**). Im Tropfentest zeigte sich ein vergleichbar reduziertes Wachstum von VAK1047 wie für VAK952 unter Lactose-induzierten Bedingungen

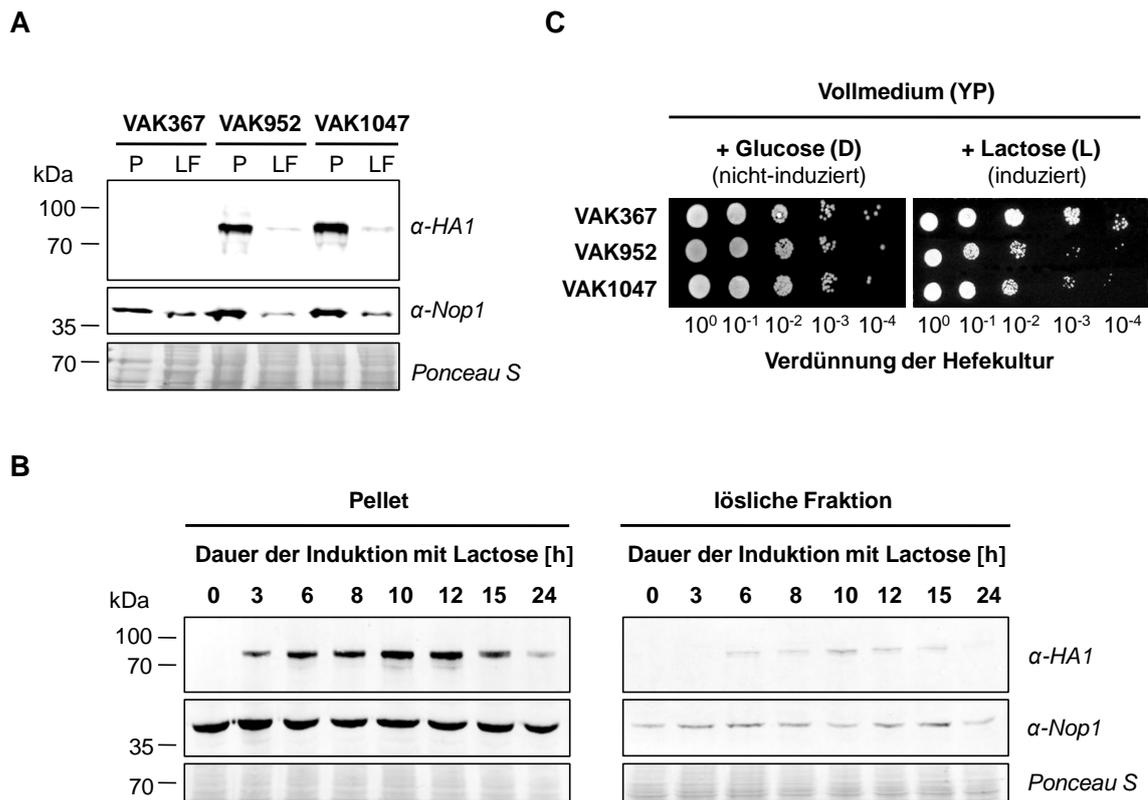


Abbildung 11: Untersuchungen zur Synthese von H1_{Cal} und zum Wachstum von VAK1047. Die Hefestämme VAK367, VAK952 und VAK1047 wurden im Schüttelkolben in YPD-Medium angezogen und anschließend in YPL-Medium für 12 h (A) oder über einen Zeitraum von 24 h (VAK1047) (B) induziert. Nach 12 h bzw. zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 30 OD-Einheiten der Kulturen geerntet, mit Glasperlen aufgeschlossen und, wie zuvor beschrieben, in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt und im Western-Blot untersucht. Ladekontrollen: Nop1, Ponceau S. Es wurden jeweils 20 µg Hefetotalprotein pro Spur aufgetragen. (C) Für den Tropfentest wurden die Hefestämme, wie zuvor beschrieben, seriell verdünnt und auf YPD- / YPL-Nähragarplatten für 48 h bei 30 °C kultiviert. LF: lösliche Proteinfraction; P: Pellet.

(Abb. 11C). Erneut war dieser Phänotyp auch unter nicht-induzierten Bedingungen (Glucose) zu erkennen und wurde durch die Induktion des Fremdgens verstärkt.

3.1.2.2 Nachweis von H1 in rekombinanten Hefezellen durch Immunfluoreszenz

In den Vorarbeiten konnte das rekombinante H1_{Cal} in *K. lactis* bisher nicht intrazellulär nachgewiesen werden. Daher wurde das Protein mit einem Fluorophor-gebundenen Antikörper indirekt markiert und die Lokalisation des Proteins in der Hefezelle durch Fluoreszenzmikroskopie ermittelt (Abb. 12). Als Negativkontrolle wurde VAK367 und als Positivkontrolle für den spezifischen Nachweis des H1-Proteins VAK952 verwendet. Wie erwartet, konnte in der Hefe VAK367 (nicht rekombinant) kein H1-spezifisches Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden. In VAK952 ließ sich das H1_{PR8}, wie zuvor bereits von Marina Arnold-Klingbeil gezeigt, deutlich in den peripheren Regionen des Zellkerns und schwach im Bereich der Plasmamembran nachweisen. Mit VAK1047

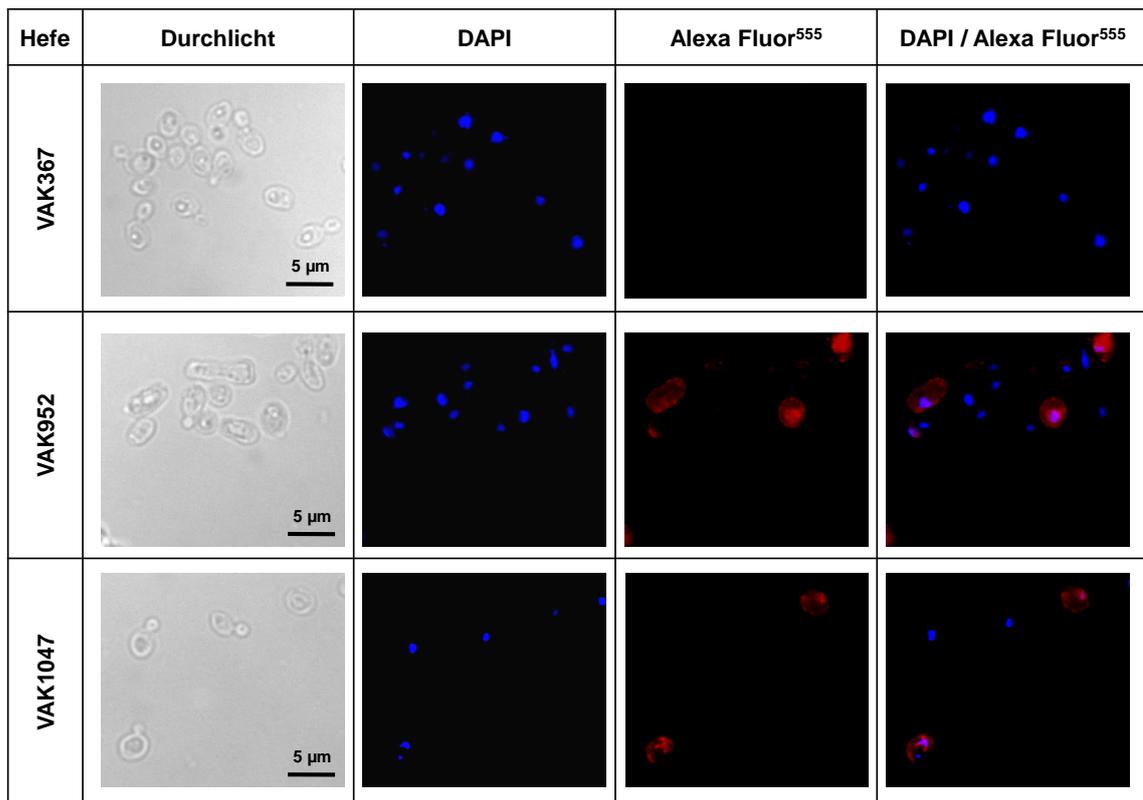


Abbildung 12: Indirekte Immunfluoreszenz von *K. lactis*. Die Stämme VAK367, VAK952 und VAK1047 wurden im Schüttelkolben mit YPD-Medium angezogen und anschließend in YPL-Medium für 12 h induziert. Es wurden 2 OD-Einheiten der Kulturen geerntet, die Zellen in 5%iger Formaldehyd-Lösung fixiert und die Zellwand mit Zymolyase verdaut. Die Protoplasten wurden permeabilisiert und auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger gebunden. Der H1-Nachweis erfolgte unter Verwendung des Primärantikörpers α -HA1 (CM1-1) und des Sekundärantikörpers *Goat anti-Mouse-Alexa Fluor⁵⁵⁵*. Die Zellkerne wurden mit DAPI-haltigem *ProLong Gold antifade*-Reagens angefärbt und die Hefezellen fixiert. Die Analyse der Präparate erfolgte im Axiovert 200M Fluoreszenzmikroskop mit der Software AxioVision. Belichtungszeiten: Durchlicht: 100 ms, DAPI: 800 ms, Alexa Fluor⁵⁵⁵ 450 ms.

ergab sich ein sehr ähnliches Bild. Der überwiegende Anteil des rekombinanten H1_{Cal}-Proteins wurde in peripheren Regionen des Zellkerns sowie peripheren Bereichen von *K. lactis* nachgewiesen. Das rekombinante H1-Protein scheint folglich überwiegend im ER zu verbleiben bzw. zu akkumulieren.

3.1.3 Generierung / Charakterisierung von VAK1091 (mH1_{PR8})

In *K. lactis* synthetisierte Glykoproteine werden i.d.R an Asparaginen mit Glykanen vom Typ *high-Mannose N-glykosyliert* [92]. Da die Glykosylierung eines Proteins dessen Stabilität, intrazelluläre Lokalisation und Immunogenität signifikant beeinflussen kann, stellte sich entsprechend die Frage, inwieweit eine im Vergleich zur Situation in der humanen Zelle in *K. lactis* abweichende Glykosylierung von H1 dessen Immunogenität beeinträchtigt [36, 92].

3.1.3.1 Generierung von VAK1091 (mH1_{PR8})

Um eine mögliche Maskierung (Verlust der Immunreaktivität) immunrelevanter Epitope durch eine in *K. lactis* stattfindende *N*-Glykosylierung zu verhindern, wurde eine Variante des *H1_{PR8}*-Gens generiert, die nur für die Aminosäuren 18-566 kodiert und demzufolge kein Signalpeptid ausbildet. Hierfür wurde die entsprechende Sequenz unter Verwendung genspezifischer Primer aus dem Plasmid mit der vollständigen *H1*-Sequenz (p1934) amplifiziert und in Klp3-MCS (p2016) inseriert. Die linearisierte Plasmid-DNA des resultierenden Vektors p2113 wurde anschließend durch homologe Rekombination in das Genom von *K. lactis* VAK556 stabil integriert und der resultierende rekombinante Hefestamm als VAK1091 bezeichnet. Durch das fehlende Signalpeptid sollte das modifizierte Hämagglutinin (mH1_{PR8}) nicht in das ER von *K. lactis* transloziert werden und folglich nicht glykosyliert in der Zelle vorliegen. Da das Signalpeptid kotranslational durch Signalpeptidasen abgespalten wird [69, 145], ist es im HA, welches in der Membran verankert ist, nicht mehr präsent und hat daher keine antigene Funktion.

3.1.3.2 Nachweis von mH1_{PR8} und enzymatische Deglykosylierung

Für den Nachweis des rekombinanten mH1_{PR8}-Proteins wurde der Hefestamm VAK1091 parallel mit der Negativkontrolle VAK367 und der Positivkontrolle VAK952 (H1_{PR8}) angezogen, die Proteinsynthese mit Lactose induziert und das Zelllysate im Western-Blot untersucht. Das rekombinante mH1_{PR8} wurde mit einer molekularen Masse von etwa 63 kDa nachgewiesen (**Abb. 13A**). Um das mH1_{PR8} aus VAK1091 nachweisen zu können, musste eine im Vergleich zu VAK952 um den Faktor 25 höhere Konzentration an Totalprotein analysiert werden (**Abb. 13B**). Im Zelllysate von VAK1091 war entsprechend deutlich weniger rekombinantes H1 enthalten als im Lysate von VAK952. Aufgrund des im Vergleich zum H1_{PR8} (80 kDa) veränderten Laufverhaltens von mH1_{PR8} ließ sich vermuten, dass das Protein in der Tat nicht glykosyliert in *K. lactis* vorliegt. Um dies zu überprüfen, wurde eine Behandlung der Zelllysate mit PNGase F durchgeführt (**Abb. 13B**). Dieses Enzym entfernt Oligosaccharide von *N*-glykosylierten Proteinen, indem es die *N*-glykosidische Bindung zwischen dem innersten *N*-Acetylglucosamin und dem Asparaginrest hydrolysiert [99]. In der Tat zeigte nach enzymatischer Behandlung das rekombinante H1_{PR8} aus VAK952 eine geringere Größe (63 kDa) als das nicht verdaute H1_{PR8} (80 kDa). Somit ließ sich eine *N*-Glykosylierung des in VAK952 produzierten H1_{PR8}-Proteins bestätigen. Im Vergleich dazu veränderte sich das Laufverhalten von mH1_{PR8} nach Behandlung mit PNGase F nicht, was auf eine nicht vorhandene *N*-Glykosylierung des Proteins schließen ließ. Der überwiegende Anteil

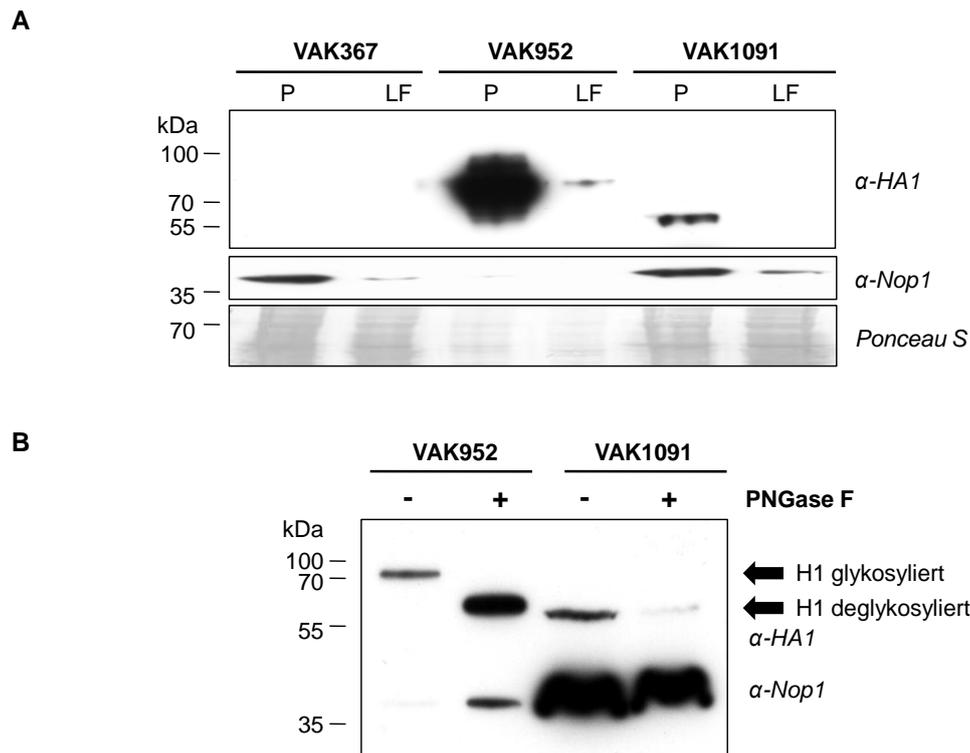


Abbildung 13: Nachweis von mH1_{PR8} und Deglykosylierung. Die Hefestämme VAK367, VAK952 und VAK1091 wurden im Schüttelkolben in YPD-Medium angezogen und anschließend in YPL-Medium für 10 h induziert. **(A)** Es wurden 30 OD-Einheiten der Kulturen geerntet und die Zellen mit Glasperlen aufgeschlossen. Beide Proteinfractionen (lösliche (LF), Pellet (P)) wurden in einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt und im Western-Blot untersucht. Der Proteinnachweis erfolgte unter Verwendung der Primärantikörper α -HA1 (CM1-1) und α -Nop1, sowie dem Sekundärantikörper *Goat anti-Mouse*-HRP. Die Bildgebung erfolgte über Chemolumineszenz unter Verwendung der *ECL Prime Western Blotting Detection*-Reagens und Röntgenfilm (*CEA RP New Medical X-Ray screen*). Es wurden 2 μ g Totalprotein von VAK952 und je 50 μ g Totalprotein von VAK367 sowie VAK1091 pro Spur aufgetragen. **(B)** Für die Deglykosylierung wurden 0,5 (VAK952) bzw. 30 OD-Einheiten (VAK1091) geerntet. Das Hefepellet wurde hitzedenaturiert und über Nacht bei 37 °C mit 500 U PNGase F inkubiert. Es wurden jeweils 0,125 (VAK952) bzw. 7,5 OD-Einheiten (VAK1091), wie unter **A** beschrieben im Western-Blot untersucht.

des mH1_{PR8} wurde im Pellet nachgewiesen (**Abb. 13B**). Aufgrund des fehlenden Signalpeptids wurde erwartet, dass das mH1_{PR8}-Protein im Zytoplasma der Hefezelle verblieb. Entsprechend wichtig war es, dessen Lokalisation zu untersuchen.

3.1.3.3 Nachweis von mH1_{PR8} in VAK1091 durch Immunfluoreszenz

Hierfür wurde die Expression des Fremdgens in VAK1091 mit Lactose induziert, die Zellen fixiert und nach enzymatischem Verdau der Zellwand das rekombinante Protein intrazellulär indirekt mit einem Fluorophor-markierten Antikörper spezifisch nachgewiesen (**Abb. 14**). Als Negativkontrolle wurde VAK367 und als Positivkontrolle VAK952 verwendet. Nach spezifischer Immunmarkierung von VAK1091-Hefezellen, ließ sich unerwarteterweise keine zytoplasmatische Lokalisation nachweisen. Dagegen wurden, ähnlich wie bei VAK952, H1-spezifische Fluoreszenzsignale in peripheren

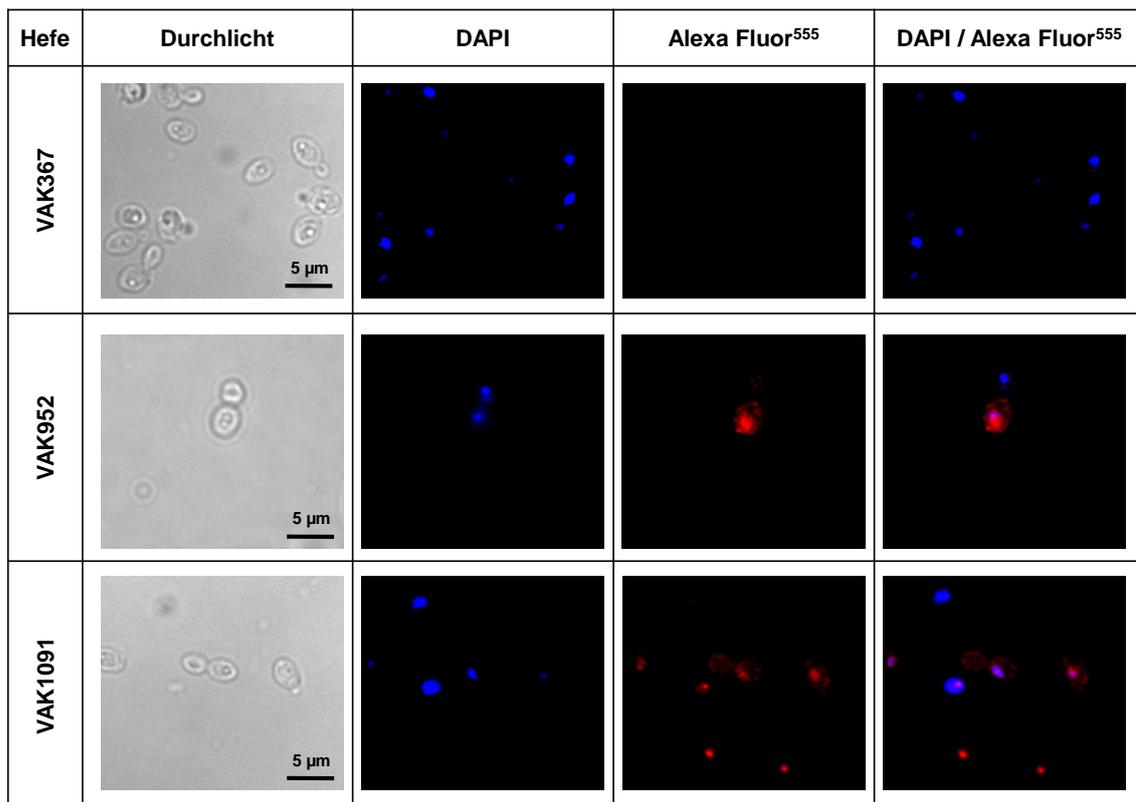


Abbildung 14: Indirekte Immunfluoreszenz von *K. lactis*. Die Stämme VAK367, VAK952 und VAK1091 wurden im Schüttelkolben in YPD-Medium angezogen und anschließend in YPL-Medium für 12 h induziert. Es wurden 2 OD-Einheiten der Kulturen geerntet, die Zellen wie zuvor beschrieben fixiert und intrazellulär immunmarkiert. Die Analyse der Präparate erfolgte im Axiovert 200M Fluoreszenzmikroskop mit der Software AxioVision. Belichtungszeiten: Durchlicht: 100 ms, DAPI: 800 ms, Alexa Fluor⁵⁵⁵ 450 ms.

Bereichen des Zellkerns beobachtet. Da das modifizierte H1-Protein nicht glykosyliert war, ist davon auszugehen, dass mH1_{PR8} in Form von *inclusion bodies* in der Hefezelle nahe des Zellkerns akkumuliert. Dafür spricht, dass bei Zellfraktionierung das mH1_{PR8}, analog zu H1_{PR8} vorwiegend im Pellet detektiert wurde (siehe **Abb. 13**). Es ist bekannt, dass in eukaryotischen Zellen fehlgefaltete zytoplasmatische Proteine in intrazellulären Kompartimenten wie dem JUNQ (*juxtannuclear quality control compartment*) eingelagert werden können [64].

3.1.3.4 mH1_{PR8}-Synthesekinetik und Wachstum von VAK1091

Wie bereits für VAK952 und VAK1047 wurde der Stamm VAK1091 bezüglich Stabilität und Quantität des gebildeten mH1_{PR8}-Proteins in Abhängigkeit von der Zeit sowie dessen Wachstum näher charakterisiert. Entsprechend wurde VAK1091 im Schüttelkolben in YPL-Medium über einen Zeitraum von 24 h induziert und die Proben im Western-Blot untersucht. Dabei zeigte sich, dass das rekombinante mH1_{PR8} über

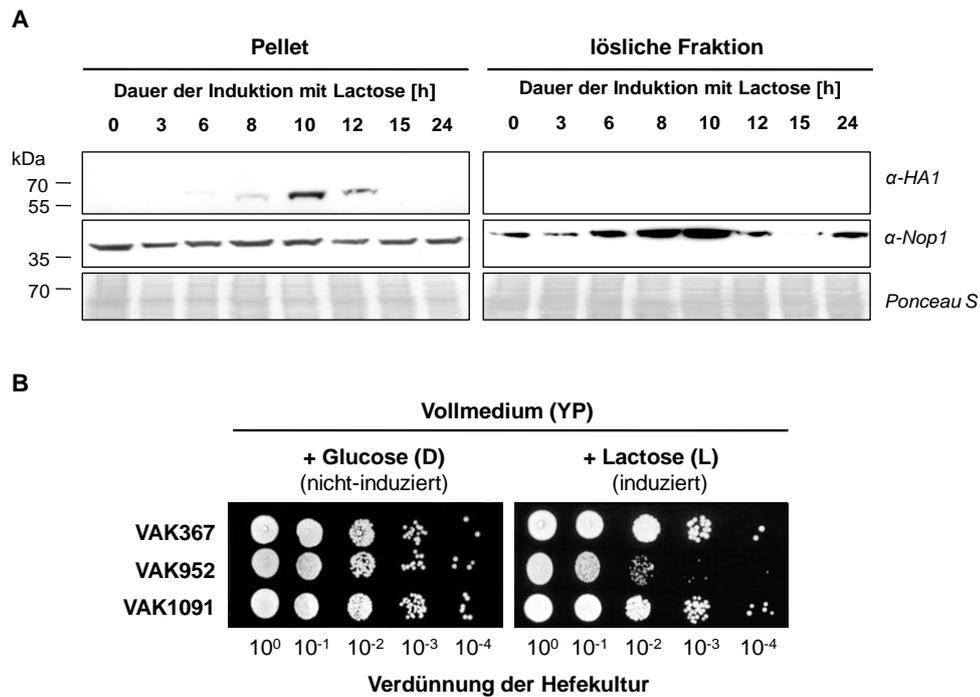


Abbildung 15: Untersuchungen zur mH1_{PR8}-Synthese und zum Wachstum von VAK1091. (A) VAK1091 wurde im Schüttelkolben in YPD-Medium angezogen und anschließend in YPL-Medium über einen Zeitraum von 24 h induziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 30 OD-Einheiten der Kultur geerntet und die Zellen mit Glasperlen aufgeschlossen. Beide Proteinfractionen (löslich (LF), Pellet (P)) wurden in einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt und wie zuvor in Abb. 13 beschrieben im Western-Blot untersucht. Es wurden 50 µg Totalprotein von VAK1091 pro Spur auf das Gel aufgetragen. Ladekontrollen: Nop1, Ponceau S. (B) Der Tropfentest wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt.

einen Zeitraum von 6-12 h nach Beginn der Induktion mit Lactose nachweisbar war und ein H1-Maximum nach ca. 10 h erreicht wurde (**Abb. 15A**). Wahrscheinlich aufgrund der generell geringeren Konzentration an mH1_{PR8}, die in VAK1091 synthetisiert wird, ließ sich das Protein in der löslichen Fraktion des Hefezelllysats zu keinem der getesteten Zeitpunkte nachweisen. Im Tropfentest zeigte VAK1091 ein ähnliches Verhalten wie der nicht-rekombinante Stamm VAK367 (**Abb. 15B**) und damit nicht den bei VAK952 und VAK1047 zu beobachtenden Wachstumsdefekt. Eine Erklärung ist die bereits erwähnte und im Vergleich zu VAK952 deutlich geringe Antigenproduktion in VAK1091.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in *K. lactis* das Volllängen-H1 und eine verkürzte Variante des Proteins aus Influenza A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) sowie das H1 aus Influenza A/California/4/2009 (H1N1) erfolgreich produziert werden können. Die Biosynthesen der rekombinanten Proteine sind durch Lactose induzierbar und die Proteine über einen Zeitraum von 3-12 h stabil im Western-Blot nachweisbar. Der Verlust des Signalpeptids von H1 resultierte in einer nicht-glykosylierten Form des Proteins, welches aber eine offenbar verringerte Stabilität aufweist. Ein Maximum an H1-Antigen wurde nach 12 h (VAK952, VAK1047) bzw. nach 10 h (VAK1091) in *batch*-Kultur

erreicht. Für VAK952 konnte eine Konzentration des H1-Proteins von etwa 0,5 µg pro mg Biotrockenmasse bestimmt werden. Der überwiegende Anteil des H1 wurde im Pellet nachgewiesen und lokalisierte in peripheren Regionen des Zellkerns und der Hefezelle. Diese Lokalisation wird wahrscheinlich durch die Transmembrandomäne des Hämagglutinins bedingt, die das Protein in zelluläre Membranen verankert. Das verkürzte H1 akkumuliert durch Fehlfaltung wahrscheinlich im JUNQ in peripheren Bereichen des Zellkerns, nahe des ERs. Die Überexpression des Fremdgens wirkt toxisch auf *K. lactis* und führt, im Vergleich zu VAK367 (nicht rekombinant) zu einem reduzierten Wachstum, insbesondere unter induzierten Bedingungen.

Für die im Anschluß erläuterten Immunisierungsstudien wurden Hefe-Biotrockenmassen mit jeweils maximaler H1-Antigenkonzentration nach dem Standardprotokoll produziert. Entsprechend wurden die Hefestämme im Schüttelkolben mit Vollmedium angezogen und zum oben ermittelten Zeitpunkt der jeweils höchsten H1-Proteinausbeute (VAK952, VAK1047: 12 h; VAK1091: 10h) geerntet. Die produzierten *K. lactis*-Stämme wurden bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

3.2 Evaluierung des immunogenen Potenzials *K. lactis*-basierter Influenzaimpfstoffe

Die folgenden Experimente hatten nun das Ziel, die Immunogenität der zuvor generierten Hefen durch subkutane Anwendung im Tiermodell zu überprüfen. Hierbei sollte zunächst die Ausbildung von HA-spezifischen, Virus-neutralisierenden Antikörpern (nAK) evaluiert werden. Bei erfolgreichem nAK-Nachweis sollte anschließend die Protektion in einer Belastungsinfektion mit Influenza-A-Virus überprüft werden (*proof of principle*). Als Versuchstiere wurden BALB/c Mäuse (Charles River Laboratories) verwendet. Aufgrund eines defekten Allels im Gen *Mx1* (*MX dynamin-like GTPase 1*), eines der wichtigsten Influenza-A-Resistenzgene, sind BALB/c Mäuse als Modellsystem für Infektionsstudien mit dem Influenzavirus sehr geeignet und weit verbreitet [14]. Für die Belastungsinfektion wurde das Influenzavirus A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) (im Folgenden mit A/PR/8/34 abgekürzt) eingesetzt. Ursprünglich aus dem Menschen isoliert, ist das Virus aufgrund zahlreicher Passagen in Maus, Frettchen sowie Hühnerembryos attenuiert und für den Menschen nicht pathogen [117, 138, 190]. In den *Mx1*-defekten BALB/c Mäusen führt das Virus allerdings zu schweren Infektionen [149]. Da das Virus für den Menschen sicher verwendbar ist, lassen sich Versuche mit A/PR/8/34 bei niedrigen Sicherheitsbedingungen durchführen.

3.2.1 Immunisierung mit H1-rekombinanter *K. lactis*

In Pilotstudien sollte zunächst das immunogene Potenzial der *K. lactis*-Stämme VAK952 (H1_{PR8}), VAK1047 (H1_{Cal}) und VAK1091 (mH1_{PR8}) untersucht werden. Dabei sollten folgende Fragestellungen geklärt werden: a) Führt die Immunisierung mit rekombinanter H1-Hefe zur Ausbildung von nAK? b) Maskiert die hefespezifische *N*-Glykosylierung des H1-Proteins unter Umständen wichtige Epitope? c) Lassen sich durch Immunisierung mit VAK1047 kreuzreaktive nAK gegen das A/PR/8/34 (H1N1) induzieren? d) Maskiert die Hefezelle selbst das H1-Antigen? Die Fragen a) bis c) wurden in Immunisierungsstudien evaluiert, in denen die eingesetzten *K. lactis*-Stämme nach Standardprotokoll produziert wurden. Für letztere Fragestellung wurde das Hefematerial von VAK952 unmittelbar vor der Injektion mit Glasperlen aufgeschlossen und als Lysat verabreicht (Protokolle siehe 2.2.2.1).

Für die Immunisierung wurde zunächst ein Schema verwendet, das bereits zuvor erfolgreich angewendet worden war [4]. Hierfür wurden die Tiere dreimal im Abstand von zwei Wochen subkutan immunisiert. Die jeweils angegebenen Hefequantitäten wurden dazu wie unter 2.2.5.2 beschrieben mit Adjuvans zu einer Emulsion präpariert und in einem Endvolumen von 100 µL pro Tier appliziert. Als Negativkontrolle dienten Tiere, die mit VAK367 immunisiert wurden. 14 Tage nach der letzten Injektion wurde das Serum der Tiere gewonnen und im Virusneutralisationstest (VNT) untersucht (**Abb. 16**).

Im ersten hier gezeigten Immunisierungsexperiment, das mit VAK952, VAK1091, VAK1047 sowie lysiertem VAK952 mit jeweils einer Impfdosis von 0,1 mg Hefe durchgeführt wurde, ließ sich lediglich in einem der Tiere ein nAK-Titer von 5 log₂ nachweisen. Dies war der Fall bei der Impfung mit VAK952-Hefe, die nach dem Standardprotokoll präpariert worden war. Da mit keinem der anderen Stämme bzw. auch nicht mit aufgeschlossener Hefe eine Immunantwort detektierbar war, wurde im Folgenden zunächst nur dieser Ansatz weiterverfolgt. Mit anderen Worten, auch wenn an dieser Stelle diese Rückschlüsse nicht zwingend sind, wurde eine Maskierung des Antigens durch die Hefe selbst ebenso als unwahrscheinlich erachtet, wie auch eine Maskierung des Antigens durch hefespezifische Glykosylierungen. Die äußerst geringe Effizienz des Impfstoffes ließ vermuten, dass die zur Immunisierung eingesetzte Hefe- / H1-Antigenkonzentration zu gering war, um in jedem Tier der Versuchsgruppe eine im VNT messbare humorale Immunantwort (nAK) zu induzieren. In der Tat konnte in Immunisierungsstudien anderer Arbeitsgruppen, die mit gereinigtem H1-Protein aus *P. pastoris* oder H5 aus HEK293S-Zellen durchgeführt wurden, gezeigt werden, dass mit

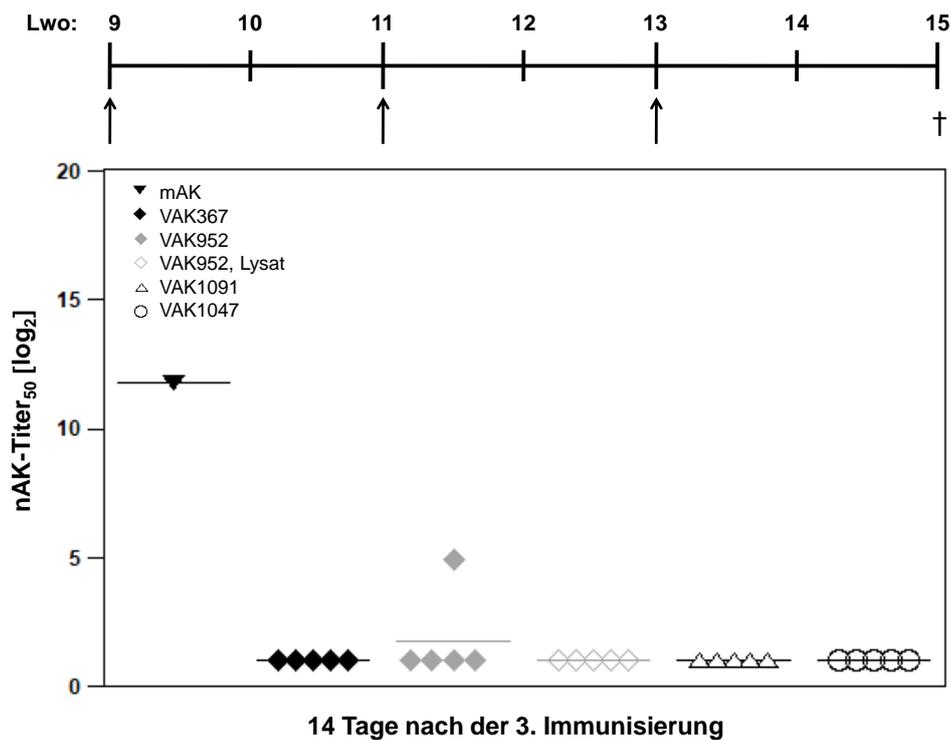


Abbildung 16: Antikörper-Nachweis nach Immunisierung mit rekombinanten *K. lactis*-Stämmen. Die Hefestämme VAK367, VAK952, VAK1047 und VAK1091 wurden im Schüttelkolben in YPD-Medium vorinkubiert und anschließend in YPL-Medium für 12 h bzw. 10 h (VAK1091) induziert. Die Kulturen wurden nach dem Standardprotokoll aufbereitet und als intakte Hefen oder als Lysat subkutan verabreicht. Hierfür wurden 9 Wochen alte, weibliche BALB/c Mäuse im Abstand von 2 Wochen dreimal subkutan mit 0,1 mg Hefe immunisiert (Pfeile). Das Serum wurde zwei Wochen nach der letzten Immunisierung gewonnen und der neutralisierende Antikörpertiter (nAK-Titer₅₀) im Virusneutralisationstest bestimmt. Aufgrund der logarithmischen Auftragung wurde Serumproben ohne nachweisbare Antikörper der Wert $\log_2(2) = 1$ zugeordnet. Lwo: Lebenswoche; mAK: Testsystem-Kontrolle (α -H1 (H37-66)).

zunehmender HA-Dosis (10-50 μ g) die Antikörpertiter anstiegen [7, 27]. Für VAK952 wurde, wie oben gezeigt, eine Konzentration von etwa 0,5 μ g H1 pro mg Hefe ermittelt (**Abb. 10**). Dementsprechend wären nach drei Applikationen mit 0,1 mg Hefe insgesamt nur 0,15 μ g H1 verabreicht worden - damit eine im Vergleich zu den genannten Experimenten mit gereinigtem Protein nur sehr geringe Quantität an H1-Antigen.

3.2.2 Erhöhung der Impfdosis von VAK952

Im folgenden Immunisierungsexperiment wurde die Hefedosis von 0,1 mg zunächst auf 1 mg pro Applikation angehoben. Das Impfschema wurde beibehalten und erneut zwei Wochen nach der letzten Immunisierung das Serum im VNT untersucht (**Abb. 17**). Nach Immunisierung mit 0,1 mg VAK952 wurden in diesem Experiment keine nAK detektiert. Dagegen ließen sich nach Immunisierung mit der 10x Impfdosis (1 mg pro Applikation) erstmals in allen Tieren der Versuchsgruppe Virus-neutralisierende AK nachweisen. Die meisten Tiere entwickelten einen Antikörpertiter von etwa 5 \log_2 , ein Tier einen

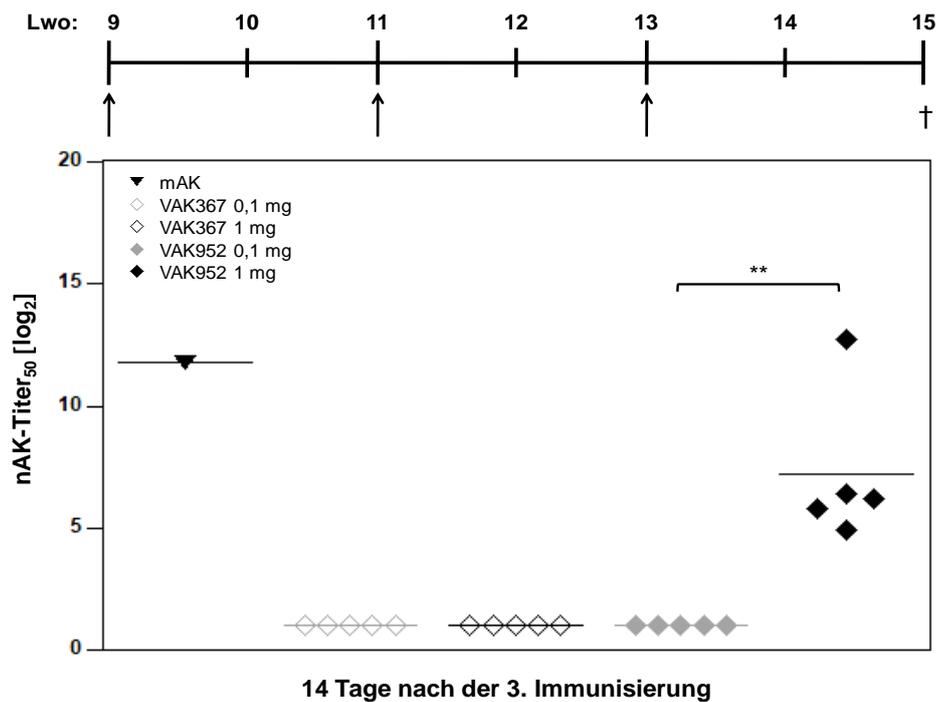


Abbildung 17: Immunisierung mit erhöhter Hefedosis von VAK952. Die Hefestämme VAK367 und VAK952 wurden wie zuvor beschrieben produziert und subkutan 0,1 mg bzw. 1 mg dreimal im 2-Wochen-Intervall verabreicht (Pfeile). Die neutralisierenden Antikörper (nAK-Titer₅₀) wurden wie zuvor beschrieben bestimmt. Um signifikante Unterschiede zu untersuchen, wurde der Student's *t*-Test verwendet. **: 0,001 < p ≤ 0,01; Lwo: Lebenswoche; mAK: Testsystem-Kontrolle (α -H1 (H37-66)).

sehr hohen Titer von 13 log₂. Mit dieser Studie wurde damit die im ersten Experiment erhaltene Indikation eindrucksvoll bestätigt, dass es möglich ist, durch Immunisierung mit einem *K. lactis*-basierten *subunit*-Impfstoff eine antivirale humorale Immunantwort in Form von neutralisierenden Antikörpern gegen das Influenza-A-Virus zu induzieren. Das Ergebnis implizierte ferner, dass das in *K. lactis* produzierte H1-Protein in einer immunogenen, möglicherweise sogar funktionellen Form in der Hefe vorliegt.

3.2.3 Evaluierung alternativer Adjuvantien

Das bisher verwendete Freund-Adjuvans (Wasser-in-Öl Emulsion) ist eines der besten bekannten Adjuvantien. Es hat aber den Nachteil, dass es schwere Nebenwirkungen verursachen kann. Entsprechend wurden im Folgeexperiment die Squalen-basierten Emulsionen AddaVaxTM und Montanide ISA 720 VG als alternative Adjuvantien getestet. AddaVaxTM ist eine Öl-in-Wasser Nano-Emulsion mit einer vergleichbaren Zusammensetzung wie MF59®, ein in Europa zugelassenes Adjuvans für Influenzaimpfstoffe [125]. Squalen wird einfacher verstoffwechselt als das Paraffinöl im Freund-Adjuvans und MF59® stimuliert sowohl angeborene, als auch adaptive Immunantworten [21]. Zudem ist das Adjuvans bekannt dafür, gut verträglich zu sein und hohe Antikörpertiter zu induzieren [21, 122]. Montanide ISA 720 VG ist eine Wasser-in-

Öl Emulsion, welche hohe Antikörpertiter in verschiedenen Tierspezies induziert. Dieser Effekt wird wahrscheinlich durch ein Antigen-Depot an der Injektionsstelle verursacht, wodurch das Immunsystem über einen längeren Zeitraum dem Antigen ausgesetzt ist [110]. Ziel der Untersuchung war es, bei dreimaliger subkutaner Applikation von 1 mg VAK952 hohe Titer an nAK zu generieren, ohne dabei lokale Reizungen zu induzieren. Um erste Erkenntnisse bezüglich der Adjuvans-Funktion der Hefe selbst zu gewinnen, wurde zudem VAK952 in *phosphate buffered saline* (PBS), d.h. ohne Adjuvans verabreicht. Hierfür wurden BALB/c Mäuse nach dem bisher verwendeten Impfschema (3 Applikationen im 2-Wochen-Intervall) mit 1 mg VAK367 oder VAK952 mit dem entsprechenden Adjuvans bzw. PBS immunisiert. Das Serum wurde im VNT auf nAK hin untersucht (**Abb. 18**). Die Immunisierungen mit VAK952 erbrachten erhebliche

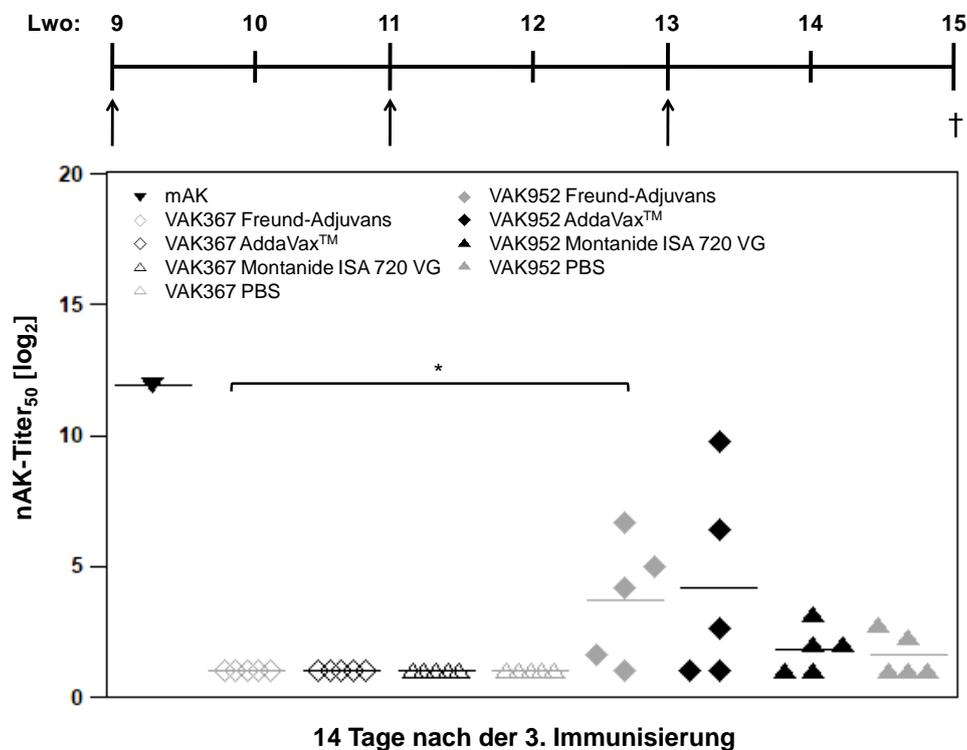


Abbildung 18: Immunisierung mit VAK952 und verschiedenen Adjuvantien. Die Hefestämme VAK367 und VAK952 wurden, wie zuvor beschrieben produziert und subkutan 1 mg mit Adjuvans oder nur in PBS gelöst, im 2-Wochen-Intervall verabreicht (Pfeile). Virus-neutralisierende Antikörper (nAK-Titer₅₀) wurden zwei Wochen nach der letzten Applikation wie zuvor beschrieben bestimmt. Um signifikante Unterschiede zu untersuchen, wurde der Student's *t*-Test verwendet. *: 0,01 < *p* ≤ 0,05; Lwo: Lebenswoche; mAK: Testsystem-Kontrolle (α -H1 (H37-66)).

Unterschiede, je nach Art des verwendeten Adjuvans. Mit Montanide ISA 720 VG konnten nur in drei von fünf Tieren nAK detektiert werden. Dies war vergleichbar mit den Ergebnissen, die nach Immunisierung mit VAK952 ohne Adjuvans (PBS) beobachtet werden konnten. Auch hier ließen sich nicht in allen Tieren Antikörper nachweisen und in beiden Gruppen wurden nur geringe Titer zwischen 2-3 log₂ erreicht. Lokale Reizungen

wurden nicht beobachtet. Folglich ist eine Verabreichung von VAK952 mit Montanide ISA 720 VG oder PBS gut verträglich, führt aber nicht zur Ausbildung hoher nAK-Titer in BALB/c Mäusen. Im Gegensatz dazu wurden nach Immunisierung von VAK952 mit Freund-Adjuvans oder AddaVax™ mit 2-10 log₂ deutlich höhere nAK-Titer nachgewiesen. Bei der Verwendung von AddaVax™ wurden durchschnittlich höhere nAK-Titer registriert und im Vergleich zur Immunisierung mit Freund-Adjuvans keine lokalen Reizungen an den Injektionsstellen beobachtet. AddaVax™ war folglich auch bei höherer Impfdosis gut verträglich und führte zur Ausbildung hoher nAK-Titer. Das Adjuvans wurde entsprechend in allen weiteren Experimenten verwendet.

3.2.4 Immunisierung mit einer maximalen Impfdosis von VAK952

In den beiden vorangegangenen Immunisierungsstudien wurde mit VAK952 zwar eine signifikante Immunantwort gegen A/PR/8/34 erhalten. Allerdings gab es große individuelle Unterschiede bei den geimpften Tieren, d.h. einige der Impflinge unterlagen nach wie vor dem Risiko, nicht ausreichend gegen eine nachfolgende Virusinfektion

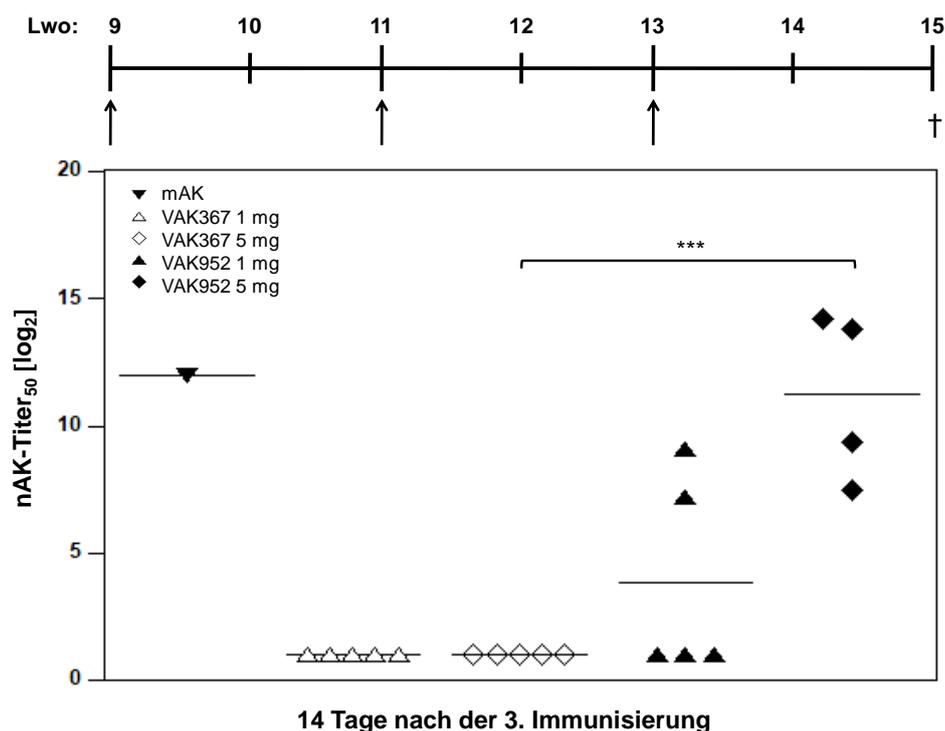


Abbildung 19: Immunisierung mit hoher Impfdosis von VAK952. Die Hefestämme VAK367 und VAK952 wurden wie zuvor beschrieben produziert und subkutan 1 mg oder 5 mg im 2-Wochen-Intervall verabreicht (Pfeile). Virus-neutralisierende Antikörper (nAK-Titer₅₀) wurden wie zuvor beschrieben zwei Wochen nach der letzten Applikation gemessen. Um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu untersuchen, wurde der Student's *t*-Test verwendet. ***: *p* < 0,001; Lwo: Lebenswoche; mAK: Testsystem-Kontrolle (α -H1 (H37-66)).

geschützt zu sein. Entsprechend wurde im Folgeexperiment die Impfdosis nochmals, auf ein Maximum von 5 mg angehoben. Zu diesem Zweck wurden BALB/c Mäuse mit 1 mg

(niedrige Dosis) bzw. mit 5 mg (hohe Dosis) von VAK367 oder VAK952 als Emulsion mit AddaVax™ dreimal im 2-Wochen-Intervall immunisiert. Zwei Wochen nach der letzten Applikation wurden die Seren im VNT auf nAK hin untersucht (**Abb. 19**). Während die Hefe VAK367, wie auch in den vorangegangenen Experimenten, keine Immunantwort induzierte, wurden mit beiden Impfdosen von VAK952 wiederum positive Resultate erhalten. Nach Applikation von 1 mg VAK952 konnten wiederholt nicht in allen Tieren nAK detektiert werden. Daraus konnte geschlossen werden, dass eine Impfdosis von 1 mg VAK952 entsprechend einen unteren Schwellenwert markiert, bei welcher mit VAK952 das Immunsystem nicht aller Individuen ausreichend stimuliert wird, um nachweisbar nAK zu generieren. Im Vergleich dazu entwickelten alle Tiere nach Verabreichung der hohen Dosis (5 mg) VAK952 sehr hohe nAK-Titer; diese lagen zwischen 7-14 log₂. Insgesamt wurden nach dreimaliger Immunisierung mit je 5 mg VAK952 etwa 8 µg H1-Antigen verabreicht. Mit diesem Experiment wurde wiederum bestätigt, dass die Höhe der nAK-Titer von der eingesetzten Dosis des Hefe-basierten Impfstoffes abhängt.

In der Summe ließ sich an dieser Stelle festhalten, dass es definitiv möglich ist, mit rekombinanter *K. lactis*, die das Volllängen-H1 produziert, und unter Verwendung des Adjuvans AddaVax™ alle Impflinge effizient zu immunisieren. Es konnte eine klare Korrelation zwischen eingesetzter Impfdosis (Antigenkonzentration) und Höhe des jeweils erzeugten Titers an nAK festgestellt werden.

3.3 Nachweis des Impfschutzes von *K. lactis*-basierten Impfstoffen

Im Folgenden galt es, den eigentlichen Impfschutz von VAK952 zu überprüfen. Zudem sollte untersucht werden ob es möglich ist, mit dem ebenfalls erzeugten VAK1047, der das H1_{Cal} von Influenza A/CA/04/09 (H1N1) produziert, eine Kreuzprotektion gegen das Influenza A/PR/8/34 (H1N1) zu erzeugen. Hierfür war es zunächst notwendig, ein Belastungsprotokoll für BALB/c Mäuse mit Influenza A/PR/8/34 zu etablieren. Dazu wurde in einem Vorversuch zunächst die mittlere Maus-letale-Dosis (MLD₅₀) bestimmt. Dabei handelt es sich um die Dosis an infektiösem Virus, bei welcher 50 % der Tiere nach Verabreichung sterben würden. Für das A/PR/8/34 wurde eine MLD₅₀ von 2,5x10² PFU in BALB/c Mäusen nach der Methode von REED und MUENCH (1938) [134] ermittelt (siehe 2.2.5.3). In der im Folgenden geschilderten Belastungsinfektion wurden die immunisierten Tiere zwei Wochen nach der letzten Applikation intranasal mit der ermittelten 5x MLD₅₀ infiziert (Protokoll siehe 2.2.5.4). Die verwendete Dosis wurde dabei so hoch gewählt, dass bei unzureichendem Schutz der Tiere ein letaler Verlauf der

Infektion erfolgen würde. Gleichzeitig musste die Dosis aber so niedrig gewählt sein, dass ein Infektionsverlauf schrittweise nachzuvollziehen war, eine sofortige schwerwiegende Infektion also vermieden wurde. Als Negativkontrollen dienten scheininfizierte Tiere (*mock*), die anstelle von Virus nur PBS intranasal appliziert bekamen. Für die serologischen Untersuchungen sollten möglichst große Volumina gewonnen und das Immunsystem der Tiere durch mehrere Blutentnahmen nicht zusätzlich belastet werden. Aus diesem Grund wurden die Impfgruppen in Untergruppen zu je 5 Tieren eingeteilt, die identisch immunisiert wurden. Das Serum wurde durch finale Blutentnahme der Tiere je einer dieser Untergruppen nach Immunisierung oder nach Virusinfektion gewonnen und stammt daher vor und nach Infektion nicht von dem gleichen Individuum.

3.3.1 Nachweis neutralisierender und HA-spezifischer Antikörper

Für das Belastungsexperiment wurden BALB/c Mäuse nach dem bisher verwendeten Impfschema (3x im 2-Wochen-Intervall) mit 5 mg VAK367, VAK952 bzw. VAK1047 oder PBS immunisiert. Um die Wirkung der *K. lactis*-basierten *subunit*-Impfstoffe mit der eines Influenza-Todimpfstoffes zu vergleichen, wurde zudem mit gereinigtem, Formalin inaktiviertem Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1) (Charles River Laboratories; insgesamt 20 µg) immunisiert (Impfstoffkontrolle). Serumproben wurden vor und nach der Belastung gewonnen und der Verlauf der Immunantwort in der bereits bekannten Weise über VNT analysiert (**Abb. 20**). Betrachtet man den Verlauf der Immunantwort zunächst mit den Immunisierungskontrollen VAK367 bzw. PBS, wird deutlich, dass keine Immunantwort während der Immunisierung, sehr wohl aber 5-7 Tage nach Beginn der Belastungsinfektion zu beobachten war. Diese Befunde entsprachen dem natürlichen Verlauf einer Infektion mit dem Influenzavirus. Die Tiere entwickelten aufgrund des fehlenden H1-Antigenkontakts keinen Immunschutz; dadurch konnte das Virus erfolgreich infizieren und im Wirt replizieren. Im Serum von nicht immunisierten, scheininfizierten Tieren (*mock*) wurden aufgrund des fehlenden Virus- bzw. H1-Antigenkontakts keine nAK nachgewiesen. Der gleiche Verlauf wie bei VAK367 bzw. PBS wurde auch bei der Mehrheit der Tiere erhalten, die mit VAK1047 immunisiert worden waren: nur ein Tier zeigte nAK gegen A/PR/8/34 mit einem hohen Titer von $10 \log_2$ nach der Immunisierung; nach Virusinfektion war in allen Tieren eine Immunantwort zu beobachten. Daraus wurde geschlossen, dass sich bei der Mehrheit der Impflinge kein effizienter Immunschutz ausgebildet hatte, während ein Tier kreuzreaktive nAK entwickelte (siehe auch unten). Nach Immunisierung mit VAK952

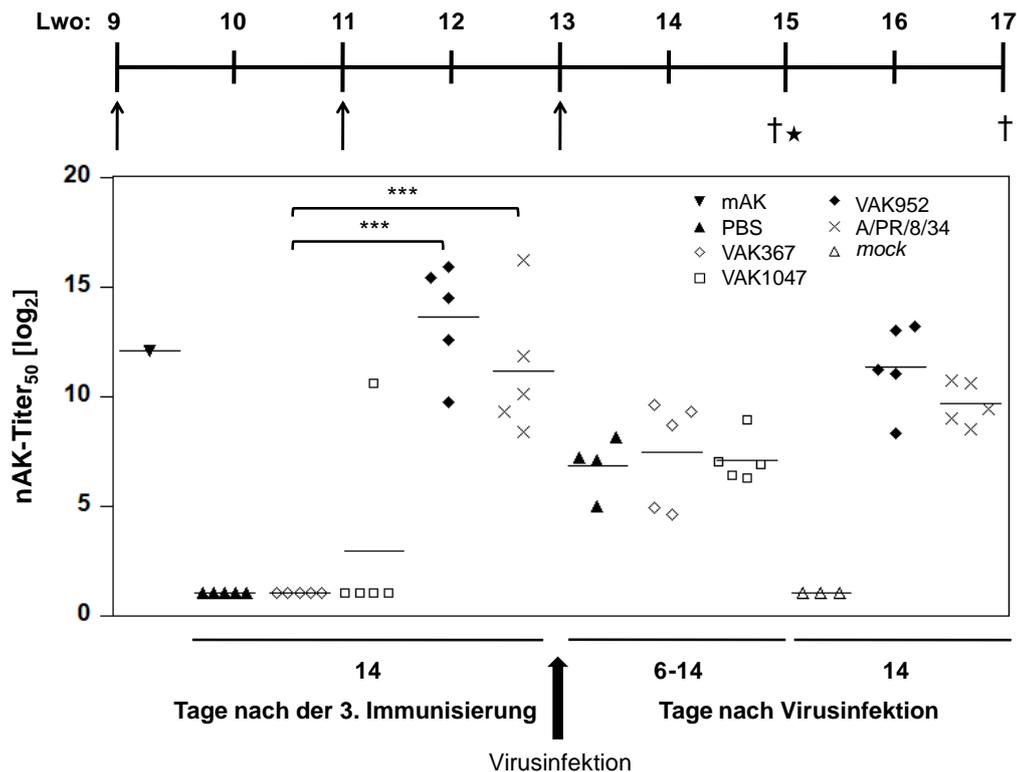


Abbildung 20: Immunisierung mit *K. lactis*-basierten subunit-Impfstoffen und Belastungsinfektion. Die Hefestämme VAK367, VAK952 und VAK1047 wurden, wie zuvor beschrieben, produziert und subkutan verabreicht. Hierfür wurden 9 Wochen alte, weibliche BALB/c Mäuse im Abstand von zwei Wochen dreimal subkutan mit 5 mg Hefe, der Impfstoffkontrolle zusammen mit AddaVax™ oder nur PBS immunisiert (Pfeile). Zwei Wochen nach der letzten Applikation wurden die Tiere mit der 5x MLD₅₀ des Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1) intranasal infiziert (Stern). Zu den angegebenen Zeitpunkten (†) sowie während des Beobachtungszeitraums, wurde das Serum der Tiere gewonnen und der nAK-Titer₅₀ wie zuvor beschrieben bestimmt. Um signifikante Unterschiede zu untersuchen, wurde der Student's *t*-Test verwendet. ***: *p* < 0,001; Lwo: Lebenswoche; mAK: Testsystem-Kontrolle (α -H1 (H37-66)); mock: scheininfizierte Tiere, denen nur PBS intranasal verabreicht wurde; Impfstoffkontrolle: Formalin inaktiviertes Virus A/PR/8/34 (H1N1), prime: 10 μ g, booster: je 5 μ g.

wurden im Serum aller Tiere erneut hohe nAK-Titer zwischen 9-16 log₂ nachgewiesen. Die Titer waren sogar vergleichbar zu der Gruppe, die mit inaktiviertem Virus immunisiert worden war (8-16 log₂). Da es nach Verabreichung des Influenzavirus in beiden Gruppen nicht zu einem Anstieg, sondern eher zu einer leichten Abnahme der nAK-Titer kam, wurde geschlossen, dass diese Tiere vor einer Infektion / Replikation des Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1) geschützt waren (siehe auch weitere Resultate unten).

Um im nächsten Schritt zu überprüfen, ob die im Antiserum befindlichen nAK HA-spezifisch waren, wurden die vor der Belastungsinfektion gewonnenen Seren im Western-Blot untersucht (**Abb. 21**). Dazu wurde einerseits gegen zytoplasmatischen Proteinextrakt (zE) von MDCK-Zellen getestet, die entweder mit Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1) infiziert waren (+), oder mit PBS scheininfiziert wurden (-). Zusätzlich wurde gegen das gereinigte homologe H1_{Cal} getestet. Hierfür wurde die im Baculovirus-

Insektenzell-System hergestellte H1-Ektodomäne (aa 1-529) von Influenza A/CA/04/09 (H1N1) von Sino Biological Inc. verwendet. Die Proteine wurden in einer SDS-PAGE nach Größe aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Als Primärantikörper wurden die murinen Antiseren von Versuchstieren aus der oben beschriebenen Immunisierungsstudie (aufgeführt sind 2 aus VAK952-; je 1 aus VAK367-, VAK1047- bzw. PBS-Immunisierung und 2 aus Immunisierung mit der Impfstoffkontrolle) bzw. ein monoklonaler AK (mAK) gegen H1_{PR8} (Positivkontrolle) eingesetzt. Zur Positivkontrolle ist anzumerken, dass der verwendete mAK ein lineares Epitop (SFERFEIFPKE, aa 127-137) innerhalb der HA1-Domäne erkennt. Da diese unter reduzierenden Bedingungen (nach SDS-PAGE) nicht mehr an die HA2-Domäne (25 kDa) assoziiert ist, weist der mAK entsprechend nur HA1 (55 kDa) und den Vorläufer HA0 (ca. 80 kDa) nach. In der Tat ließen sich beide Proteine mit dem mAK in zE (+) nachweisen. Mit Seren der Kontrolltiere, die mit PBS oder VAK367 immunisiert wurden, konnten keine der drei

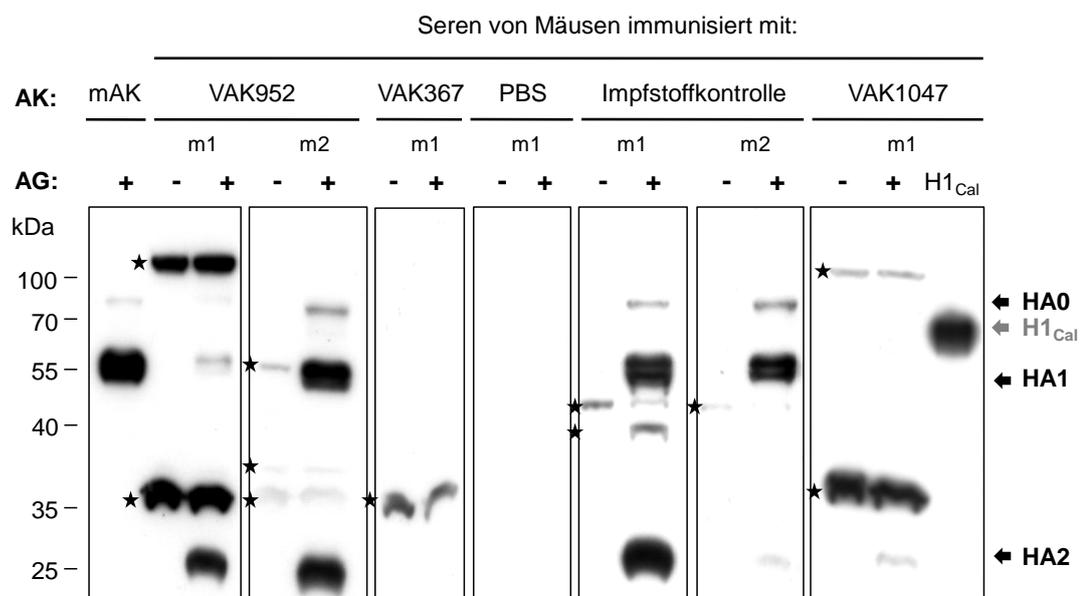


Abbildung 21: Nachweis HA-spezifischer Antikörper. Die vor der Belastungsinfektion gewonnenen Seren wurden im Western-Blot auf HA-spezifische Antikörper untersucht. Als Antigen wurde zytoplasmatischer Extrakt (10 µg pro Spur) von Influenza A/PR/8/34 (H1N1) infizierten (+) oder mit PBS scheininfizierten (-) MDCK-Zellen bzw. 0,5 µg gereinigtes H1_{Cal} (Sino Biological Inc., aa 1-529) in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. Der Proteinnachweis erfolgte unter Verwendung der murinen Antiseren (Verdünnung: 1:8000) oder α -HA1 (CM1-1; mAK) als Primärantikörper sowie dem Sekundärantikörper *Goat anti-Mouse*-HRP. Die Bildgebung erfolgte über Chemolumineszenz wie zuvor beschrieben. H1_{PR8}-spezifische Signale sind mit einem schwarzen Pfeil und das H1_{Cal}-spezifische Signal mit einem grauen Pfeil entsprechend gekennzeichnet. Unspezifische Signale werden auf der entsprechenden Höhe mit einem Stern markiert. m1-2: Serum von individuellen Versuchstieren, AK: Antikörper; AG: Antigen.

HA-Formen detektiert werden. Jedoch wurden mit Seren einiger der mit Hefe (VAK367, VAK952 und VAK1047) immunisierten Tiere sowohl im zE (+), als auch im zE (-) Banden

mit einer Größe von etwa 35 kDa bis > 100 kDa nachgewiesen. Um welche Proteine es sich dabei handelt wurde nicht näher untersucht. Bei Blots mit dem gereinigten H1 konnte mit den Antiseren aller Tiere, die mit VAK1047 geimpft wurden, ein Nachweis des Proteins beobachtet werden. In der gezeigten Abbildung ist nur ein Test mit dem Serum einer mit VAK1047 immunisierten Maus exemplarisch gezeigt. Dieses Serum zeigte auch eine (schwache) Reaktion gegen HA2. Daraus wurde geschlossen, dass mit VAK1047 grundsätzlich erfolgreich immunisiert werden konnte, dass die in der Mehrzahl der Tiere erzeugten Antikörper jedoch nicht kreuzreaktiv im VNT (durchgeführt gegen A/PR/8/34) bzw. auch nicht protektiv gegen A/PR/8/34 waren. Die getesteten Seren aus den mit VAK952 bzw. mit inaktiviertem Virus (Impfstoffkontrolle) immunisierten Tieren zeigten alle eine Reaktion gegen HA0, HA1 und HA2. Eine HA-spezifische Reaktion konnte im Serum aller Tiere, die mit VAK952 immunisiert wurden nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

3.3.2 Protektion nach Immunisierung mit rekombinanter *K. lactis*

Finalen Aufschluss über die Protektion der Tiere nach Immunisierung ergab die Auswertung der Symptome und Überlebensraten nach der Belastungsinfektion mit Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1) (**Abb. 22**). Nach Verabreichung des Virus wurden das Gewicht sowie klinische Symptome der Tiere mehrfach täglich über einen Zeitraum von 14 Tagen dokumentiert. Bei unzumutbaren klinischen Symptomen und / oder einem Körpergewichtsverlust von > 20 % wurden die Tiere sofort durch finale Blutentnahme unter tiefer Narkose euthanasiert. Wie gezeigt, entwickelten alle Tiere der Negativkontrollen (PBS, VAK367) aber auch die Tiere, die mit VAK1047 immunisiert worden waren, Symptome und die Mehrzahl dieser Tiere musste vor Ablauf des Beobachtungszeitraums euthanasiert werden. Da mit den VAK1047-immunisierten Tieren eine ähnliche Überlebensrate wie mit den VAK367-immunisierten Tieren beobachtet wurde, verstärkte sich der oben gewonnene Eindruck einer (wenn überhaupt) nur minimalen Kreuzreaktion / -protektion durch VAK1047. Alle Tiere, die mit 5 mg VAK952 immunisiert wurden, zeigten keine Symptome einer Erkrankung und überlebten die ansonsten letale Belastungsinfektion mit A/PR/8/34 (H1N1). Diese 100%ige Protektion war vergleichbar mit der Gruppe, welche mit dem inaktivierten Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1) immunisiert wurde.

Insgesamt lässt sich nochmals festhalten, dass nach dreimaliger, subkutaner Immunisierung mit 5 mg VAK1047 nur vereinzelt kreuzreaktive AK gegen das Virus A/PR/8/34, aber in allen Serumproben H1_{CAI}-spezifische AK nachgewiesen werden

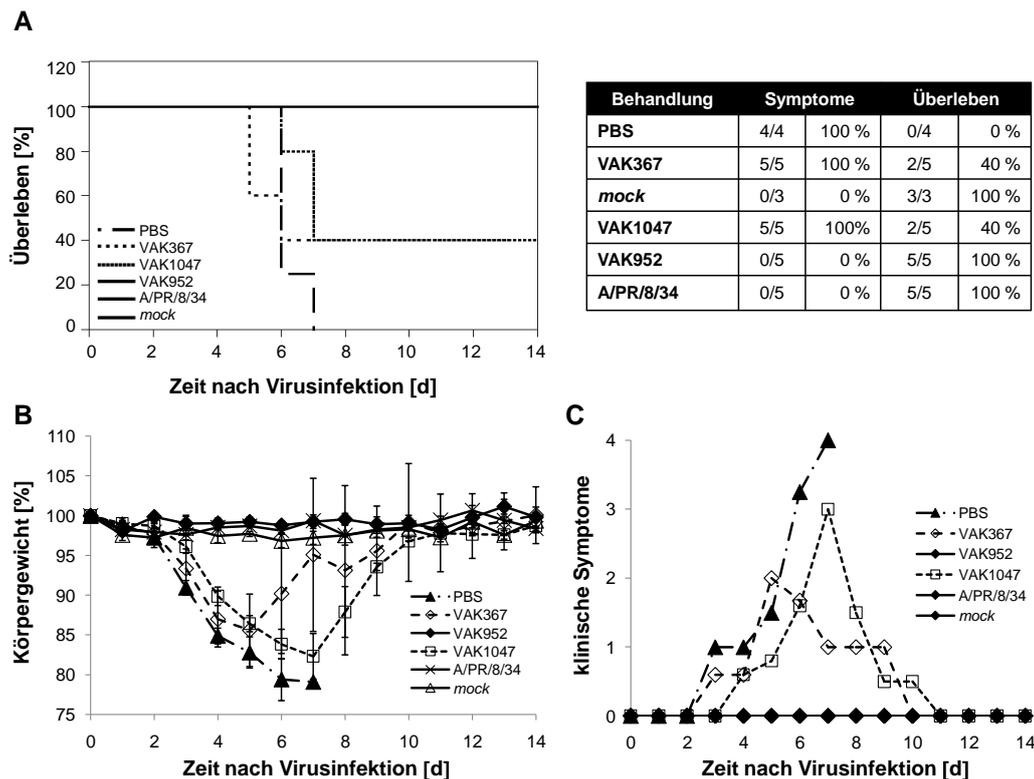


Abbildung 22: Symptome und Überlebensraten nach Belastungsinfektion. Nach Infektion mit der 5x MLD₅₀ des Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1), wurde das Überleben (A), das Gewicht (B) sowie klinische Symptome (C) der Tiere über einen Zeitraum von 14 Tagen mehrfach täglich untersucht. Für die klinischen Symptome wurde ein Score von 0-4 festgelegt, welcher für jede Gruppe gemittelt wurde (0: Ohne Auffälligkeiten; 1: Fell glanzlos, leicht gesträubt, Gewichtsverlust > 5 % < 10 %; 2: Fell glanzlos und gesträubt, reduzierte Aktivität, Gewichtsverlust 10-15 %; 3: Fell ungepflegt, Bewegungsunlust, gekrümmte Haltung, Körpergewichtsverlust von 15-20 %; 4: Fell ungepflegt, Bewegungsunlust, gekrümmte Haltung, Gewichtsverlust > 20 %). Mock: scheininfizierte Tiere, denen nur PBS intranasal verabreicht wurde; Impfstoffkontrolle: Formalin inaktiviertes Virus (A/PR/8/34).

konnten. In einer letalen Belastungsinfektion wurde jedoch kein ausreichender Schutz gegen das homosubtypische Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1) erreicht. Mit VAK952 wurden hohe nAK-Titer im VNT nachgewiesen, und zudem HA-spezifische AK im Western-Blot. In einer letalen Belastungsinfektion wurde eine 100%ige Schutzwirkung ohne jede Erkrankung in BALB/c Mäusen durch Immunisierung mit VAK952 erreicht. Die protektive Wirkung des hier generierten *subunit*-Impfstoffes war dementsprechend vergleichbar zu der, die nach Immunisierung mit inaktiviertem Vollvirus erreicht wurde. Damit konnte erstmals mit einem *K. lactis*-basierten *subunit*-Impfstoff eine wirksame, voll protektive Immunantwort gegen eine letale Infektion mit einem Virus der umhüllten Klasse gezeigt werden. Dies wurde als vorläufiges *proof of principle* im Modellorganismus Maus angesehen.

3.4 Dosis-Wirkungs-Analyse des *subunit*-Impfstoffes VAK952

In den zuvor durchgeführten Studien war mit 1 mg und 5 mg VAK952 immunisiert worden. Trotz der Verwendung des gut vertäglichen Adjuvans AddaVax™ zeigten sich nach Applikation von 5 mg VAK952 vereinzelt lokale Reizungen in Form von geröteten Stellen und Gewebeschwellungen an der Injektionsstelle. Da bei der geringeren Dosis keine derartigen Nebenwirkungen auftraten, wurde vermutet, dass diese durch die hohe Hefedosis verursacht werden. In einem weiteren Experiment galt es daher zu überprüfen, ob eine Dosis zwischen 1 und 5 mg ebenfalls zu einer vergleichbaren Immunantwort führt und lokale Reizungen dadurch vermindert werden konnten. Hierfür wurden BALB/c Mäuse mit 5, 2 und 1 mg dreimal im 2-Wochen-Intervall immunisiert. Die Wirksamkeit wurde anhand der ausgebildeten nAK-Titer im VNT (**Abb. 23**) und der Schutzwirkung in einer sich anschließenden Belastungsinfektion (**Abb. 24**) untersucht. Da in vorangegangenen Studien eine Dosis von 1 mg VAK952 nicht in jedem Tier zur Ausbildung nAK führte, wurde ein nicht ausreichender Schutz dieser Dosis gegen eine letale Virusinfektion erwartet und daher nur die Tiere der anderen beiden Gruppen infiziert. Um die Schutzwirkung des *K. lactis*-basierten *subunit*-Impfstoffes VAK952 weiter zu charakterisieren, wurde zudem die Viruslast vier Tage nach der Virusinfektion im Lungengewebe der Tiere untersucht. Hierfür wurde die Lunge entfernt, mechanisch aufgeschlossen und der Gewebeüberstand im Plaque-Assay auf die Präsenz von Virus hin untersucht (**Abb. 25**). Neben pathologischen Auffälligkeiten des Organs wurde zudem der Lungenindex bestimmt. Dieser gibt Aufschluss über das Verhältnis des Organs zum finalen Körpergewicht, was wiederum Rückschlüsse auf pathologische Veränderungen zulässt. So sollte final die Replikationsfähigkeit des Influenza-A-Virus in den immunisierten Tieren überprüft werden.

3.4.1 Korrelation zwischen Impfdosis und Antikörpertiter

Die durchgeführte Immunisierung zeigte mit den Negativkontrollen und auch im Falle der mit 1 mg VAK952 durchgeführten Immunisierung den gewohnten Verlauf (**Abb. 23**). Bei applizierten 1 mg ließen sich im Serum von drei der fünf Tiere nAK-Titer von 5-9 log₂ nachweisen. Nach Immunisierung mit 5 mg VAK952 entwickelten wiederum alle Tiere hohe nAK-Titer zwischen 9-15 log₂. Nach Immunisierung mit 2 mg VAK952 wurden in der überwiegenden Anzahl der Versuchstiere hohe nAK-Titer von 5 und 13 log₂ gemessen. Zwei der insgesamt zehn getesteten Tiere zeigten keine Serokonversion. Die Titer nach Immunisierung mit 2 mg VAK952 waren deutlich höher als die nach Verabreichung von 1 mg, aber niedriger als solche, die nach Immunisierung mit 5 mg

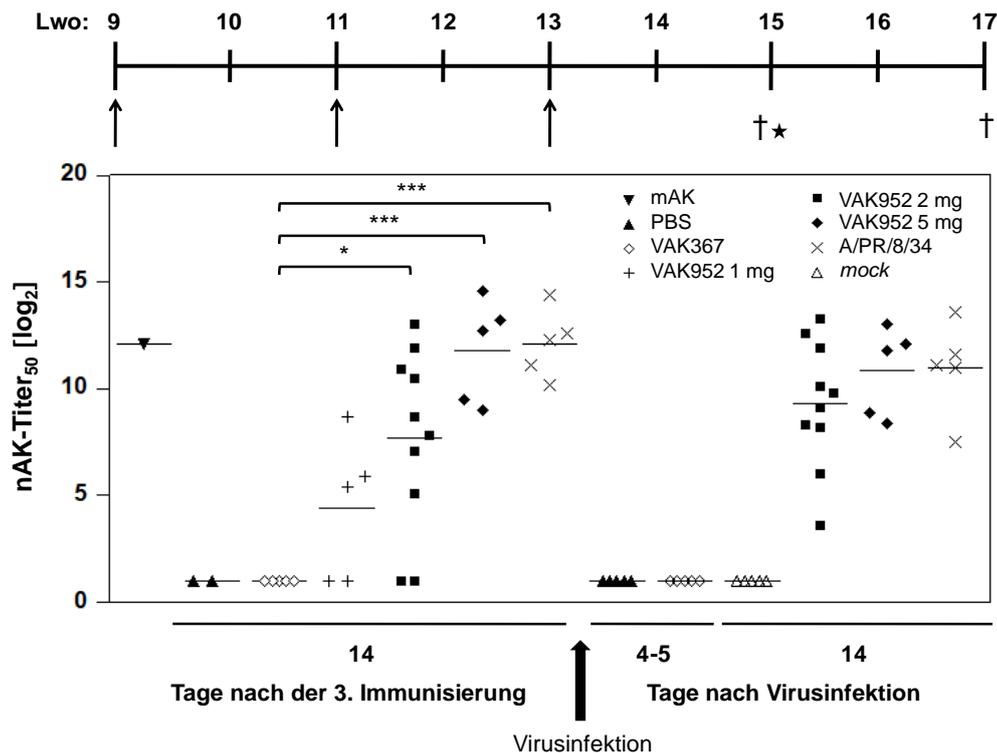


Abbildung 23: Antikörper-Titer nach Immunisierung mit verschiedenen Impfdosen von VAK952 vor und nach Virusinfektion. Die Hefestämmen wurden wie zuvor beschrieben produziert und subkutan verabreicht (Pfeile). Dabei wurde VAK952 mit den Konzentrationen 5 mg, 2 mg oder 1 mg, VAK367 mit 5 mg und die Impfstoffkontrolle wie zuvor beschrieben mit AddaVax™ injiziert. Eine zusätzliche Gruppe wurde nur mit PBS immunisiert. Zwei Wochen nach der letzten Applikation wurden die Tiere mit der 5x MLD₅₀ des Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1) intranasal infiziert (Stern). Zu den angegebenen Zeitpunkten (†) sowie während des Beobachtungszeitraums, wurde das Serum der Tiere gewonnen und, wie zuvor beschrieben, die Virus-neutralisierenden Antikörper (nAK-Titer₅₀) bestimmt. Um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu untersuchen, wurde der Student's t-Test verwendet. *: 0,01 < p ≤ 0,05; ***: p < 0,001; Lwo: Lebenswoche; mAK: Testsystem-Kontrolle (α-HA1 (H37-66)); mock: scheininfizierte Tiere, denen nur PBS intranasal verabreicht wurde; Impfstoffkontrolle: Formalin inaktiviertes Virus A/PR/8/34 (H1N1).

gemessen wurden. Die Streuung der einzelnen Werte in den Gruppen mit den niedrigen Impfdosen (1 mg, 2 mg) war im Vergleich zu der Gruppe mit der maximalen Dosis von 5 mg höher. Nach Belastung wurden bei den mit 2 mg behandelten Tieren kaum veränderte Virus-neutralisierende AK-Titer, bei den mit 5 mg behandelten Tieren leicht verminderte Titer festgestellt.

3.4.2 Korrelation zwischen Impfdosis und Schutzwirkung

Bei der Analyse der Symptomatik nach der Belastungsinfektion wurde deutlich, dass sowohl die Immunisierungen mit 5 mg, als auch mit 2 mg VAK952 zu einer kompletten Protektion führten, d.h. bei keinem der so immunisierten Tiere zeigten sich Krankheitssymptome und keines musste vor Beendigung des Beobachtungszeitraums euthanasiert werden (**Abb. 24**). Bei der Analyse der Viruslast im Lungengewebe vier

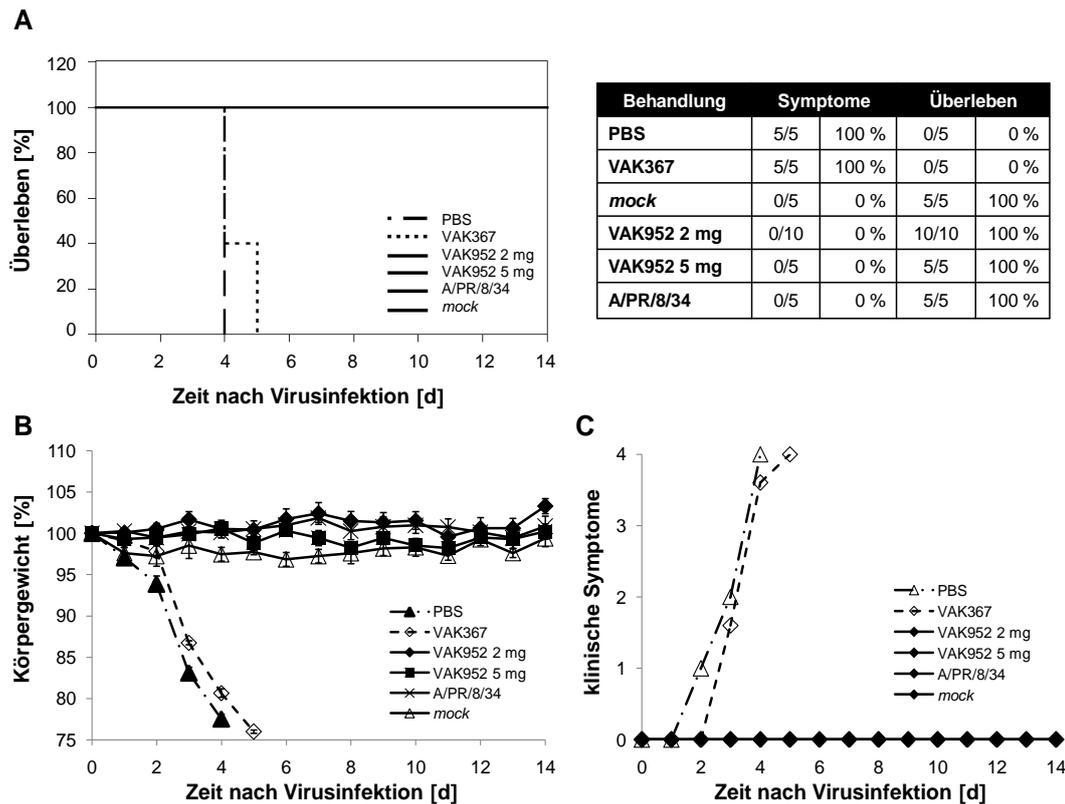


Abbildung 24: Symptome und Überlebensraten nach Belastungsinfektion. Nach Infektion mit der 5x MLD₅₀ des Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1), wurde das Überleben (A), das Gewicht (B) sowie klinische Symptome (C) der Tiere über einen Zeitraum von 14 Tagen mehrfach täglich untersucht. Für die klinischen Symptome wurde der bereits in Abb. 22 ausgeführte Score von 0-4 verwendet. *Mock*: scheininfizierte Tiere, denen nur PBS intranasal verabreicht wurde. Impfstoffkontrolle: Formalin inaktiviertes Virus A/PR/8/34 (H1N1).

Tage nach Beginn der Infektion wurden im Lungengewebe von Tieren, die mit PBS (Infektionskontrolle) oder VAK367 immunisiert worden waren, wie erwartet hohe Titer des Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1) von 6-8 log₁₀ plaque forming units (PFU) pro g Lungengewebe gemessen (Abb. 25). Die Tiere zeigten deutliche pathologische Veränderungen des Gewebes (Läsionen, Lungenödeme), entsprechend erkennbare Anzeichen einer Infektion mit dem Influenza-A-Virus, sowie einen erhöhten Lungenindex. Letzterer war bei den mit PBS behandelten Mäusen deutlich höher, als bei den mit VAK367 immunisierten Tieren. Im Vergleich dazu ließen sich in allen Tieren, die mit 5 mg VAK952 oder der Viruskontrolle immunisiert wurden, keine Viruspartikel im Plaque-Assay nachweisen. Zudem zeigte keines der Tiere pathologische Auffälligkeiten oder einen deutlich erhöhten Lungenindex, was auf einen effizienten Schutz gegen eine Infektion / Replikation des Influenza-A-Virus schließen lässt. Im Vergleich dazu wurde nach Immunisierung mit 2 mg VAK952 in zwei von zehn Tieren der geringste messbare Virustiter von 1 log₁₀ PFU pro g Lungengewebe gemessen. Pathologische Veränderungen des Lungengewebes, mit bloßem Auge detektiert, konnten nicht festgestellt werden.

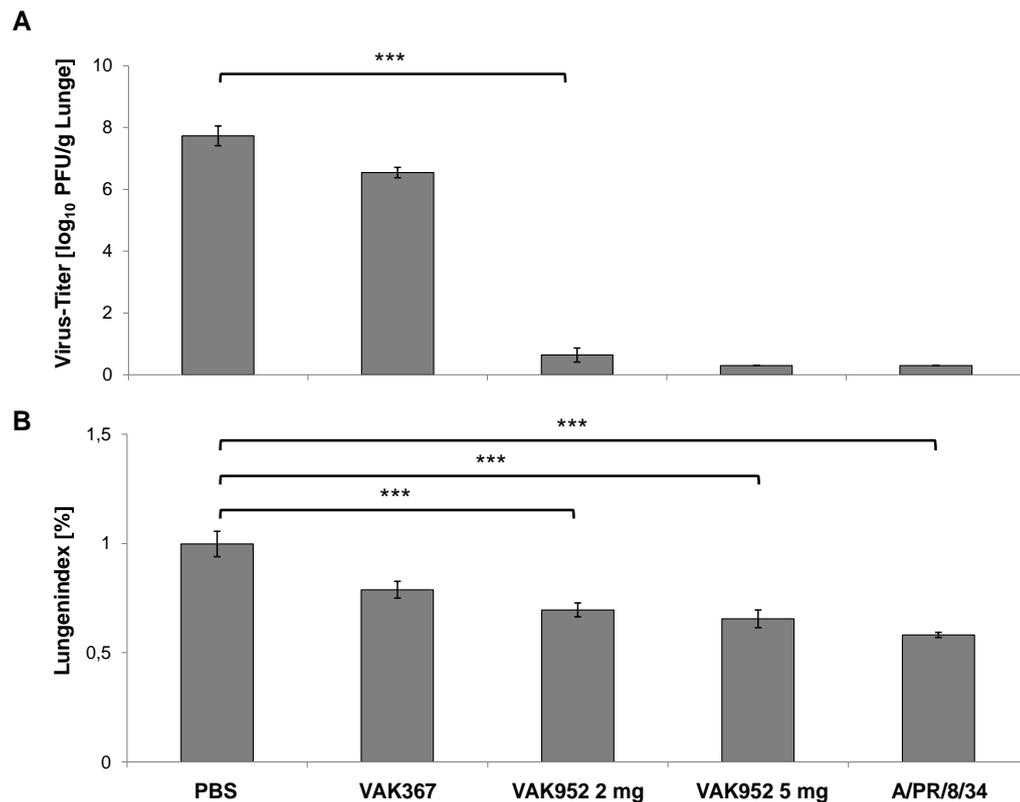


Abbildung 25: Bestimmung der Viruslast im Lungengewebe immunisierter Tiere 4 Tage nach Virusinfektion. (A) Immunisierung und Virusinfektion wurden wie in Abb. 23 beschrieben durchgeführt. Vier Tage nach Beginn der Belastungsinfektion wurden die Tiere euthanasiert und die Lunge entnommen. Diese wurde gewogen und mechanisch aufgeschlossen. Unter Verwendung des Gewebeüberstandes wurde im Plaque-Assay der Virustiter pro g Lungengewebe bestimmt. (B) Lungenindex. Aufgrund der logarithmischen Auftragung, wurde Proben, in denen keine Viren durch Plaque-Formierung nachgewiesen werden konnten, der Wert $\log_{10}(2) = 0,3$ zugeordnet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 5-10 Tieren. Um signifikante Unterschiede zu untersuchen, wurde der Student's *t*-Test verwendet. ***: $p < 0,001$.

Mit diesem Experiment wurden weitere wertvolle Daten erhalten. Zum einen konnten durch die Verwendung einer geringeren Dosis an Hefe Nebenwirkungen an der Injektionsstelle vermieden werden. Zum anderen konnte mit der gut verträglichen Quantität von 2 mg verwendeter Impfdosis eine ebenfalls komplett protektive Wirkung erzielt werden; allerdings belässt die Impfung eine geringe Konzentration an infektiösen Viruspartikeln im Lungengewebe. Zudem konnte hier nun sehr klar demonstriert werden, dass eine direkte Korrelation zwischen protektivem Effekt und Quantität an verwendetem Hefeimpfstoff / H1-Antigen besteht.

3.5 Evaluierung des Impfschemas

Neben hoher Wirksamkeit und guter Verträglichkeit ist Kosteneffizienz und assoziiert hiermit eine einfache Handhabung / Anwendung ein wichtiger Faktor für den Erfolg eines Impfstoffes in der Nutztierhaltung. Subkutan anzuwendende Impfstoffe, die nur ein- bzw. zweimal anzuwenden sind, werden daher bevorzugt. Aus diesem Grund sollte das bisher

verwendete Impfschema (3 Applikationen im 2-Wochen-Intervall) auf zwei (klassisches *prime-boost*-Schema im 2-Wochen-Intervall) bzw. im Idealfall sogar auf nur eine Injektion (*one shot*) reduziert werden.

3.5.1 Antikörper-Nachweis nach Anwendung verkürzter Impfschemata

Im folgenden Experiment wurde die hohe Dosis (5 mg) von VAK952 unter Anwendung dieser Impfschemata verabreicht. Da die Wirksamkeit des verkürzten Impfintervalls bislang noch unbekannt war, wurde lediglich nach der *prime-boost*-Immunsierung eine Belastungsinfektion mit dem Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1) durchgeführt. Im Falle der *prime-boost*-Impfung wurde das Serum der Tiere zwei, im Falle der *one shot*-Immunsierung zwei bzw. sechs Wochen nach der (letzten) Applikation gewonnen und im VNT auf nAK untersucht. Wie in **Abb. 26** gezeigt, wurden im Serum von zwei der fünf Tiere zwei Wochen nach der *one shot*-Immunsierung nAK in geringen Titern von

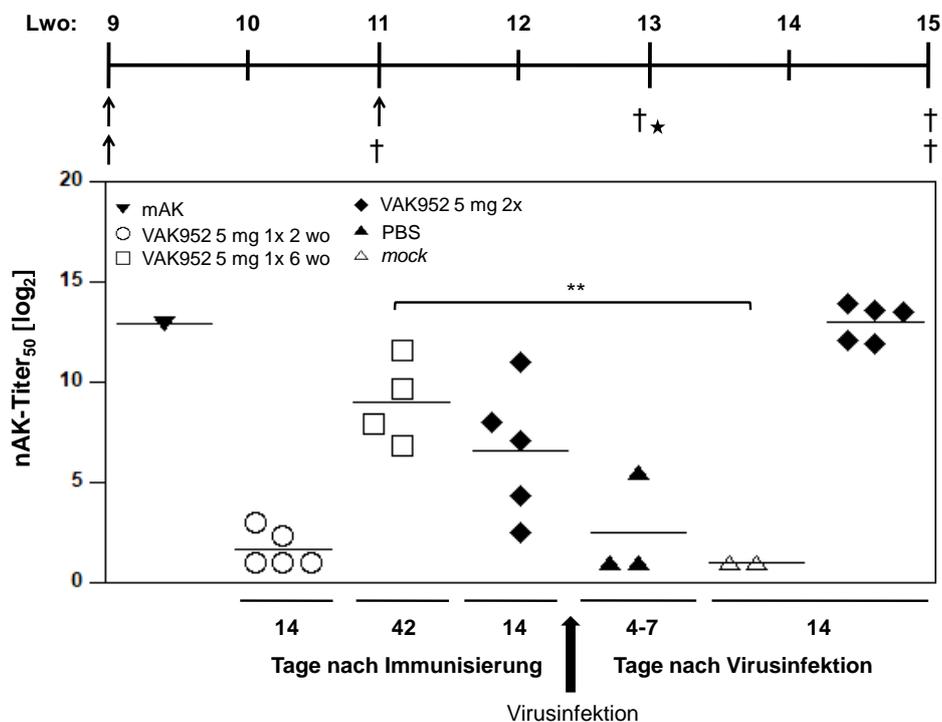


Abbildung 26: Antikörper-Nachweis nach verkürztem Impfschema. Der Hefestamm VAK952 wurde wie zuvor beschrieben produziert und subkutan verabreicht. Es wurden jeweils 5 mg VAK952 oder PBS *prime-boost* (2 Wochen-Intervall) oder 5 mg VAK952 *one shot* immunisiert (Pfeile). Zwei Wochen nach dem *boost* wurden Tiere, die mit PBS oder VAK952 immunisiert wurden, mit der 5x MLD₅₀ des Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1) intranasal infiziert (Stern). Zu den angegebenen Zeitpunkten (†) sowie während des Beobachtungszeitraums, wurde das Serum der Tiere gewonnen und der nAK-Titer₅₀ wie zuvor beschrieben bestimmt. Um signifikante Unterschiede zu untersuchen, wurde der Student's *t*-Test verwendet. **: 0,001 < p ≤ 0,01; *mock*: scheininfizierte Tiere, denen nur PBS intranasal verabreicht wurde; Lwo: Lebenswoche; wo: Wochen; mAK: Testsystem-Kontrolle (α-H1 (H37-66)).

ca. 3 log₂ nachgewiesen. Nach sechs Wochen ließen sich dann interessanterweise bei allen Tieren nach der initialen Injektion hohe nAK-Titer von 7-12 log₂ nachweisen. Nach

prime-boost-Immunsierung konnten ebenfalls in allen Seren der Tiere nAK nachgewiesen werden, allerdings mit etwas geringeren Titern (4-11 log₂). Nach Virusinfektion kam es bei der Gruppe, die *prime-boost* immunisiert wurde, zu einem deutlichen Anstieg der nAK-Titer. Nach den Erfahrungen aus den zuvor durchgeführten Infektions-Experimenten deutet dies auf einen unzureichenden Schutz gegen eine Infektion / Replikation des Virus hin (siehe auch 3.4).

Als Zwischenfazit kann hier festgehalten werden, dass es mit beiden verkürzten Immunisierungsschemata möglich war, eine starke Immunantwort mit 5 mg an VAK952 zu induzieren. Unerwartet deutlich war dies bei der *one shot*-Immunsierung nach sechs Wochen. Die lang anhaltende Zunahme der AK deutete auf ein Antigen-Depot des Hefeimpfstoffes hin, in dem das Antigen über einen langen Zeitraum dem Immunsystem präsentiert wird (siehe Diskussion).

3.5.2 Protektion nach verkürztem Impfschema

Aufschluss über die Wirksamkeit der gebildeten AK im *prime-boost*-Schema gab wiederum das Belastungsexperiment (**Abb. 27**). Interessanterweise überlebten alle

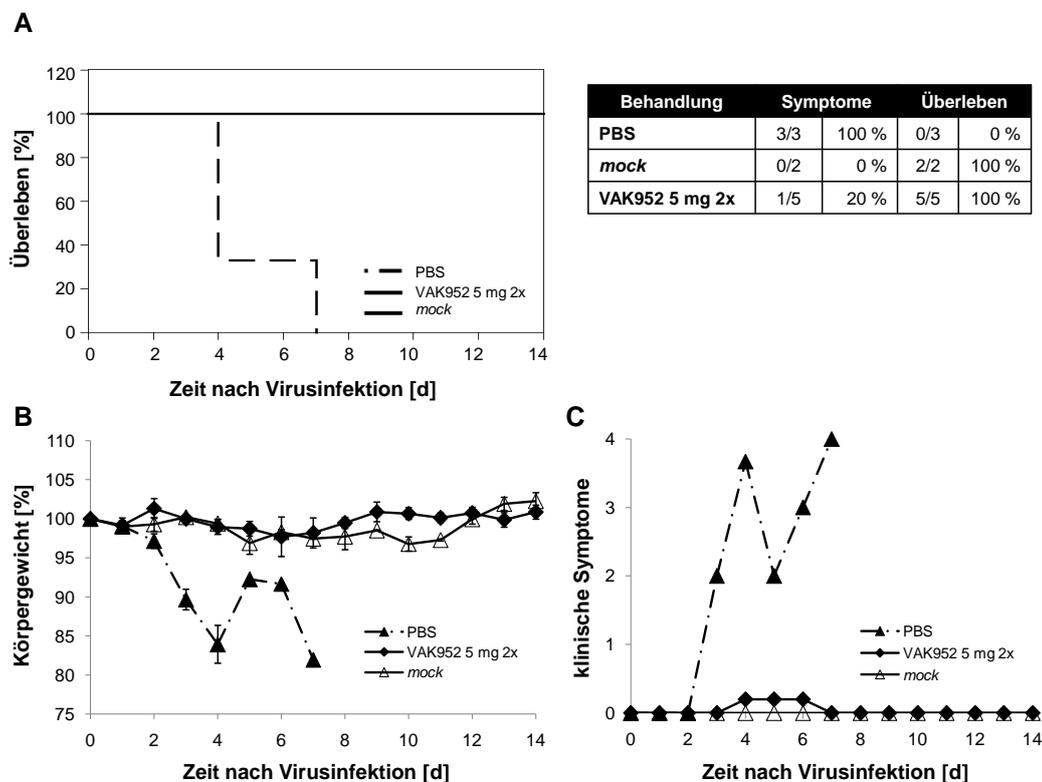


Abbildung 27: Belastungsinfektion mit A/PR/8/34 (H1N1) nach *prime-boost*-Immunsierung. Nach Infektion mit der 5x MLD₅₀ des Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1), wurde das Überleben (**A**), das Gewicht (**B**) sowie klinische Symptome (**C**) der Tiere über einen Zeitraum von 14 Tagen mehrfach täglich untersucht. Für die klinischen Symptome wurde der in Abb. 22 ausgeführte Score von 0-4 verwendet. *Mock*: scheininfizierte Tiere, denen nur PBS intranasal verabreicht wurde.

Tiere, die zweimal mit 5 mg VAK952 immunisiert wurden, die für alle Kontrolltiere ansonsten letale Belastungsinfektion. Eins der fünf Tiere zeigte beginnend ab Tag vier nach der Infektion glanzloses, leicht gesträubtes Fell und an Tag sechs einen auffälligen Verlust des Körpergewichts, der jedoch unter 10 % blieb (Score 1). Anschließend erholte sich das Tier wieder und erreichte an Tag acht wieder Normalgewicht.

In der Summe dieser Studie lässt sich festhalten, dass die Anwendung des *K. lactis*-basierten Impfstoffes VAK952 in einem klassischen *prime-boost*-Schema offenbar ausreichend ist, um eine hohe Protektion gegen eine nachfolgende Virusinfektion zu vermitteln. Die Daten zeigten jedoch auch, dass dieser Schutz möglicherweise nicht vollständig ist. Zudem wurde gezeigt, dass nach *one shot*-Immunisierung und einem verlängerten Inkubationsintervall vergleichbar hohe AK-Titer wie nach der *prime-boost*-Immunisierung generiert wurden. Erste Hinweise auf ein mögliches Antigen-Depot des Hefeimpfstoffes wurden dargelegt. Fasst man die Daten aller bisher durchgeführten Immunisierungen und Virusinfektionen zusammen, so ergibt sich die Aussage, dass ein erreichter nAK-Titer von ca. $7 \log_2$ ausreichend ist, um bei Immunisierung eine vollständige Protektion gegen das Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1) zu erreichen.

3.6 Prozessierung *K. lactis*-basierter *subunit*-Impfstoffe

Im Vergleich zu chemisch hergestellten Arzneimitteln bestehen Impfstoffe aus biologischen Ausgangsmaterialien und unterliegen daher einer gewissen Variabilität [108]. Biologische Stoffe sind oft instabil und Proteine sowie andere Makromoleküle reagieren empfindlich auf Umweltfaktoren wie Licht, Hitze oder Strahlung. Dadurch kann die Sicherheit und Wirksamkeit des Impfstoffes beeinträchtigt werden [191]. Da die Wirksamkeit des frisch produzierten *K. lactis*-basierten *subunit*-Impfstoffes VAK952 bereits erfolgreich im Mausmodell demonstriert wurde, sollte im Folgenden die Stabilität des Impfstoffes untersucht werden. Hierzu wurde VAK952 bei verschiedenen Temperaturen über einen Zeitraum von einem halben Jahr deponiert. Einerseits wurde dann die Degradation des H1-Antigens untersucht, andererseits wurde die Immunogenität des so gelagerten Hefematerials überprüft. Im Hinblick auf die spätere Produktion sollte zudem ein Verfahren evaluiert werden, mit dem die inaktivierte Hefe zu einem sterilen Impfstoff verarbeitet werden kann. Ziel war dabei, ein Sterilisationsverfahren zu definieren, mit dem es möglich sein sollte, das H1-Antigen und die Wirksamkeit des Hefeimpfstoffes weitestgehend zu erhalten.

3.6.1 Untersuchungen zur Lagerstabilität des *subunit*-Impfstoffes VAK952

Ziel des nachfolgenden Experiments war es, den Einfluss einer halbjährigen Lagerung bei 4 °C, RT (21 °C) oder 37 °C auf das H1-Antigen von VAK952 zu untersuchen. Hierfür wurde VAK952 nach dem Standardprotokoll produziert. 30 OD-Einheiten des pulverförmigen Hefematerials wurden als Duplikat in nicht luftdicht verschlossene 1,5 mL-Reaktionsgefäße (nicht ideale Bedingungen) überführt und bei den oben genannten Temperaturen gelagert. Unmittelbar nach der Produktion sowie zu den in **Abb. 28A und B** aufgeführten Zeitpunkten nach Beginn der Lagerung wurden die

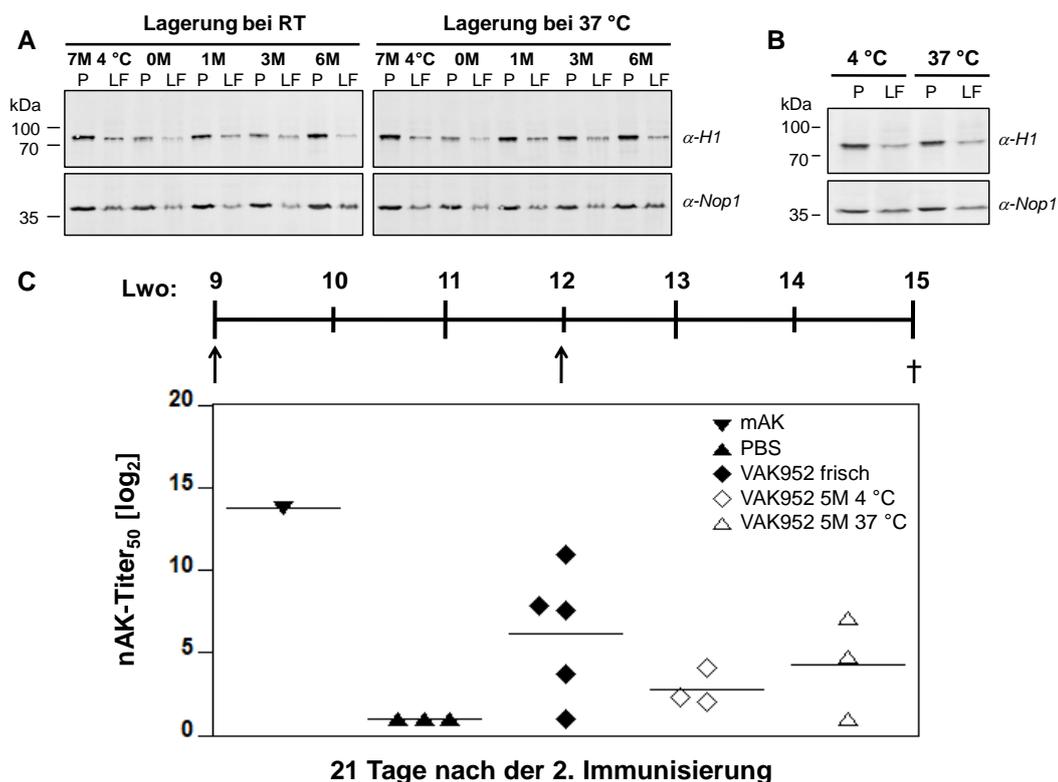


Abbildung 28: Stabilität und Wirksamkeit von VAK952 nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen. (A) VAK952 wurde nach dem Standardprotokoll produziert und je 30 OD-Einheiten über ein halbes Jahr bei 4 °C, 21 °C (RT) oder 37 °C gelagert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Proben mit Glasperlen aufgeschlossen, beide Proteinfraktionen (löslich (LF), Pellet (P)) in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt und im Western-Blot untersucht. Der Nachweis der Proteine erfolgte wie zuvor beschrieben unter Verwendung des Odyssey Infrared Imaging Systems. Es wurden 15 µg Hefetotalprotein pro Spur aufgetragen. Ladekontrolle: Nop1p. (B) Chargenkontrolle (30 OD-Einheiten) unmittelbar vor Beginn der Immunisierung, 5 Monate nach Beginn der Lagerung. (C) 9 Wochen alte, weibliche BALB/c Mäuse wurden im Intervall von 3 Wochen mit 2 mg VAK952 und AddaVax™ oder nur mit PBS subkutan immunisiert (Pfeile). Drei Wochen nach der letzten Applikation wurde das Serum gewonnen und wie zuvor beschrieben auf Virus-neutralisierende Antikörper (nAK-Titer₅₀) untersucht. Lwo: Lebenswoche; mAK: Testsystem-Kontrolle (α -H1 (H37-66)); M: Monat; M0: Zeitpunkt unmittelbar nach Hefeproduktion; 7M 4°C: Lagerung für 7 Monate bei 4°C.

Hefeproben mit Glasperlen aufgeschlossen und die Signalintensität von H1_{PR8} im Western-Blot untersucht. Die semiquantitative Analyse der Proben ergab, dass nach den sechs Monaten und unabhängig von der Lagerungstemperatur kein erkennbarer Abbau des H1 zu beobachten war. D.h. die relativen Konzentrationen des H1-Antigens

erschienen im Rahmen des Detektionsverfahrens gleich, das Protein war über den getesteten Zeitraum stabil nachweisbar.

Um im Folgenden die Wirksamkeit des gelagerten *subunit*-Impfstoffes VAK952 zu untersuchen, wurden BALB/c Mäuse mit Proben derselben Hefecharge immunisiert, die fünf Monate bei 4 °C bzw. 37 °C gelagert wurden. Die Wirksamkeit des gelagerten Hefe-basierten Impfstoffes wurde mit der von frisch produziertem VAK952 verglichen. Dabei wurden diesmal 2 mg VAK952 pro Applikation im klassischen *prime-boost*-Schema subkutan eingesetzt, um nun auch eine geringere Impfdosis in diesem Schema zu testen. Da das zuvor durchgeführte *prime-boost*-Experiment nicht vollständig befriedigend war (siehe 3.5), wurde zudem der Abstand von *prime* und *boost* auf drei Wochen verlängert. Diese Maßnahme begründete sich zum einen auf der Annahme, dass mit dem Hefe-basierten Impfstoff ein Antigen-Depot erzielt werden kann. Zum anderen ist bekannt, dass ein längeres Impfintervall zwischen *prime* und *boost* zu einer effektiveren sekundären Immunantwort führen kann [132]. Wie in **Abb. 28** gezeigt, entwickelten nach Immunisierung mit frischem Hefematerial vier von fünf Tieren nAK mit Titern zwischen 4-11 log₂. Nach Immunisierung mit Hefeproben, die fünf Monate bei 4 °C gelagert wurden, ließen sich geringere nAK-Titer von 2-4 log₂ nachweisen. Interessanterweise wurden nach Verabreichung des bei 37 °C gelagerten Hefematerials im Serum von zwei Tieren nAK-Titer von 5-7 log₂ nachgewiesen. Damit waren die erreichten Titer vergleichbar zu denen nach Immunisierung mit frischem Hefematerial.

Die Daten deuteten damit auf eine hohe Haltbarkeit des Hefeimpfstoffes bei trockener Lagerung, auch bei hoher Außentemperatur hin. Aufgrund der hier beobachteten großen Streuung zwischen den einzelnen Werten bei geringer Anzahl an Versuchstieren sind diese Daten als initial zu betrachten und sollen nur als Orientierung für spätere Versuche im Zieltier mit finalen Impfstoffchargen dienen.

3.6.2 Evaluierung eines geeigneten Sterilisationsverfahrens

Sterilität (Keimfreiheit) ist die Abwesenheit von vermehrungsfähigen Mikroorganismen einschließlich ihrer Ruhestadien (z.B. Sporen). Gemäß den Standards der *European Pharmacopoeia* (*Ph. Eur.* 5.1.) werden für eine Sterilisation von Arzneimitteln verschiedene Methoden empfohlen. Neben trockener Hitze, heißem Dampf, Gas, Filtration sowie einer aseptischen Produktion wird auch eine Sterilisation durch ionisierende Strahlung (γ -Strahlung) mit einer Dosis von 25 kGy (kleinste absorbierte Dosis) empfohlen. Von dieser Dosis ist bekannt, dass sie zu einer adequaten und

reproduzierbaren Letalität bei Mikroorganismen mit einem *sterility assurance level* (SAL) von 10^{-6} (nicht mehr als ein lebensfähiger Mikroorganismus in 1×10^6 sterilen Untereinheiten) führt (*Ph. Eur.* 5.1.1.). Mit der bisher durchgeführten Gefriertrocknung und anschließender Hitzeinaktivierung von *K. lactis* für 2 h bei 90 °C konnte die Anzahl lebender Zellen auf 10 Zellen pro Gramm Hefetrockengewicht reduziert werden, wobei die Konzentration und die Wirksamkeit des rekombinanten Proteins nicht gravierend beeinflusst wurde [5]. Von Sterilität kann jedoch unter Verwendung dieses Standardprotokolls nicht gesprochen werden. Da sich alternative Sterilisationsverfahren als ungeeignet oder zu teuer für getrocknete Hefe erwiesen (Daten nicht gezeigt), wurde im Folgenden die Behandlung mit ionisierender Strahlung untersucht. Als Vorteil erwies sich dabei, dass das Verfahren für beträchtliche Mengen, wie sie im Rahmen der Produktion von Hefeimpfstoffen im Fermenter anfallen, sehr gut geeignet ist. Im Rahmen dieser Arbeit sollte überprüft werden, inwieweit die γ -Strahlung die Synthese des rekombinanten Proteins und die Wirksamkeit des Impfstoffes beeinflusst. Hierfür wurde der Hefestamm VAK952 nach Anzucht zu drei gleichen Teilen aufgeteilt und unter Verwendung der folgenden Methoden weiter prozessiert: a) Inaktivierung nach Standardprotokoll ohne Sterilisation, b) Inaktivierung nach Standardprotokoll und Sterilisation mit 25 kGy sowie c) Gefriertrocknung und Sterilisation mit 50 kGy. Die γ -Bestrahlung wurde in Radeberg bei der Firma Synergy Health Radeberg GmbH durchgeführt. Im bestrahlten Hefematerial wurde anschließend die Stabilität von H1_{PR8} unter Verwendung des Hefezelllysats im Western-Blot untersucht (**Abb. 29A**). Es zeigte sich, dass die Intensität des H1-Signals mit zunehmender Strahlendosis abnahm und bei der maximalen Dosis von 50 kGy auf weniger als die Hälfte des Ausgangssignals reduziert war. Die Behandlung mit ionisierender Strahlung hat folglich einen negativen Einfluss auf die H1-Proteinkonzentration in der Hefezelle. Anschließend wurde das Hefematerial auf seine Wirksamkeit untersucht. Hierfür wurden BALB/c Mäuse zweimal im Abstand von drei Wochen mit 5 mg des jeweiligen Hefematerials immunisiert. Aufgrund der verringerten Quantität von H1_{PR8} wurde die hohe Hefedosis verwendet (**Abb. 29B**). Dabei wurde folgendes festgestellt: Bei Verwendung der Verfahrenstechnik c) konnten in keinem Serum der Versuchstiere nAK-Titer nachgewiesen werden. Die Bestrahlung der Hefe mit einer Dosis von 50 kGy führt folglich zum Verlust der Wirksamkeit des Hefe-basierten Impfstoffes. Bei Anwendung der Verfahren a) und b) wurden in jeweils zwei Tieren hohe ($8-12 \log_2$) und in je einem Tier geringere nAK-Titer von $2-3 \log_2$ nachgewiesen. Die Verwendung ionisierender Strahlung mit einer Dosis von

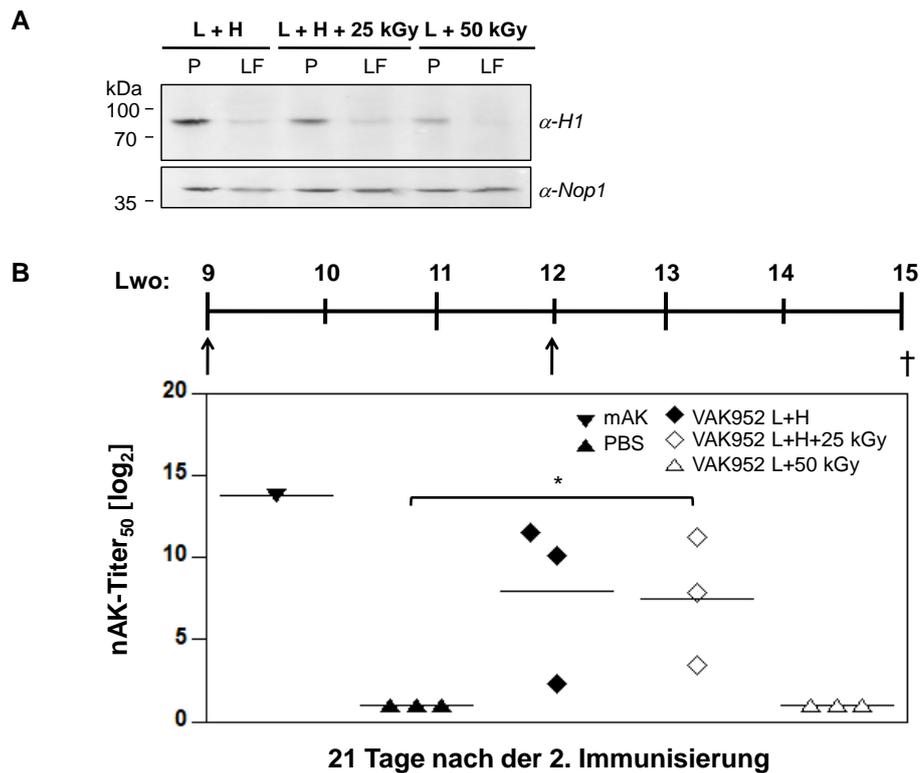


Abbildung 29: Einfluss ionisierender Strahlung auf den H1_{PR8}-Antigennachweis und die Wirksamkeit von VAK952. (A) VAK952 wurde nach dem Standardprotokoll angezogen und anschließend mit 25 kGy oder unmittelbar nach Gefriertrocknung (L) mit 50 kGy γ -bestrahlt. 30 OD-Einheiten des Hefematerials wurden wie unter Abb. 28 beschrieben im Western-Blot untersucht. (B) Es wurden 9 Wochen alte, weibliche BALB/c Mäuse im Abstand von drei Wochen zweimal mit 5 mg VAK952 zusammen mit AddaVaxTM oder nur mit PBS subkutan immunisiert (Pfeile). Wie zuvor beschrieben, wurde drei Wochen nach der letzten Applikation das Serum der Tiere gewonnen und die neutralisierenden Antikörper (nAK-Titer₅₀) gemessen. Um signifikante Unterschiede zu untersuchen, wurde der Student's *t*-Test verwendet. *: $p < 0,05$; Lwo: Lebenswoche; mAK: Testsystem-Kontrolle (α -H1 (H37-66)); H: Hitzeinaktivierung.

25 kGy wäre demnach eine mögliche Methode zur Sterilisation des *K. lactis*-basierten *subunit*-Impfstoffes, bei der ein Verlust der Immunogenität des Impfstoffes gering gehalten werden kann.

3.7 Weitere Optimierung *K. lactis*-basierter Impfstoffe

Nach Immunisierung mit dem *K. lactis*-basierten Impfstoff VAK952 wurden hohe nAK-Titer und ein 100%iger Schutz gegen eine Virusinfektion in BALB/c Mäusen ausgebildet. Bei Verwendung einer niedrigeren Impfdosis oder eines verkürzten Impfschemas traten jedoch erste Anzeichen einer verringerten Schutzwirkung auf. Aus diesem Grund blieb das Ziel, die Immunogenität des Hefeimpfstoffes nochmals zu erhöhen. Zu diesem Zweck wurden folgende Strategien verfolgt: a) Insertion einer zweiten Genkopie von H1_{PR8} in das Genom von *K. lactis*, b) Verbesserung des Hefewachstums durch Promotermodifikation und c) Expression eines weiteren Influenza-A-Gens (M1_{PR8}). Ziel

war es, die Ausbildung von nAK und / oder die Schutzwirkung des Impfstoffes bei niedriger Dosis und verkürztem Impfschema nochmals zu verbessern.

3.7.1 Verfahren zur Insertion eines zusätzlichen Fremdgens

Um die Konzentration des von der Hefe synthetisierten rekombinanten Fremdartigens weiter zu erhöhen oder, alternativ, verschiedene Fremdgene in der gleichen Hefezelle exprimieren zu können, wurden von der Arbeitsgruppe neue Integrationsvektoren entwickelt. Dadurch sollten die gewünschten Gene, die jeweils unter Kontrolle des *LAC4-12*-Promoters ($P_{LAC4-12}$) stehen, nicht nur wie bisher am *LAC4*-Locus, sondern gezielt auch in anderen Genorten stabil integriert werden können, ohne den Einsatz von Antibiotika (**Abb. 30**). Mehrere Kopien eines Gens oder verschiedene Gene sollten damit

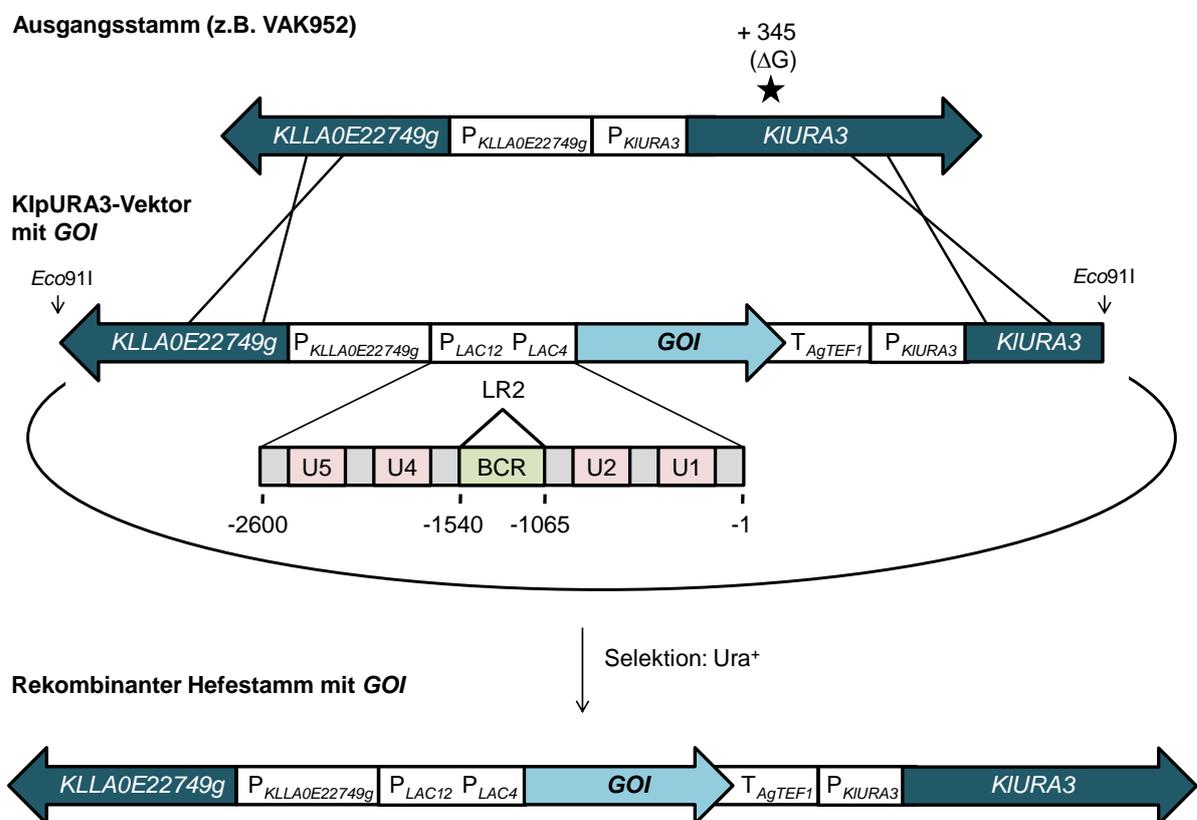


Abbildung 30: Generierung rekombinanter *K. lactis* durch Insertion von Fremdgenen in den *URA3*-Locus. Schematische Darstellung der genomischen Anordnung der Gene *KIURA3* (Orotidin-5'-phosphat-decarboxylase) und *KLLA0E22749g* (nicht charakterisiert) in *K. lactis* sowie im KlpURA3-Vektor. Die Lokalisation und Transkriptionsrichtung der Gene sowie des *GOI* (*gene of interest*) werden durch Pfeile dargestellt. Das *KIURA3*-Gen ist im verwendeten Ausgangsstamm (z.B. VAK952) durch eine Nukleotiddeletion (Stern) nicht-funktionell, wodurch die Stämme Uracil-axotroph sind. Die Expressionskassette des Vektors beinhaltet nacheinander angeordnet: *LAC4-12*-Promoter, *GOI*, *TEF1*-Terminator aus *Ashbya gossypii*, den *KIURA3*-Promoter sowie den Bereich des intakten *KIURA3*-Gens. Für die Generierung rekombinanter *K. lactis*-Stämme wird der KlpURA3-Vektor mit einem Restriktionsenzym (z.B. *Eco911*) hydrolysiert und in den Ausgangsstamm transformiert. Nach erfolgreicher homologer Rekombination enthält der resultierende Stamm das *GOI* und ist Uracil-prototroph (Ura⁺). U1-4: *upstream activating sequences* (Bindestellen für den Transkriptionsaktivator KIGal4); BCR: *basal control region*; LR2: Deletion der BCR.

gleichzeitig Lactose-reguliert exprimiert werden können. Da VAK952 ein defektes *URA3*-Gen trägt, welches durch eine Nukleotiddeletion an Position +345 im *ura3-20*-Allel und einem daraus resultierenden *frameshift* hervorgerufen wird, wurde der *URA3*-Locus als Insertionsort ausgewählt. Das *URA3*-Gen kodiert für das Enzym Orotidin-5'-phosphat-decarboxylase, welches an der Pyrimidinsynthese beteiligt ist. Ein Verlust der Aktivität des Enzyms führt zur Uracil-Auxotrophie der Hefe [40, 177]. Diese Eigenschaft wurde genutzt, um nach erfolgreicher Insertion des Fremdgens Uracil-prototrophe Klone zu selektieren. Aufgrund der zu erwartenden starken zytopathischen Effekte bei Expression von zwei *H1*-Genen, wurde zusätzlich ein Vektor mit einer eingeführten Mutation im $P_{LAC4-12}$ generiert. Die Sequenz des Promotors weist die LR2-Deletion (nt: 1540-1065) der basalen Kontrollregion (BCR) auf, wodurch die basale Expression unter nicht-induzierten Bedingungen gering ist [107]. Auf diese Weise kommt es in der Vorkultur unter nicht-induzierten Bedingungen (YPD-Medium) zu keiner oder nur einer geringen Fremdgenexpression [81, 107]. Dadurch verbesserte sich die Ausgangsfitness der Hefezellen und folglich das Wachstum in der Hauptkultur (YPL-Medium). Die entsprechenden Ausgangsplasmide p2281 und p2303 (mit LR2) wurden von Dr. Hans Hürlimann entwickelt und im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Generierung von Vektoren verwendet, die das *H1*- bzw. *M1*-Gen exprimieren. Die Transformation der Hefe zur Erstellung neuer rekombinanter Stämme erfolgte nach dem Prinzip von Krijger *et al.*, 2012 (**Abb. 6**) unter Verwendung der neuen Vektorsysteme. Selektiert wurden die rekombinanten Hefestämme durch Überprüfung der Uracil-Prototrophie, der DNA-Sequenz (Kolonie-PCR) und der Synthese des rekombinanten Proteins im Western-Blot.

3.7.2 Generierung von *K. lactis*-Stämmen mit zwei Fremdartigen

Die Ausgangsplasmide p2281 und p2303 (mit LR2) wurden verwendet, um eine zweite *H1_{PR8}*-Genkopie bzw. ein weiteres Fremdartigen in den *URA3*-Locus von *K. lactis* VAK952 zu inserieren. Neben *H1* wurde das Matrixprotein 1 (*M1*) von Influenza A/PR/8/34 (*H1N1*) als weiteres Antigen ausgewählt. Das Protein ist stark konserviert und Daten anderer Arbeitsgruppen legen nahe, dass *HA* und *M1* membranassoziierte *virus like particles* (VLPs) bilden können. Zudem kann die zusätzliche Expression von *M1* generell die Immunogenität des *HA*-Proteins verstärken und möglicherweise auch eine Kreuzprotektivität gegen verschiedene Subtypen des Influenzavirus vermitteln [95]. Die *M1*-Gensequenz wurde für *K. lactis* Codon-optimiert komplett synthetisiert (GenScript). Die für die Proteine *H1_{PR8}* bzw. *M1_{PR8}* kodierenden Gene wurden aus den Ausgangsvektoren p1934 (*H1_{PR8}*) bzw. p2343 (*M1_{PR8}*) mit Restriktionsendonukleasen

extrahiert und in den neuen Integrationsvektor p2281 inseriert. Die linearisierte DNA der resultierenden Vektoren p2316 ($H1_{PR8}$) und p2352 ($M1_{PR8}$) wurde jeweils in VAK952 transformiert. Die rekombinanten Hefestämme wurden als VAK1255 ($2xH1_{PR8}$) und VAK1283 ($H1_{PR8}/M1_{PR8}$) bezeichnet. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen war bereits bekannt, dass die Expression des *H1*-Gens zytoxisch auf das Wachstum von *K. lactis* wirkt (siehe auch **Abb. 9**). Da bei Expression von zwei *H1*-Genkopien mit einer Zunahme dieser toxischen Eigenschaften zu rechnen war, sollte zudem der Effekt des modifizierten Promoters (LR2-Deletion) auf das Wachstum und die Proteinbiosynthese untersucht werden. Dafür wurde VAK952 ($H1_{PR8}$) mit dem *H1*-Gen-exprimierenden Plasmid p2317 (mit LR2) transformiert. Der resultierende Hefestamm wurde als VAK1256 ($2xH1_{PR8}/LR2$) bezeichnet; dieser Stamm trägt die Mutation im $P_{LAC4-12}$ vor der *H1*-Genkopie im *URA3*-Locus. Um die Auswirkung von jeweils einer LR2 im $P_{LAC4-12}$ beider *H1*-Genkopien zu untersuchen, wurde zudem der neu erstellte Hefestamm VAK1243 ($H1_{PR8}/LR2$) mit p2317 ($H1_{PR8}/LR2$) transformiert. Die rekombinante Hefe wurde als VAK1257 ($2xH1_{PR8}/2xLR2$) bezeichnet und trägt jeweils eine Mutation im $P_{LAC4-12}$ vor der *H1*-Genkopie im *LAC4*- und im *URA3*-Locus. Da Uracil-prototrophe Stämme ein besseres Wachstum zeigen als Uracil-auxotrophe, wurde das *URA3*-Gen in VAK367 und VAK952 durch Insertion des entsprechenden DNA-Fragmentes, amplifiziert aus dem WT CBS 2359, rekonstituiert und die resultierenden Uracil-prototrophen Stämme als VAK1139 (nicht rekombinant Ura^+) und VAK1231 ($H1_{PR8} Ura^+$) bezeichnet (Lena Munzel). Die neu erstellten Hefestämme wurden im Folgenden bezüglich ihrer Eigenschaften charakterisiert.

3.7.2.1 Charakterisierung von *K. lactis* mit zwei $H1_{PR8}$ -Genkopien und Promoter-Modifikation

Nach Insertion einer weiteren $H1_{PR8}$ -Genkopie galt es zunächst zu überprüfen, ob die *H1*-Antigenkonzentration in *K. lactis* gesteigert werden konnte und welchen Einfluss die eingeführte Deletion (LR2) in der basalen Kontrollregion des $P_{LAC4-12}$ auf die $H1_{PR8}$ -Konzentration hat. Hierfür wurden der Uracil-auxotrophe Stamm VAK952 ($H1_{PR8}$) und die Uracil-prototrophen Stämme VAK1231 ($H1_{PR8}$), VAK1255 ($2xH1_{PR8}$), VAK1256 ($2xH1_{PR8}/LR2$) sowie VAK1257 ($2xH1_{PR8}/2xLR2$) jeweils im Schüttelkolben nach dem Standardprotokoll angezogen und die Zelllysate im Western-Blot untersucht. In **Abb. 31A** ist gezeigt, dass in Proben aller Stämme das rekombinante $H1_{PR8}$ -Protein spezifisch mit der erwarteten Größe von ca. 80 kDa nachgewiesen werden konnte. Im Vergleich zu VAK952 wurde im Zelllysate von VAK1255 eine erhöhte Konzentration an *H1*-Protein (ca. 25 %) festgestellt. Diese Zunahme an *H1* war jedoch nicht statistisch

signifikant (**Abb. 31B**). Im Zelllysat von Hefen mit Promoter-Modifikation (VAK1256, VAK1257) konnte keine Zunahme der H1_{PR8}-Konzentration beobachtet werden. Das H1-Signal war vergleichbar mit Hefestämmen, die nur eine *H1*-Genkopie tragen (VAK952, VAK1231) (**Abb. 31A**). In einem weiteren Experiment sollte der Einfluss der LR2-Deletion im *P_{LAC4-12}* auf das Wachstum der rekombinanten *K. lactis*-Stämme untersucht werden. Hierfür wurden die nicht-rekombinanten Hefen VAK367 und VAK1139 (Ura⁺) parallel mit den rekombinanten Hefestämmen VAK952, VAK1231, VAK1255, VAK1256 und VAK1257 im Schüttelkolben mit Lactose angezogen und über einen Zeitraum von 24 h die optische Dichte (600 nm) der Kulturen bestimmt (**Abb. 32A**).

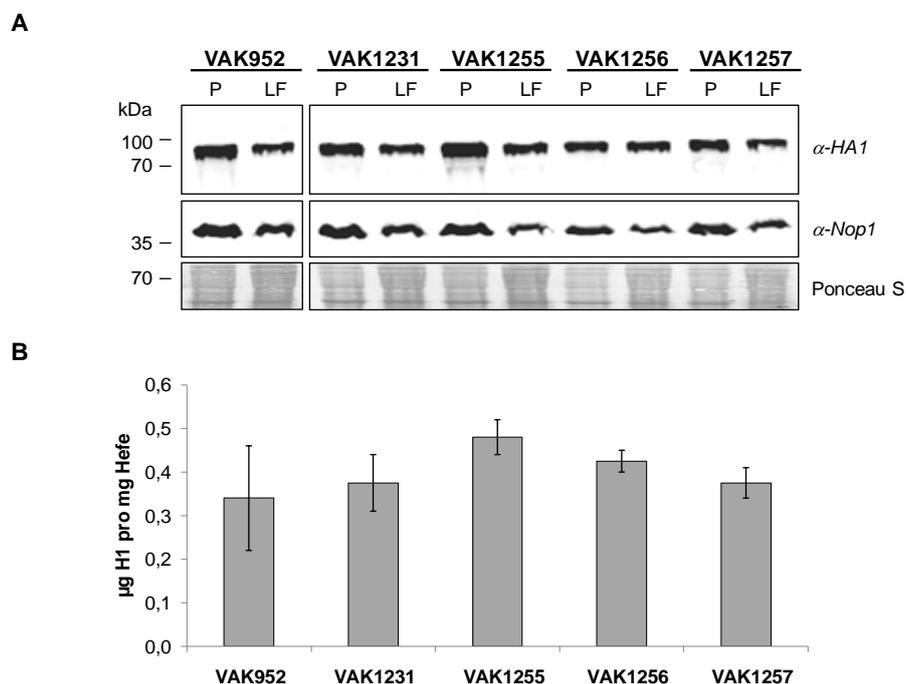


Abbildung 31: Charakterisierung rekombinanter *K. lactis* mit zwei *H1_{PR8}*-Genkopien und modifiziertem *LAC4-12*-Promotor. (A) Die aufgeführten Hefestämme wurden für 6 h in YPL-Medium induziert und nach dem Standardprotokoll produziert. Das Hefezelllysat (30 OD-Einheiten) wurde, wie zuvor beschrieben, im Western-Blot unter Verwendung des Odyssey Infrared Imaging Systems untersucht. Es wurden 15 µg Hefetotalprotein pro Spur aufgetragen. Ladekontrollen: Nop1 und Ponceau S. (B) Die Analyse der Fluoreszenzsignale für die einzelnen Proteinbanden sowie die Berechnung der H1-Proteinkonzentration pro mg Hefe erfolgte wie unter Abb. 10 beschrieben. Die angegebenen Daten wurden aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen gemittelt.

Zusätzlich wurde das Wachstum der Stämme in einem Tropfentest unter nicht-induzierten (Glucose) und unter induzierten Bedingungen (Lactose) verglichen (**Abb. 32B**). Wie erwartet, zeigten alle rekombinanten *K. lactis*-Stämme ein schlechteres Wachstum als die Stämme ohne Fremdanigen und Uracil-prototrophe Stämme erreichten höhere finale Zelldichten als Uracil-auxotrophe Stämme. Dabei wurde unter anderem festgestellt, dass sowohl in Flüssigkultur, als auch auf YPL-Nähragarplatten der Stamm VAK1255 (2xH1_{PR8}) ein schlechteres Wachstum zeigte als VAK1231 (H1_{PR8} Ura⁺). Da es sehr naheliegend war, das Wachstumsdefizit auf die zytotoxischen

Eigenschaften des H1-Proteins in *K. lactis* zurückzuführen, stellten diese Daten einen Hinweis darauf dar, dass die Expression von zwei *H1*-Genkopien in der Tat zu einer höheren Konzentration des H1-Antigens in den betreffenden *K. lactis*-Zellen führt. Im Vergleich zu VAK1255 zeigten die Stämme mit modifiziertem Promoter (VAK1256, VAK1257) in Flüssigkultur ein zu VAK1231 vergleichbares Wachstum. Im Tropfentest wuchsen beide Stämme unter induzierten Bedingungen etwas besser oder ähnlich gut wie VAK1231 und VAK1257 (2xH1/2xLR2) erreichte das Niveau von VAK367. Durch Modifikation des Promoters konnte somit die Toxizität von H1 reduziert werden. Das verbesserte Wachstum von VAK1256 und VAK1257 korrelierte auch mit einer leicht verminderten H1-Konzentration (**Abb. 31A**).

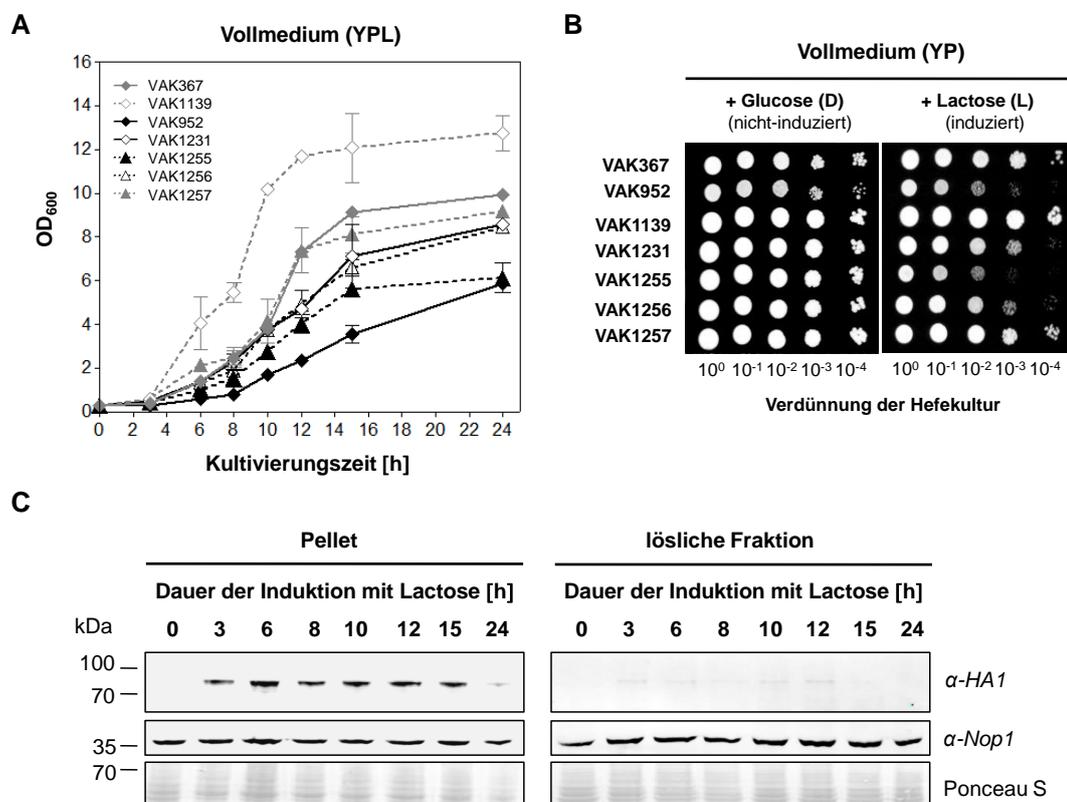


Abbildung 32: Wachstum H1-rekombinanter *K. lactis* und Induktionskinetik von VAK1255. (A) Für die Wachstumskurven wurden die aufgeführten Hefestämme im Schüttelkolben mit YPD-Medium angezogen und anschließend in YPL-Medium über einen Zeitraum von 24 h kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde jeweils die OD₆₀₀ der Kulturen bestimmt. Die Daten wurden aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen gemittelt. (B) Der Tropfentest wurde mit den angegebenen Hefestämmen, wie zuvor beschrieben, auf YPD- und YPL-Nähragarplatten durchgeführt. (C) Für die Induktionskinetik wurde VAK1255 im Schüttelkolben in YPD-Medium angezogen und anschließend über einen Zeitraum von 24 h in YPL-Medium kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 30 OD-Einheiten der Kultur geerntet und mit Glasperlen aufgeschlossen. Die lösliche (LF) sowie die unlösliche Proteinfraction (Pellet, P) wurden wie zuvor beschrieben in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt und im Western-Blot untersucht. Der Nachweis der Proteine erfolgte wie zuvor beschrieben unter Verwendung des Odyssey Infrared Imaging Systems. Es wurden 20 µg Hefetotalprotein pro Spur aufgetragen. Ladekontrollen: Nop1 und Ponceau S.

Fasst man zusammen, so kann festgehalten werden, dass durch Einführung einer zweiten *H1*-Genkopie die Quantität an rekombinantem $H1_{PR8}$ im Stamm VAK1255 leicht gesteigert werden konnte, dies jedoch auch zu einem verstärkten Wachstumsdefizit führte, was wahrscheinlich durch den toxischen Effekt des überexprimierten *H1* verursacht wird. Das Wachstumsdefizit konnte durch die Promoter-Modifikation reduziert werden, jedoch zu Lasten der *H1*-Konzentration. Als optimierter *H1*-Impfstoffkandidat sollte VAK1255 bezüglich seines immunogenen Potenzials untersucht werden. Entsprechend sollte, wie bei allen zuvor getesteten Hefestämmen, der Zeitpunkt der maximalen *H1*-Konzentration bestimmt werden. Dazu wurde VAK1255 in YPL-Medium über einen Zeitraum von 24 h induziert, Flüssigkulturproben genommen und die Zellysate im Western-Blot untersucht. (**Abb. 32C**). Das rekombinante $H1_{PR8}$ wurde über einen Zeitraum von 3-24 h nachgewiesen, mit einem Expressions-Maximum von 6-12 h (Pellet, lösliche Fraktion). Im Vergleich zu VAK952 scheint die Insertion der zweiten *H1*-Genkopie und die dadurch resultierende Uracil-Prototrophie von VAK1255 die Proteinbiosynthese zu beschleunigen, wodurch zu einem früheren Zeitpunkt ein *H1*-Proteinmaximum erreicht wird. Um einem verfrühten Abbau des rekombinanten *H1*-Proteins vorzubeugen und aufgrund der geringeren Biotrockenmasse nach 6 h wurde eine Induktionszeit von 8 h für VAK1255 gewählt.

3.7.2.2 Analyse des immunogenen Potenzials von VAK1255

In der sich anschließenden Immunisierungsstudie wurden BALB/c Mäuse zweimal im Abstand von zwei Wochen (*prime-boost*) mit 2 mg VAK952 bzw. VAK1255 immunisiert. Die niedrige Hefekonzentration wurde hier bewusst gewählt, um auch geringste Unterschiede bezüglich der Wirkung beider Hefe-basierter Impfstoffe erkennen zu können. Zwei Wochen nach der letzten Injektion wurde das Serum der Tiere gewonnen und im VNT untersucht (**Abb. 33**). Nach Immunisierung mit VAK952 wurden in den Seren von drei der fünf immunisierten Tiere hohe nAK-Titer von 7-12 \log_2 und in zwei Seren keine nAK nachgewiesen. Nach Immunisierung mit VAK1255 entwickelten vier Tiere einen hohen Titer von 4-9 \log_2 und ein Tier entwickelte keine nAK. Aus diesem Experiment wurde (mit Einschränkung aufgrund fehlender belastbarer Statistik) geschlossen, dass mit VAK1255 die Wirksamkeit des *K. lactis*-basierten *subunit*-Impfstoffes leicht verbessert werden konnte.

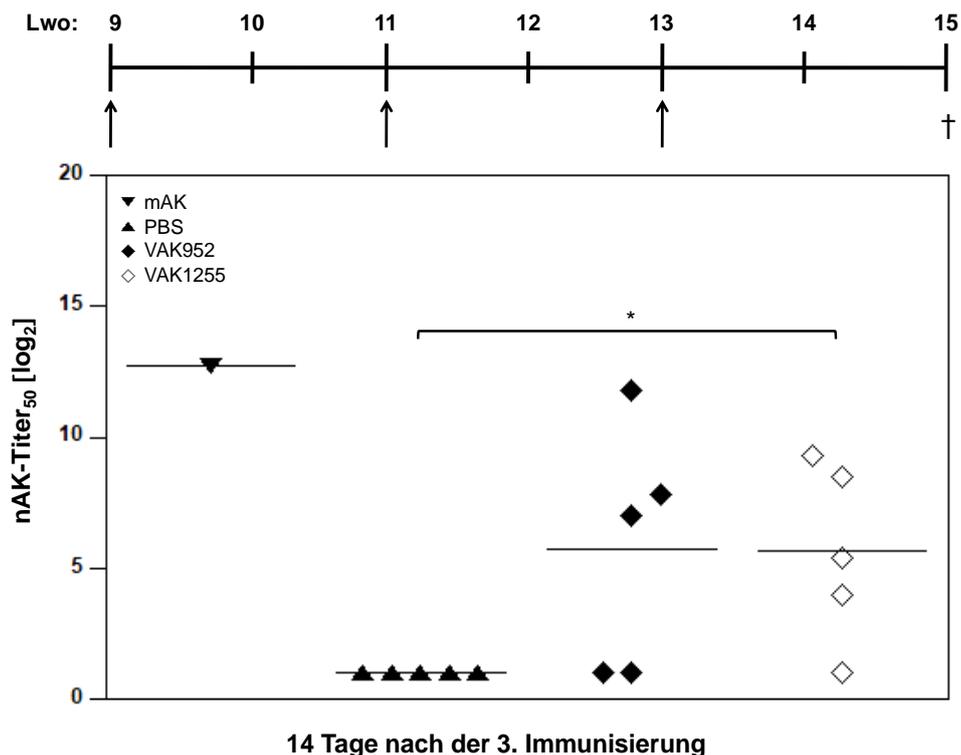


Abbildung 33: Vergleich der Antikörpertiter nach Immunisierung mit VAK952 und VAK1255. Die Hefestämme wurden nach dem Standardprotokoll produziert (Induktion VAK952: 12 h, VAK1255: 8 h) und subkutan verabreicht. 9 Wochen alte, weibliche BALB/c Mäuse wurden im Intervall von zwei Wochen dreimal mit 2 mg Hefe und AddaVax™ oder nur mit PBS immunisiert (Pfeile). Zwei Wochen nach der letzten Applikation wurde das Serum der Tiere gewonnen und, wie zuvor beschrieben, der Titer an Virus-neutralisierenden Antikörpern (nAK-Titer₅₀) gemessen. Um signifikante Unterschiede zu untersuchen, wurde der Student's *t*-Test verwendet. *: $p < 0,05$; mAK: Testsystem-Kontrolle (α -H1(H37-66)).

3.7.2.3 Charakterisierung von *K. lactis* mit je einer Genkopie von $H1_{PR8}$ und $M1_{PR8}$

Nach erfolgreicher Insertion einer zweiten $H1_{PR8}$ -Genkopie sollte anschließend überprüft werden, ob neben dem H1 das Matrixprotein als weiteres Fremdantigen in *K. lactis* produziert werden kann. Nach Insertion des $M1$ -Gens in VAK952 galt es zunächst, die erfolgreiche Fremdgenexpression im Western-Blot anhand des Proteinnachweises zu untersuchen. Dabei konnte neben dem $H1_{PR8}$ (~80 kDa) das M1 mit der erwarteten Größe von etwa 28 kDa im Zelllysat von VAK1283 spezifisch nachgewiesen werden (**Abb. 34A**). Interessanterweise waren die Intensitäten des in VAK952 bzw. VAK1283 nachweisbaren Signals für das $H1_{PR8}$ vergleichbar. Dies indizierte, dass die Koexpression des $M1$ die Expression von $H1$ nicht wesentlich beeinträchtigt. Das $M1_{PR8}$ -Protein wurde zu gleichen Anteilen in beiden Hefefractionen (löslich und Pellet) nachgewiesen und es ergaben sich keine Hinweise auf eine Glykosylierung. Dies war erwartungsgemäß, da es sich bei dem M1-Protein um ein im Zytoplasma der Wirtszelle translatiertes Protein handelt, welches als Matrix das Influenzavirus auskleidet. Untersuchungen zur Synthesekinetik beider Fremdantigene in VAK1283 zeigten, dass

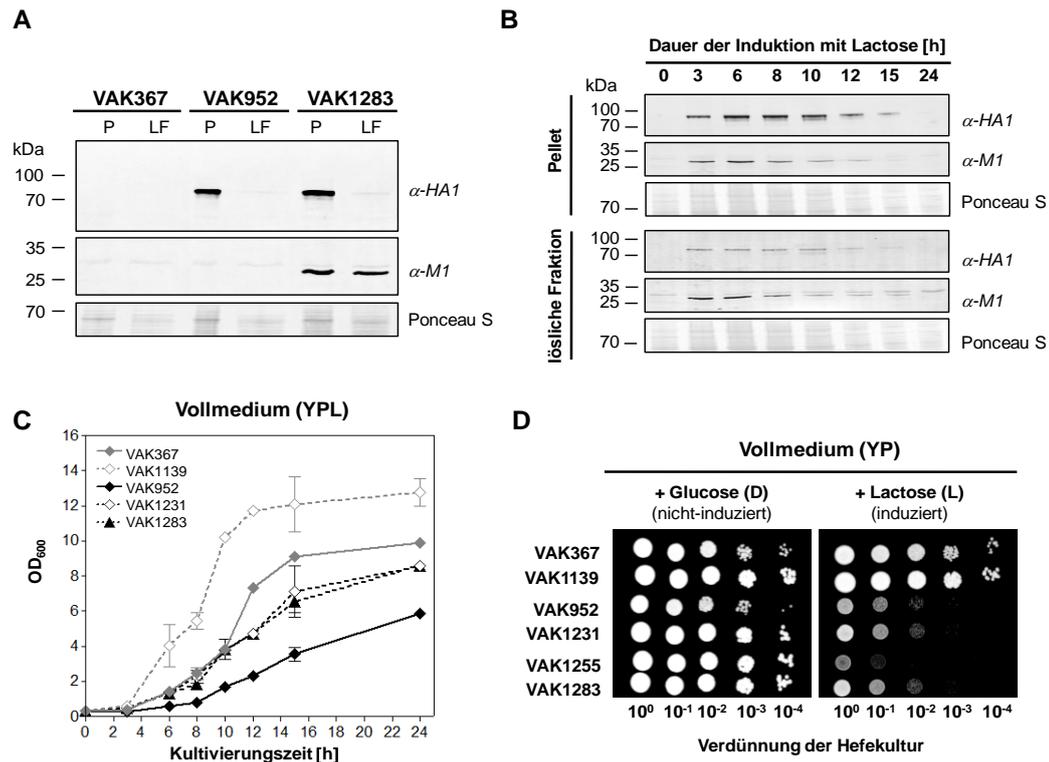


Abbildung 34: Charakterisierung von VAK1283. (A) Die Hefestämme VAK367, VAK952 und VAK1283 wurden im Schüttelkolben in YPD-Medium angezogen und anschließend in YPL-Medium für 6 h induziert. 30 OD-Einheiten der Kulturen wurden geerntet und beide Lysatfraktionen (löslich (LF), Pellet (P)) in einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Analyse erfolgte, wie zuvor beschrieben, im Western-Blot unter Verwendung des Odyssey Infrared Imaging Systems (Primärantikörper: α -HA1 (CM1-1) und α -M1 (MCA401)). Es wurden 20 μ g Hefetotalprotein pro Spur aufgetragen. Ladekontrolle: Ponceau S. (B) Für die Induktionskinetik wurde VAK1283 im Schüttelkolben in YPD-Medium angezogen und anschließend über einen Zeitraum von 24 h in YPL-Medium kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 30 OD-Einheiten der Kultur geerntet und wie unter A beschrieben im Western-Blot untersucht. (C) Die Erstellung der Wachstumskurven erfolgte wie unter Abb. 32 beschrieben. (D) Der Tropfentest wurde, wie zuvor beschrieben, auf YPD- / YPL-Nähragarplatten durchgeführt.

sowohl das H1-, als auch das M1-Protein 3 h nach Beginn der Geninduktion mit Lactose über einen Zeitraum von 15 h in beiden Fraktionen im Western-Blot nachweisbar waren (Abb. 34B). Wie bereits zuvor für den Uracil-prototrophen Stamm VAK1255 gezeigt (Abb. 32C), erreichte auch der durch Insertion des *M1*-Gens Uracil-prototrophe Stamm VAK1283 früher (bereits nach 6-10 h) ein Konzentrationsmaximum von H1_{PR8}. Im Vergleich dazu erreichte das M1_{PR8}-Protein ein Maximum bereits nach 3-6 h. Bezüglich des Wachstums zeigte sich auch bei VAK1283 ein schlechteres Wachstum als bei nicht-rekombinanten Hefestämmen (VAK367, VAK1139) und dass eine Uracil-Prototrophie einen Wachstumsvorteil gegenüber auxotrophen Stämmen bewirkt (Abb. 34C). In Analysen zum Wachstum zeigte sich, dass VAK1283 trotz der zusätzlichen Fremdgeninsertion ein Wachstum aufweist, das direkt vergleichbar ist zu dem Stamm VAK1231, der ausschließlich das *H1*-Gen exprimiert. (Abb. 34D). Die zusätzliche Expression des *M1*-Gens scheint daher keine negativen Auswirkungen auf das

Wachstum von *K. lactis* zu haben. Da die Proteinkonzentration von M1 im Western-Blot bereits nach 6 h Lactose-Induktion ein Maximum erreichte, wurde der neue Impfstamm VAK1283 für die sich anschließenden Immunisierungen für 6 h mit Lactose induziert und geerntet.

3.7.2.4 Analyse des immunogenen Potenzials von VAK1283

Im folgenden Immunisierungsexperiment wurden verschiedene Quantitäten und Impfschemata im Vergleich VAK952 gegen VAK1283 getestet. Dabei wurden wiederum geringere Impfdosen verwendet, um Unterschiede eindeutig ausmachen zu können. Zum einen wurden Mäuse zweimal (*prime-boost*) im Abstand von 3 Wochen immunisiert. Dabei wurden jeweils 2 mg Hefe eingesetzt. Zum anderen wurde in *one shot*-Experimenten 2 mg VAK952, 2 mg VAK1283 bzw. 1 mg VAK1283 eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten zweimal mit PBS behandelte Tiere. Drei (*prime-boost*) bzw. sechs (*one shot*) Wochen nach der letzten Immunisierung wurde das Serum der Tiere

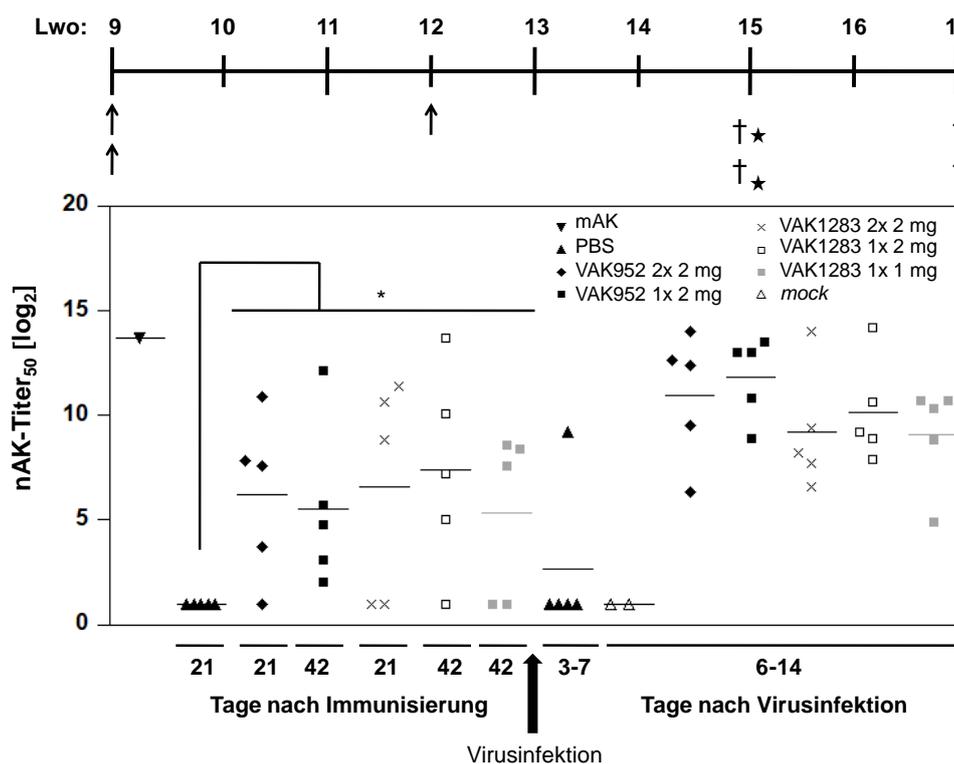


Abbildung 35: Antikörpertiter nach Immunisierung mit VAK952 oder VAK1283 und nach Infektion. Die Hefestämme wurden nach dem Standardprotokoll angezogen (Induktion VAK952: 12 h, VAK1283: 6 h) und subkutan mit AddaVax™ verabreicht. 9 Wochen alte, weibliche BALB/c Mäuse wurden, wie im Text beschrieben, immunisiert (Pfeile). Drei bzw. sechs Wochen nach der letzten Applikation wurden die Tiere mit der 5x MLD₅₀ des Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1) intranasal infiziert (Stern). Als Infektionskontrolle dienten scheininfizierte Tiere (*mock*), denen nur PBS ohne Virus intranasal appliziert wurde. Zu den angegebenen Zeitpunkten (†) sowie während des Beobachtungszeitraums, wurde das Serum der Tiere gewonnen und der nAK-Titer₅₀, wie zuvor beschrieben, bestimmt. Um Unterschiede zwischen den Gruppen zu untersuchen, wurde der Student's *t*-Test verwendet. *: 0,01 < p ≤ 0,05; Lwo: Lebenswoche; mAK: Testsystem-Kontrolle (α-H1(H37-66)).

gewonnen und im VNT auf nAK untersucht (**Abb. 35**). Dabei wurden nach *prime-boost*-Immunsierung von VAK952 in vier von fünf Mäusen nAK-Titer von 4-11 log₂ nachgewiesen. Sechs Wochen nach der *one shot*-Immunsierung mit VAK952 wurden ähnliche Titer erhalten (2-12 log₂). Im Vergleich dazu wurden nach *prime-boost*-Immunsierung von VAK1283 drei von fünf Tieren positiv mit sehr hohen Titern von 9-11 log₂ getestet. Nach *one shot*-Immunsierung waren vier von fünf Tieren seropositiv (5-14 log₂). Nach *one shot*-Immunsierung mit 1 mg VAK1283 entwickelten drei von fünf Tieren nAK-Titer von 8-9 log₂.

Es lässt sich festhalten, dass beide Immunsierungsschemata (*prime-boost*, *one shot*) zur Ausbildung ähnlich hoher nAK-Titer führen. Die erhaltenen Titer waren nach Immunsierung mit VAK1283 etwas höher als nach Immunsierung mit VAK952. Aufgrund der geringen Tierzahl waren diese Unterschiede jedoch nicht statistisch signifikant. Bemerkenswert war, dass nach Immunsierung mit 1 mg VAK1283 ein ähnliches Ergebnis erreicht werden konnte wie bei Verwendung der doppelten Dosis von VAK952. Nach der Belastungsinfektion stiegen die nAK-Titer in allen Gruppen weiter an; dies war stärker der Fall bei den mit VAK952 immunisierten Tieren.

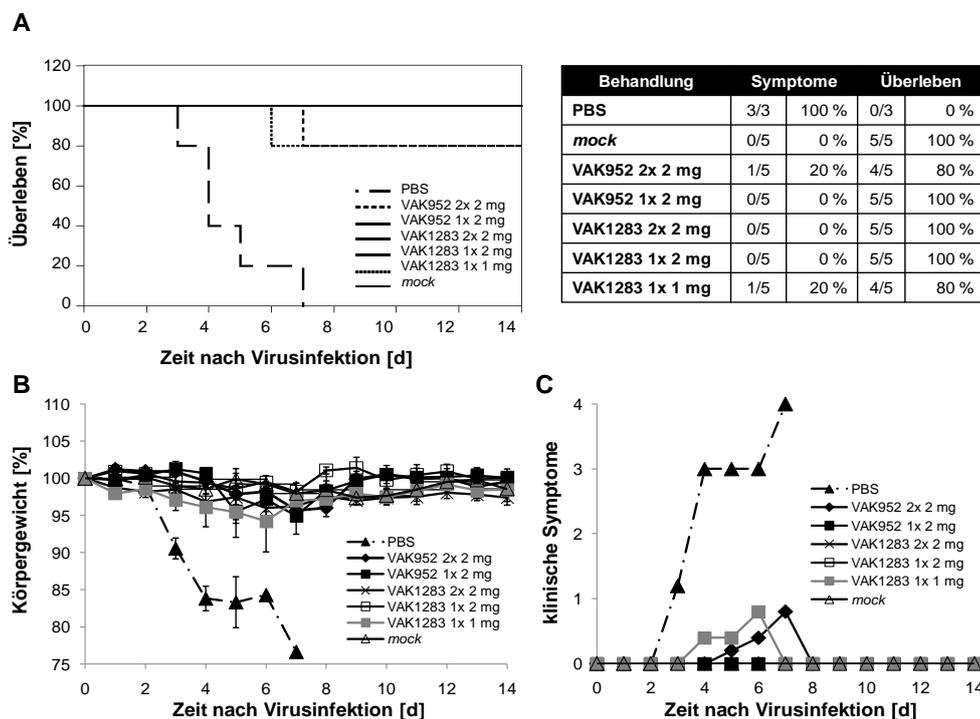


Abbildung 36: Belastungsinfektion mit A/PR/8/34 (H1N1) nach Immunsierung mit VAK952 oder VAK1283. Nach Infektion mit der 5x MLD₅₀ des Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1), wurde das Überleben (A), das Gewicht (B) sowie klinische Symptome (C) der Tiere über einen Zeitraum von 14 Tagen mehrfach täglich untersucht. Für die klinischen Symptome wurde der unter Abb. 22 ausgeführte Score von 0-4 verwendet. *Mock*: scheininfizierte Tiere, denen nur PBS intranasal verabreicht wurde.

Aufschluss über die Schutzwirkung des neuen Hefe-basierten *subunit*-Impfstoffes VAK1283 wurde durch das Belastungsexperiment erhalten (**Abb. 36**). Alle Tiere mit *one shot*-Immunisierung von 2 mg VAK952 oder VAK1283 bzw. *prime-boost*-Immunisierung von 2 mg VAK1283 zeigten keine Symptome einer Erkrankung und überlebten die ansonsten (siehe Negativkontrolle) letal verlaufende Infektion (100 % Protektion). Im Vergleich zu VAK1283 immunisierten Tieren zeigten drei Tiere, denen VAK952 verabreicht worden war, an Tag 5-7 nach Virusinfektion einen Gewichtsverlust von >5 % < 10 % (Score 1), was auf einen schlechteren Schutz schließen ließ. Jeweils eins der fünf Tiere mit *prime-boost*-Immunisierung von 2 mg VAK952 bzw. *one shot* mit 1 mg VAK1283, erkrankte und musste nach 6-7 Tagen euthanasiert werden. Mit diesem Experiment konnte erstmals gezeigt werden, dass eine Applikation mit VAK952 bzw. mit dem optimierten Impfstamm VAK1283 Mäuse zu 100 % vor einer letalen Infektion mit dem Influenzavirus schützt. VAK1283, der das M1-Protein zusätzlich zum H1-Protein rekombinant produziert, war dabei messbar wirksamer als der Stamm VAK952. Durch Einsatz von VAK1283 konnte zudem erstmalig ein 80 % hoher Schutz nach nur einer Applikation mit einer reduzierten Impfdosis (1 mg) demonstriert werden.

Mit dem Hefesystem ließen sich entsprechend Daten bestätigen, die mit anderen Impfverfahren gewonnen wurden. Danach steigert die Koexpression des *M1*-Gens die immunogene Wirksamkeit des Hämagglutinin-Antigens erheblich. Ob es in der Hefezelle tatsächlich zur Bildung von M1-HA-VLPs kommt, konnte bisher nicht überprüft werden (siehe Diskussion)

4. DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurden H1-rekombinante Hefestämme erstellt, charakterisiert und deren Immunogenität im Mausmodell untersucht. Dabei galt es möglichst umfassende Erkenntnisse bezüglich der Wirksamkeit und Stabilität des Impfstoffes zu gewinnen sowie Möglichkeiten zur Erhöhung der Antigenität und zur Verbesserung der Zellfitness zu evaluieren.

4.1 *K. lactis* als Expressionssystem für das virale Glykoprotein Hämagglutinin

Die Hauptvorteile von Hefen sind, dass sie eukaryotische, posttranslationale Modifikationen und ein rasantes Wachstum erlauben [73]. In den letzten 30 Jahren wurden fast 100 rekombinante Proteine in *K. lactis* mit pharmazeutischer Relevanz hergestellt, darunter die Säugetierproteine Lysozym, Serumalbumin und das Insulin-Vorläuferprotein [155, 177]. Die in dieser Arbeit durchgeführten Studien zur Charakterisierung des rekombinanten H1-Proteins des Influenza-A-Virus liefern eine Reihe von experimentellen Daten, die für die Produktion von HA-Glykoproteinen in *K. lactis* von Bedeutung sind und ggf. bei der Herstellung weiterer viraler Glykoproteine in *K. lactis* Anwendung finden. Wie sich herausstellen sollte, war eine stabile Produktion des H1-Antigens in gleichbleibenden Quantitäten in *K. lactis* möglich und die Expression einer Variante des *H1*-Gens, welche für ein N-terminal verkürztes H1-Protein kodiert, führte zu einer Beeinträchtigung der Stabilität und Ausbeute des rekombinanten Proteins.

4.1.1 Stabile Expression von Hämagglutinin in *K. lactis*

Im Zellysate von *K. lactis*, welche das Hämagglutinin der Influenzaviren A/PR/8/34 (VAK952) oder A/CA/04/09 (VAK1047) vom Subtyp H1N1 rekombinant produziert, ließ sich nach Induktion der Proteinbiosynthese das jeweilige H1-Protein mit einer molekularen Masse von etwa 80 kDa nachweisen (**Abb. 7 und 11A**). Aufgrund der fehlenden proteolytischen Spaltung des Proteins in *K. lactis* handelt es sich dabei um das nicht prozessierte HA0. Die Spaltung des Vorläuferproteins HA0 in HA1 und HA2 geschieht im natürlichen Wirt extrazellulär durch Trypsin-ähnliche Proteasen vorwiegend im respiratorischen und gastrointestinalen Trakt [105, 156]. H5- oder H7-Proteine von einigen hochpathogenen aviären Influenzaviren (AIV) können durch Proteasen wie z.B. Furin bereits intrazellulär im Golgi-Vesikel gespalten werden (Vgl. 1.1.4) [156]. Die Spaltung eines rekombinant produzierten H5-Proteins von A/chicken/Taiwan/1209/03

(H5N2) in HA1 und HA2 wurde in *P. pastoris* nachgewiesen und auf Hefe-eigene Proteasen während des Sekretionsprozesses zurückgeführt [182]. Die *N*-Glykosylierung der rekombinant in *K. lactis* hergestellten H1-Proteine wurde durch PNGase F-Behandlung der Proben nachgewiesen (**Abb. 13**, [5]). Mit der *N*-Glykosylierung ist daher eine wichtige Modifikation der H1-Proteine gegeben. Die *N*-Glykosylierung in Hefen weicht von der in höheren Eukaryoten ab [189] (siehe auch 1.1.4), wodurch die Stabilität (Halbwertszeit), die Lokalisation und die Immunogenität des therapeutischen Proteins beeinflusst werden kann [7, 177]. Wie in höheren Eukaryoten wird die *N*-Glykosylierung in Hefen im ER initiiert, wobei das $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Oligosaccharid (*core*-Glykosylierung) an das entstehende Polypeptid transferiert wird [189]. Im Gegensatz zur *N*-Glykan-Prozessierung im humanen System, welche das Entfernen von Mannose und das Hinzufügen weiterer Monosaccharide, wie z.B. von GlcNAc oder Galactose umfasst [180], ist die *N*-Glykan-Prozessierung in der Hefe begrenzt auf das Hinzufügen von Mannose-Resten [92]. In *K. lactis* werden vorwiegend *high*-Mannose Glykane produziert, die denen in *S. cerevisiae* (bis zu 200 Mannosereste) ähneln, aber i.d.R. deutlich geringer in ihrer Größe ($\text{Man}_{>30}\text{GlcNAc}_2$) sind [92, 189, 201]. Der Einfluss der *N*-Glykosylierung auf die Ausbildung von Antikörpern (AK) wird kontrovers diskutiert. So wurde in einer Studie beschrieben, dass die Einführung zusätzlicher *N*-Glykosylierungspositionen in die H1-Polypeptidsequenz von A/PR/8/34 zu einer Hyperglykosylierung des Proteins führte. Dadurch wurden antigenische Regionen in der globulären HA-Kopfreion „maskiert“, wodurch es zur Ausbildung geringerer HA-spezifischer AK-Titer kam [36]. Die molekulare Masse des in dieser Form rekombinant in HEK293T (*human embryonic kidney*)-Zellen hergestellten H1-Proteins verschob sich dabei von 80 kDa auf 100 kDa [36]. Bei Expression einer verkürzten H1-Genvariante von A/WSN/33 (H1N1), welche für die HA1-Domäne (aa 1-325) kodiert, wurden in *S. cerevisiae* zwei Formen des Proteins nachgewiesen. Eine extensiv glykosylierte Form (> 250 kDa), die ins Medium sekretiert wurde und eine Form, die intrazellulär mit einer molekularen Masse von 47 kDa nachgewiesen wurde. Letztere repräsentierte aufgrund der geringen Glykosylierung wahrscheinlich die *core*-glykosylierte Form [36]. Die molekulare Masse (80 kDa) des H1_{PR8}-Proteins, die im Zelllysate von *K. lactis* nachgewiesen wurde, war vergleichbar mit der glykosylierten, nicht prozessierten Isoform HA0 des Proteins in MDCK-Zellen [140], in denen keine Hypermannosylierung wie in Hefen stattfindet. Aufgrund der hier im Hefezelllysate nachgewiesenen Größe (80 kDa) von H1 wurde die These aufgestellt, dass die H1-Proteine nicht hypermannosyliert in *K. lactis* vorliegen. In Hefen werden oft sekretorische Proteine, die den gesamten *secretory pathway* durchlaufen,

hyperglykosyliert, da das extensive Hinzufügen von Mannose-Resten erst im Golgi-Apparat stattfindet [60, 189]. Es stellte sich daher die Frage nach der Lokalisation des rekombinanten Proteins in *K. lactis*. Nach intrazellulärer Immunmarkierung der H1-Proteine zeigte sich in der Fluoreszenzmikroskopie eine Anreicherung von H1 in peripheren Regionen des Zellkerns und der Hefezelle (**Abb. 12**). Im Zuge einer Elektronenmikroskopie von VAK952 (freundlicherweise durchgeführt von Dr. Gerd Hause), wurden ER-Strukturen in den zuvor genannten Bereichen der Hefezelle nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der Lage des ERs und der nachgewiesenen molekularen Masse von H1 wurde postuliert, dass das Glykoprotein im ER nahe des Zellkerns und in der Peripherie der Hefezelle akkumuliert und daher nur *core*-glykosyliert in *K. lactis* vorliegt. Bekräftigt wird die These durch Expressionsstudien mit einem weiteren viralen Glykoprotein, dem E2 aus dem Virus der bovinen viralen Diarrhoe (BVDV). Dabei wurde in einem *overlay* von Zellkern-, Membran- und E2-spezifischen Fluoreszenzsignalen ebenfalls eine Anreicherung des E2-Proteins im ER und nicht in der Plasmamembran von *K. lactis* beobachtet [80]. Wie sich herausstellen sollte, war die Immunogenität des rekombinanten H1-Proteins durch die in *K. lactis* stattfindende *N*-Glykosylierung nicht beeinträchtigt (siehe 4.2). Daraus wurde geschlossen, dass eine Maskierung des H1-Antigens durch die hefespezifische *N*-Glykosylierung unwahrscheinlich und die Faltung des H1-Proteins nicht oder nur gering beeinträchtigt wird. H1 liegt in *K. lactis* daher in einer nativen Form vor und konformationelle Epitope werden präsentiert, die für die Generierung einer effizienten, protektiven Immunantwort relevant sind [7].

Da wichtige Enzyme für die Proteinfaltung, wie z.B. Chaperone oder Oxidoreduktasen im ER limitiert sind, kann durch die Überexpression von Genen die für Glykoproteine kodieren die Proteinfaltungskapazität des ERs überschritten werden. Die Akkumulation ungefalteter Proteine im ER kann zur Aktivierung der *unfolded protein response* (UPR) führen, wodurch verschiedene Zielgene exprimiert und z.B. zusätzliche ER-Chaperone gebildet werden. In Untersuchungen zur UPR in *K. lactis* VAK952 (H1_{PR8}) konnte innerhalb der Arbeitsgruppe vor kurzem bestätigt werden, dass durch die heterologe Genexpression eine UPR in der Hefe induziert wird [5, 116]. In VAK952 konnte ein Spleißen von *KIHAC1*, einem Indikator für die Aktivierung der UPR in *K. lactis* und die Expression von UPR-Zielgenen wie *KIERO1* und *KIKAR2* nachgewiesen werden [116]. Daher und auch unter Berücksichtigung der in der Fluoreszenzmikroskopie gewonnenen Daten, ist eine Akkumulation von H1 im ER von *K. lactis* sehr wahrscheinlich. Des Weiteren ist hier anzumerken, dass der überwiegende Anteil des rekombinanten H1 in

der unlöslichen Proteinfraction (Pellet) von VAK952- und VAK1047-Zellysaten nachgewiesen wurde (**Abb. 7 und 11**). Durch die im HA enthaltene Transmembrandomäne wird das Protein in (z.T. unlöslichen) zellulären Membranen lokalisiert. So ist bekannt, dass HA spezifisch im *trans*-Golgi-Netzwerk von Säugerzellen mit Detergens-resistenten *lipid rafts* (spezielle Bereiche der Zellmembran, die reich an Glycosphingolipiden und Cholesterol sind) assoziiert, was zu einer erhöhten Resistenz des Proteins gegenüber Detergenzien führt [10]. In Hefezellen findet die Bildung von *lipid rafts* nicht im Golgi-Apparat, sondern im ER statt [113]. Da das H1-Protein offenbar im ER von *K. lactis* akkumuliert, ist eine Assoziation des Proteins mit Detergens-resistenten *lipid rafts* in *K. lactis* wahrscheinlich.

Die heterologe Genexpression von *H1* führte zu einem Ertrag von 0,5 µg H1_{PR8} pro mg VAK952 (**Abb. 10**). Bei Anzucht im Schüttelkolben wurde daher eine Ertragsausbeute von 1,3 g Hefe-Biotrockenmasse pro L mit einer H1-Konzentration von 0,6 mg H1 pro L erzielt. Aufgrund der Verwendung nicht aufgereinigter Proben sowie der fehlenden Bestimmung der Konzentration des Totalproteins im Pellet wurde die ermittelte H1-Konzentration nicht als absoluter Wert, sondern lediglich als relativer Näherungswert betrachtet, der zu Vergleichszwecken zwischen verschiedenen Präparaten herangezogen werden sollte. Die tatsächliche Proteinkonzentration von H1 liegt wahrscheinlich deutlich über dem ermittelten Wert. In Studien anderer Arbeitsgruppen führte die heterologe Genexpression verschiedener Proteine in *K. lactis* zu variierenden Proteinerträgen. So wurde z.B. für das Glykoprotein E2 des Hepatitis-C-Virus eine Konzentration von 1 mg pro L und für das porcine Insulin-Vorläuferprotein 30 mg pro L im Schüttelkolben erzielt [177]. In *P. pastoris* ließen sich für die Neuraminidase des aviären Influenzavirus A/Hatay/2004/H5N1 2 mg pro L generieren [159]. Neben diesen von der Hefe sekretierten Proteinen ließen sich rekombinante virale Proteine auch intrazellulär in *P. pastoris* akkumulieren und anschließend aufreinigen. Dabei wurden z.B. für das *Hepatitis B virus surface antigen* (HBsAg) Ausbeuten von 50 mg pro L oder für das Coxsackievirus A16 P1-Polypeptid 8,3 mg pro L erzielt [184]. Der Ertrag des jeweiligen Antigens wurde dabei maßgeblich durch den verwendeten Expressionsstamm, die Anzuchtbedingungen und das virale Antigen beeinflusst [177, 184]. Obwohl der Western-Blot eine geeignete Methode ist, um die Qualität des finalen Produktes und die Präsenz des Antigens zu überprüfen [169], ist die Quantifizierung von Antigenen, insbesondere für membranständige Glykoproteine, die nur unter großem Aufwand solubilisiert und aufgereinigt werden können, erschwert. Hinzu kommt die Präferenz einiger Proteine, wie dem HA, Aggregate auszubilden [169], die mit der

Analyse interferieren können. Die Quantifizierung wird zunehmend erschwert, wenn mehrere Antigene mit vergleichbarer molekularer Größe gleichzeitig nachgewiesen werden sollen, wie es bei multivalenten HA-Impfstoffen der Fall ist (Vgl. 4.4.1). Dagegen hat sich die Liquid-Chromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS / MS) für die Quantifizierung von HA und NA in saisonalen mono- und trivalenten Influenzaimpfstoffen sowie anderer, rekombinanter Proteine bewährt. Die Methode löst viele der Einschränkungen des Western-Blots und ermöglicht eine schnelle Quantifizierung aller Proteinkomponenten in einer Analyse [90, 169]. Das Prinzip beruht dabei auf der Analyse der Masse und der Ladung von Peptiden, die durch Proteasebehandlung (oft Trypsin) von Proteinen entstehen. Für die Quantifizierung wird das Signal der Peptide in der Probe gegen einen internen Standard, z.B: durch isotopen-markierte, synthetische AQUA (*absolute quantification*)-Peptide, abgeglichen [171, 174]. Durch Weiterentwicklung der Methode ließen sich in den letzten Jahren zahlreiche Membranproteine quantifizieren, darunter z.B. das Zellteilungskontrollprotein 12 von *S. cerevisiae* [171]. Für eine in Zukunft sehr relevante, präzise Quantifizierung des HA aus rekombinanter *K. lactis* bietet sich die MS als Methode der Wahl entsprechend an.

4.1.2 N-terminal verkürztes H1-Protein zeigt Instabilität in *K. lactis*

Um den Einfluss der *N*-Glykosylierung in *K. lactis* auf die Faltung und die Antigenität des rekombinanten H1_{PR8}-Proteins zu untersuchen, wurde eine modifizierte Variante des *H1*-Gens erstellt, welche nur für das H1-Protein ohne Signalpeptid (SP) kodiert. Signalpeptide sind Sequenzen mit einer Länge von ca. 16-39 Aminosäuren, welche in Eukaryoten z.B. sekretorische oder Membranproteine in die Membran des ERs leiten und üblicherweise während der Maturierung des Proteins durch Signalpeptidasen von diesem abgespalten werden [69, 145]. Das Signalpeptid ist im HA, welches in der Membran verankert ist, nicht mehr präsent [145] und hat daher keine antigene Funktion. Es wurde bereits beschrieben, dass rekombinant in Vero-Zellen (*African green monkey kidney cells*) hergestelltes H3 von Influenza A/Udorn/72 (H3N2) ohne SP im Zytoplasma akkumuliert und nicht glykosyliert ist [145]. Selbst eine stark verkürzte H1-Variante von A/CA/07/09 (aa 1-330) induzierte, nach Produktion in *E. coli* und anschließender Rückfaltung und Aufreinigung des Proteins, neutralisierende AK in Frettchen und führte zur Reduktion der Viruslast [72]. Die Tatsache, dass eine stark verkürzte HA-Variante, die in *E. coli*, in welchem keine *N*-Glykosylierung stattfindet, hergestellt wurde, eine native, immunogene Struktur ausbildete, legte nahe, dass die *N*-Glykosylierung nicht zwingend notwendig ist, um immunogenes HA-Protein zu generieren. Das N-terminal verkürzte H1_{PR8}-Protein aus VAK1091 wies eine molekulare

Masse von 63 kDa auf und war nicht *N*-glykosyliert (**Abb. 13A und B**), woraus geschlossen wurde, dass das Protein in *K. lactis* nicht in das ER transloziert wird. Die etwa um 25-fach geringere Proteinkonzentration (**Abb. 13A**) und der um ca. 12 h verkürzte Detektionszeitraum von mH1_{PR8} (**Abb. 15A**), im Vergleich zum Volllängen-H1 (**Abb. 8**), ließen eine Instabilität des modifizierten H1-Proteins vermuten. Die Entfernung des SPs führte ebenfalls in Studien anderer Arbeitsgruppen zu einem geringen Expressionsniveau von HA sowie zu einem Funktionsverlust des Proteins [50, 145]. Es wurde vermutet, dass die geringe Stabilität von mH1_{PR8} durch die fehlende *N*-Glykosylierung induziert wird. Dadurch kommt es wahrscheinlich zur Aggregation und Akkumulation des fehlgefalteten Proteins in *inclusion bodies* in *K. lactis*. In der Regel haben fehlgefaltete und defekte Proteine eine geringere Halbwertszeit und werden im Zytoplasma von Eukaryoten über die Ubiquitin (Ub)-abhängige Proteolyse degradiert. Dabei werden Ubiquitin-Moleküle Enzym-katalysiert an das zu degradierende Protein gebunden. Die mit dem Polyubiquitin markierten Proteine werden vom 26S-Proteasom erkannt. Das Ub wird entfernt, das Protein linearisiert und in dem zentralen Kern des Proteasoms in Peptide gespalten, die durch Peptidasen im Zytoplasma weiter zu Aminosäuren abgebaut werden [85]. Es ist zudem bekannt, dass ubiquitinierte Proteine in eukaryotischen Zellen in *inclusion bodies* wie dem im Bereich des Zellkerns gebildeten Kompartiment JUNQ (*juxtannuclear quality control compartment*) nahe des ERs akkumulieren können in welchem sich Proteasomen konzentrieren [64]. Die Degradierung fehlgefalteter Proteine und die Formierung von *inclusion bodies* wie dem JUNQ dienen der Zelle als Schutz vor einer intrazellulären Anreicherung toxischer, fehlgefalteter und beschädigter Proteine [64]. So wurde für das HA gezeigt, dass die einzelnen *N*-verknüpften Glykane für die ko- und posttranslationale Faltung des Proteins relevant sind und Modifikationen in der Anzahl die Faltung beeinträchtigen können [57]. Zudem wurde gezeigt, dass die Glykosylierung zur intrazellulären Stabilität und Resistenz gegenüber einer proteolytischen Degradation beiträgt [145]. Die im Zuge der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten zeigen eindeutig, dass das SP und die damit einhergehende Translokation des H1_{PR8}-Polypeptids in das ER von *K. lactis* sowie die im ER stattfindende *N*-Glykosylierung eine entscheidende Rolle bezüglich der Stabilität des Proteins einnehmen. Obwohl das N-terminal verkürzte H1 scheinbar nicht in das ER transloziert wird, ließ sich mH1_{PR8} im Zelllysat von VAK1091 nur im Pellet nachweisen (**Abb. 13 A und 15 A**). Die Fluoreszenzsignale für mH1_{PR8} indizierten eine Anreicherung des Proteins in peripheren Bereichen des Zellkerns, die Signale waren aber im Vergleich zum H1_{PR8} von deutlich geringerer Intensität (**Abb. 14**). Im Unterschied dazu führte die Entfernung des SPs in Studien anderer Arbeitsgruppen, bei denen das H2 von

A/Japan/305/57 (H2N2) bzw. das H3 von A/Udorn/72 (H3N2) in Vero-Zellen [50, 145] oder das H1 von A/WSN/33 (H1N1) in *S. cerevisiae* [60] produziert wurde, zur Akkumulation der HA-Proteine im Zytoplasma. Es wurde daher postuliert, dass das verkürzte H1-Protein in *K. lactis* wahrscheinlich im JUNQ akkumuliert und degradiert wird. Aufgrund der Instabilität des modifizierten H1 erwies sich der Ansatz, N-terminal verkürzte HA-Varianten rekombinant in *K. lactis* zu produzieren, als nicht geeignet.

4.2 Immunisierung gegen Influenza mit *K. lactis*-basierten *subunit*-Impfstoffen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine erfolgreiche Immunisierung mit rekombinanter *K. lactis* gegen eine Infektion mit dem Influenza-A-Virus, einem Virus der umhüllten Klasse, gezeigt (*proof of principle*). Die Produktion immunogener Glykoproteine, wie dem HA, ist in *K. lactis* daher ebenso möglich, wie die Produktion von zytoplasmatischen Proteinen (z.B. dem VP2-Kapsidprotein des IBD-Virus) und induziert eine schützende humorale Immunantwort in Mäusen. Des Weiteren wurden wichtige Erkenntnisse bezüglich der Dosis-Wirkungs-Beziehung von *K. lactis*-basierten *subunit*-Impfstoffen gewonnen, die eine Korrelation zwischen Impfdosis und Höhe der ausgebildeten AK-Titer sowie der Schutzwirkung implizieren.

4.2.1 Influenzavirus-spezifische Antikörper induzieren eine Schutzwirkung

Nachweis Virus-neutralisierender HA-spezifischer Antikörper

Erste Immunisierungsstudien in Mäusen mit rekombinanter *K. lactis* führten nur nach Applikation von 0,1 mg VAK952 (H1_{PR8}) zum Nachweis von Virus-neutralisierenden Antikörpern (nAK) im murinen Antiserum (**Abb. 16**). Die geringe Effizienz des Impfstoffes, ließ vermuten, dass die eingesetzte Impfdosis zu niedrig war, um nachweisbare nAK in allen Impfungen zu induzieren. In humanen Influenzaimpfstoffen werden deutlich höhere Konzentrationen an HA-Antigen (~15 µg) eingesetzt [127]. Da für VAK952 eine H1-Konzentration von 0,5 µg pro mg Hefe ermittelt wurde, betrug die Gesamtkonzentration an H1-Antigen bei drei Injektionen von je 0,1 mg VAK952 etwa 0,15 µg und war folglich um das 100-fache geringer als die in kommerziellen Influenzaimpfstoffen. In Studien anderer Arbeitsgruppen mit rekombinantem, aufgereinigtem H1 von A/California/04/09 (H1N1), hergestellt in *P. pastoris* [7], oder H5 von A/Viet Nam/1203/04 (H5N1), produziert in HEK293S-Zellen [27], wurden deutlich höhere Konzentrationen des HA-Antigens (10-50 µg pro Applikation) für die Immunisierung eingesetzt. Dabei korrelierte die eingesetzte HA-Konzentration mit der

Höhe der induzierten AK-Titer [7, 27]. In sich anschließenden Immunisierungsstudien mit zunehmenden VAK952-Konzentrationen (1 mg, 2 mg, 5 mg) zeigte sich eine ähnliche Dosis-Wirkungs-Beziehung. Die Höhe der gemessenen nAK-Titer korrelierte dabei mit der Impfdosis von VAK952 (**Abb. 17 und 23**). Die HA-Spezifität der im murinen Antiserum vorhandenen AK ließ sich im Western-Blot durch Verwendung von zytoplasmatischem Extrakt Virus-infizierter und scheininfizierter MDCK-Zellen verifiziert (**Abb. 21**). Neben der Ausbildung einer immunogenen Form des HAs (Vgl. 4.1.1) impliziert dies weiterhin, dass, ähnlich wie für *S. cerevisiae* von einer anderen Arbeitsgruppe bereits postuliert [2], auch *K. lactis* Zellen, die ein virales Glykoprotein produzieren, von Antigen-präsentierenden Zellen nach subkutaner Applikation phagozytiert und Epitope des Antigens über MHC-Peptid-Komplexe an T- und B-Zellen präsentiert werden. Ohne eine effiziente Präsentation des H1-Antigens wäre eine Generierung Virus-spezifischer nAK unwahrscheinlich. Aufgrund der durchschnittlich geringen nAK-Titer nach Immunisierung mit 1 mg VAK952 scheint eine entsprechende Impfdosis einen Schwellenwert zu markieren, bei welchem das Immunsystem nicht aller Individuen ausreichend stimuliert werden kann. Es ist bekannt, dass unterhalb einer bestimmten Schwelle die meisten Antigene keine Reaktion auslösen (Niedrigzonentoleranz). Oberhalb dieser Schwelle nimmt die Reaktion proportional zur verabreichten Konzentration bis zum Erreichen eines Plateaus zu und sinkt bei sehr hohen Dosierungen wieder ab (Hochzonentoleranz) [62]. Durch diese Hemmung wird möglicherweise die Toleranz gegenüber ubiquitären, körpereigenen Antigenen, wie z.B. Plasmaproteinen gewährleistet [62].

Aufgrund des erfolgreichen Nachweises Virus-spezifischer nAK nach Immunisierung mit VAK952 stellte sich die Frage, ob die Immunisierung mit dem Hefestamm VAK1047, der das H1_{Cal} aus Influenza A/CA/04/09 (H1N1) produziert, kreuzreaktive nAK gegen das für die Analysen eingesetzte Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1) erzeugen kann. Dabei zeigte sich auch nach Immunisierung mit der hohen Impfdosis (5 mg) keine effiziente Induktion kreuzreaktiver nAK in Mäusen (**Abb. 20**). Eine mögliche Ursache hierfür, könnte eine abweichende N-Glykosylierung beider H1-Proteine sein. So zeigten Studien einer anderen Arbeitsgruppe, dass Antiseren, die nach Immunisierung von BALB/c Mäusen mit einem DNA-Impfstoff, welches für H1 aus A/CA/04/09 kodiert gewonnen wurden, das Virus A/PR/8/34 nicht neutralisieren konnten. Als potenzielle Ursache wurde die N-Glykosylierung des H1-Proteins von A/PR/8/34 an der zusätzlichen N-Glykosylierungsposition (aa 144) in der HA-Kopfdomäne in Betracht gezogen, die womöglich zu einer Immunevasion beigetragen hat [187].

Induzierte Schutzwirkung durch *K. lactis*-basierte *subunit*-Impfstoffe

Um die Schutzwirkung rekombinanter Hefe zu untersuchen, wurden immunisierte Mäuse mit einer letalen Dosis des Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1) infiziert. Es ist bekannt, dass ein deutlicher Anstieg des nAK-Titers sowie hohe Virustiter im Lungengewebe der Tiere *post infectionem* (*p.i.*) auf ein höheres Maß der Antigenexposition schließen lassen, was indirekt Rückschlüsse auf die Virusreplikation im Organismus und die Schutzwirkung des verabreichten Impfstoffes zulässt. Eine aktive Replikation des Influenzavirus ließ sich in den Kontrolltieren (PBS, VAK367) nachweisen, die aufgrund des fehlenden H1-Antigenkontakts keine nAK entwickelten und daher ungeschützt gegen eine Infektion mit dem Influenzavirus waren. Infolge des Erstkontaktes mit dem Virusantigen wurde *p.i.* eine primäre Immunantwort induziert, die zur Ausbildung A/PR/8/34-spezifischer nAK führte (**Abb. 20**). Die Replikation des Virus führte zudem zum Nachweis hoher Virustiter im Lungengewebe beider Gruppen 4 d *p.i.* (**Abb. 25**). Trotz der für die PBS-Kontrolltiere letalen Virusinfektion führte die Immunisierung mit VAK367 zu einer 40%igen Protektion (**Abb. 22**) sowie zu einer etwas geringeren Viruslast im Lungengewebe der Tiere (**Abb. 25**). Ein ähnliches Phänomen wurde von einer anderen Arbeitsgruppe nach Immunisierung mit Freund-Adjuvans beobachtet, bei der die Verabreichung des Adjuvans alleine zu einem 10%igen Schutz gegen eine letale Infektion mit dem Influenzavirus vom Subtyp H7N9 führte [87]. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Komponenten der Hefezellwand und / oder das hier verwendete Adjuvans AddaVaxTM (siehe 4.2.2) die angeborene Immunantwort stimulieren. Diese kann zu einem gewissen Maß zu einem Schutz gegen eine virale Infektion beitragen, indem z.B. Immunzellen vermehrt in die Injektionsstelle infiltrieren und durch Freisetzung von Zytokinen weitere Immunzellen stimuliert werden [21]. Im Unterschied zu den Kontrollgruppen, führte die Immunisierung mit VAK952 (5 mg) zu einer 100%igen Protektion, verbunden mit der Ausbildung hoher nAK-Titer in allen Impfungen, die *p.i.* nicht weiter anstiegen sondern leicht abnahmen (**Abb. 20-24**). Die Reduktion der Titer *p.i.* lässt sich u.U. mit dem Erreichen einer Hochzonentoleranz (siehe oben) erklären, d.h., dass bei zu hoher Dosierung die AK-Konzentration wieder absinkt [62]. Da das Einbringen der Viruspartikel im Organismus der Maus als weitere *booster*-Immunisierung wirkt, wird dadurch wahrscheinlich eine entsprechende Toleranz erreicht. Die Überlebensrate von VAK952 immunisierten Tieren war mit 100 % deutlich höher als die von VAK367 immunisierten Tieren, was implizierte, dass die H1-spezifische Immunantwort und nicht das Adjuvans für die Hauptschutzwirkung gegen das Influenzavirus verantwortlich war. Nach Immunisierung mit geringer Impfdosis (2 mg)

VAK952 traten erste Anzeichen einer verringerten Schutzwirkung auf (**Abb. 23 und 25**). Daher wären zukünftig histologische Untersuchungen des Lungengewebes interessant, wodurch sich kleinste Veränderungen im Gewebe nachweisen oder Viruspartikel immunologisch anfärben ließen.

4.2.2 Das Adjuvans hat einen entscheidenden Einfluss auf den Erfolg der Immunisierung

Adjuvantien sind Substanzen, welche die Immunität gegen das Antigen, mit dem sie zusammen verabreicht werden, erhöhen können. Die Auswahl des Adjuvans beeinflusst dabei maßgeblich den Typ und die Wirksamkeit der induzierten Immunantwort [115]. Um den Einfluss des Adjuvans auf die humorale Immunantwort, d.h. die Ausbildung Virusneutralisierender AK sowie lokale Reizungen nach Applikation von rekombinanter *K. lactis* zu untersuchen, wurden Mäuse mit VAK952 und ausgewählten Adjuvantien immunisiert. Das Freund-Adjuvans (FA) galt bisher als "Goldstandard" unter den Adjuvantien, da es hohe AK-Titer induzieren kann. Sogenannte Wasser-in-Öl Emulsionen, wie das FA, erzeugen ein Depot des Antigens. Ziel dabei ist es, die Kontaktzeit zwischen Antigen und Immunsystem durch eine langsame Freisetzung des Antigens über einige Tage zu verlängern [101]. Dieser Effekt ähnelt dem multipler booster-Immunisierungen. Der starke adjuvante Effekt des FAs wird zudem durch die inaktivierten *Mycobacterium Tuberculosis* Komponenten im „complete“ FA und auf das enthaltene, nicht biologisch abbaubare Paraffinöl zurückgeführt [43]. Trotz der hohen immunogenen Eigenschaften führt das Adjuvans zu unerwünschten Nebenwirkungen wie Ulzera- und Granulombildung an der Injektionsstelle, was auf das enthaltene Mineralöl zurückgeführt wird [13]. In der Tat wurden nach Immunisierung von VAK952 mit FA hohe AK-Titer ($2-10 \log_2$) in drei von fünf Impfungen nachgewiesen (**Abb. 18**). Einige Tage nach der Immunisierung entwickelten sich starke Irritationen in Form von Granulombildung und z.T. von Haarverlust an den Injektionsstellen. Um die Toxizität des Mineralöls zu umgehen, wurde die Squalen-basierte Emulsion Montanide ISA 720 VG verwendet, ebenfalls eine Wasser-in-Öl Emulsion, die wie das FA ein Antigen-Depot erzeugt. Squalen ist ein lineares Triterpen, welches in zahlreichen Impfstoffen, z.B. gegen Malaria oder AIDS, aufgrund seiner stabilisierenden Eigenschaften und Metabolisierbarkeit im Zuge der Cholesterin-Biosynthese verwendet wird [42]. Montanide ISA 720 VG besteht aus 70 % Squalen, das mit 30 % Mannidmonooleat, einem als Emulgator wirkenden Tensid, kombiniert wird [42]. Das Adjuvans ist dafür bekannt, hohe AK-Titer in verschiedenen Tierspezies zu induzieren [110]. Die Immunisierung von VAK952 mit Montanide ISA 720 VG war ineffizient und

führte nur zur Entwicklung geringer AK-Titer (2-3 log₂) (**Abb. 18**). Da für die Formulierung von Montanide ISA 720 VG-basierten Impfstoffen eine sorgfältige Homogenisierung notwendig ist, um eine stabile Emulsion mit optimaler Wirksamkeit zu erstellen [110], ließ sich vermuten, dass die erforderliche Tröpfchengröße von 1 µm in der Studie mit VAK952 nicht erreicht wurde, wodurch das Adjuvans weniger wirksam war. Des Weiteren wurde AddaVax™, ein zum MF59® vergleichbares Adjuvans getestet. Letzteres ist in Europe als Adjuvans für saisonale Influenzaimpfstoffe, wie z.B: Fluad®, zugelassen [125]. Bei AddaVax™ und MF59® handelt es sich um Öl-in-Wasser Nano-Emulsionen, für die vermutet wird, dass sie zu einem lokal entzündeten und immunokompetenten Bereich an der Injektionsstelle führen. Die Zytokinfreisetzung durch Immunzellen nach Applikation lockt weitere Makrophagen an, wodurch das Antigen in die Lymphknoten gelangt und an T- und B-Zellen präsentiert wird, was wiederum zur Ausbildung Antigen-spezifischer Effektorzellen führt [21, 125]. Die Adjuvantien bestehen aus einer 4,3%igen (MF59®) bzw. 5%igen (AddaVax™) Squalenphase, welche durch die zwei nicht-ionischen Tenside (0,5 % Tween 80 und 0,5 % Span 85) stabilisiert wird [122]. Beide Adjuvantien zeichnen sich durch eine gute Verträglichkeit aus und induzieren hohe AK-Titer [21, 122]. Entsprechend führte die Immunisierung von VAK952 mit AddaVax™ in drei von fünf Impflingen zu hohen nAK-Titern, die vergleichbar mit denen nach Immunisierung mit FA waren (**Abb. 18**). Bei Verwendung von AddaVax™ ließen sich im Unterschied zum FA keine Ulcera- und Granulombildungen an den Injektionsstellen beobachten. AddaVax™ war daher bei vergleichbarer Wirksamkeit deutlich verträglicher. Um erste Erkenntnisse bezüglich der Eigenschaften der Zellwandkomponenten von *K. lactis* als Adjuvans zu gewinnen, wurde zudem VAK952 in *phosphate buffer saline* (PBS) verabreicht. Die Abwesenheit von lokalen Reizungen ließ auf eine gute Verträglichkeit der Hefe schließen. Ulzera und Granulombildung sind daher auf das jeweilige Adjuvans zurückzuführen (siehe oben). Im Unterschied zu Impfstoffen, die FA oder AddaVax™ enthielten, ließen sich im murinen Antiserum nur geringe AK-Titer (2-3 log₂) nachweisen (**Abb. 18**). Die antigenen Eigenschaften der Zellwandkomponenten von *K. lactis* waren daher deutlich weniger immunogen als der Einsatz konventioneller Adjuvantien, wie FA oder AddaVax™. Inwiefern die Hefepartikel und die als *pathogen associated molecular pattern* wirkenden Zellwandkomponenten von *K. lactis* zur Aufnahme durch dendritische Zellen beitragen, ist bisher nicht bekannt. Die Wirkung der *K. lactis*-basierten *subunit*-Impfstoffe wird dabei vermutlich auf einem ähnlichen Prozess beruhen, wie er für Impfstoffe die auf *S. cerevisiae* basieren angenommen wird [2] (siehe auch 1.3). Es lässt sich zusammenfassen, dass *K. lactis*-

basierte *subunit*-Impfstoffe kompatibel mit verschiedenen Adjuvantien sind, durch deren Einsatz sich eine Antigen-spezifische Immunantwort teilweise signifikant steigern ließ.

4.2.3 Schutzwirkung bei Verwendung verschiedener Impfschemata

Das verwendete Impfschema kann die Immunreaktion und damit den Erfolg der Immunisierung im Impfling beeinflussen. Das Impfschema wird durch die Anzahl der Immunisierungen sowie das Zeitintervall zwischen der Verabreichung zweier Impfdosen bestimmt und führt idealerweise zu einer protektiven Immunantwort im Impfling. Aufgrund des geringeren Impfaufwandes werden *one shot*-Immunisierungen gegenüber *prime-boost*-Injektionen bevorzugt, oft zu Lasten der Immunantwort. Die initiale Exposition eines Antigens (*priming*) führt zu einer Antigen-spezifischen primären Immunantwort und zu einem immunologischen Gedächtnis (*memory*) [61]. Bei einer weiteren Exposition mit dem selben Antigen (*booster*) führt das *memory* zu einer sekundären Immunantwort, die mit AK höherer Konzentration und Affinität einhergeht [62]. Aufgrund der höheren Wirksamkeit werden nach initialer Immunisierung oft weitere *booster*-Injektionen verabreicht [62]. Studien anderer Arbeitsgruppen zeigten, dass *one shot*-Immunisierungen mit rekombinanten HA-Impfstoffen in Mäusen eine Schutzwirkung gegen eine letale Virusinfektion induzierten, *prime-boost*-Immunisierungen aber zu höheren AK-Titern und einer breiteren Reaktivität führten [27, 68, 78, 142]. Zudem konnten weitere Forschergruppen zeigen, dass *booster*-Immunisierungen mit attenuierten Influenzaimpfstoffen die Entstehung hoher Konzentrationen Antigen-spezifischer CD8⁺-T-Zellen induzieren, deren Anzahl unmittelbar mit der Schutzwirkung des Impfstoffes korrelierte. Zudem wurde ein robustes CD8⁺-T-Zell *memory* sowie eine höhere CD4⁺-T-Zellantwort induziert [121, 154]. Letztere führt zur Selektion von B-Zellen höchster Antigen-Affinität [154]. Für die Ausbildung einer protektiven Immunantwort sind daher oft multiple Applikationen nötig [126]. Die Anwendung eines *prime-boost*- sowie eines *one shot*-Impfschemas für die Immunisierung von Mäusen mit VAK952 führte zur Ausbildung von AK, vergleichbar hoher Konzentration (4-12 log₂) (**Abb. 26**). Die *booster*-Immunisierung führte daher nicht zu einem weiteren Anstieg der AK-Titer. Es wurde postuliert, dass durch das kurze Impfintervall von zwei Wochen die Ausbildung einer adäquaten Immunantwort nicht realisierbar war. Es ist bekannt, dass zu früh hintereinander verabreichte Impfdosen die Effizienz des Impfstoffes beeinträchtigen können, da der Organismus des Impflings nicht ausreichend Zeit hat um eine Immunantwort aufzubauen [188]. Ein Impfintervall von ca. 4 Monaten ermöglicht eine effiziente Affinitätsmaturierung der *memory*-B-Zellen, wodurch eine höhere sekundäre Immunantwort induziert wird [132]. Im Bereich der Nutztierhaltung, in der die natürliche

Lebenserwartung der Tiere um ein Vielfaches verkürzt ist, wäre ein derartig langes Intervall nicht zu realisieren. Zumal die Tiere in dieser Zeit nur unzureichend gegen virale Infektionen geschützt wären. Herkömmliche aviäre Influenzaimpfstoffe werden i.d.R. in der 3. Lebenswoche initial- und nach weiteren drei Wochen *booster*-immunisiert, was zu einem ausreichend hohen protektiven AK-Titer führt. Die hohen nAK-Titer, sechs Wochen nach *one shot*-Immunisierung mit VAK952 waren bemerkenswert und ließen ein Antigen-Depot des *antigen delivery*-Systems *K. lactis* vermuten. Sogenannte *delivery*-Systeme ermöglichen eine Art *prime-boost*-Immunisierung durch nur eine Injektion [115], indem das Antigen durch Verlangsamung der Diffusion in das umgebende Gewebe dem Immunsystem über einen längeren Zeitraum präsentiert wird. Dadurch wird es möglich, dass der AK-Titer über einen längeren Zeitraum zunimmt. Für die intramuskuläre Verabreichung von Antigen-AddaVax™ Emulsionen wurde bisher kein solches Antigen-Depot an der Injektionsstelle beobachtet [122], sodass das Adjuvans alleine einen entsprechenden Effekt nicht induzieren sollte. Im Zuge dessen wäre die Analyse der Bioverteilung und Eliminierung der Hefe von der Injektionsstelle, z.B. durch Fluoreszenz-Markierung von *K. lactis* und einer Verfolgung des Fluoreszenzsignals durch nicht-invasive multispektrale Fluoreszenzbildgebung, interessant.

Die Anwendung verkürzter Impfschemata führte zu einer hohen Schutzwirkung (80-100 %) in Mäusen nach Immunisierung mit hoher (5 mg) und niedriger (2 mg) Impfdosis von VAK952 (**Abb. 27A und 36A**). Insbesondere bei Verwendung der geringen Dosis traten erste Anzeichen einer verringerten Schutzwirkung auf (**Abb. 36**). Durch Immunisierung mit einem Impfstamm erhöhter Antigenkonzentration (VAK1283) ließ sich die Schutzwirkung bei niedriger Dosis verbessern (**Abb. 36**) (siehe auch 4.4.1). Der *proof of principle* ließ sich daher auf die Anwendung eines klassischen *prime-boost*-Schemas sowie eine *one shot*-Immunisierung erweitern.

4.3 Herstellung und Stabilität von *K. lactis*-basierten *subunit*-Impfstoffen

Impfstoffe sind biologisch hergestellte Arzneimittel, die mit einer erhöhten Variabilität einhergehen und deren Wirksamkeit durch den Produktionsprozess sowie die anschließende Lagerung des Produktes beeinträchtigt werden kann [108].

Produktion / Wachstum von *K. lactis*

Die angestrebte Produktion von Hefe-basierten Impfstoffen in vollsynthetischem Medium ermöglicht die kontaminationsfreie Herstellung für die Erstellung von Dossiers für die

Zulassung durch die regulatorischen Behörden. Erste Untersuchungen im Schüttelkolben zum Wachstum von *K. lactis* in synthetischem Medium mit Lactose (SL) zeigten, dass die Biomasseausbeute gering ist (**Abb. 9A**), was verschiedene Ursachen haben kann. Bei metabolischen Prozessen in der Hefezelle entstehen Nebenprodukte, die in das Anzuchtmedium abgegeben werden und dieses ansäuern. Bei Kultivierung von VAK952 und VAK367 (nicht rekombinant) in SL-Medium ließ sich nach 12 h eine starke Ansäuerung der Kulturen beobachten, wohingegen bei Anzucht in Lactose-haltigem Vollmedium der pH-Wert weitestgehend konstant blieb. Der niedrige pH-Wert könnte sich negativ auf das Wachstum auswirken. Neben der Ansäuerung des Mediums kann das Wachstum auch durch das im Medium enthaltene Vitamin Niacin limitiert werden. Da das hier verwendete synthetische Medium für *S. cerevisiae* optimiert ist, welche Niacin selbst synthetisieren kann, ist es möglich, dass die im Medium enthaltene Konzentration für *K. lactis* zu gering ist. Ein Mangel der Kohlenstoffquelle Lactose kann ausgeschlossen werden, da 12 h nach Beginn der Induktion mit Lactose (Erntezeitpunkt) nur 5 % der gesamten Lactosekonzentration in den Kulturen beider Hefestämme verbraucht war (Dr. Matthias Suhr, unveröffentlichte Daten). Welche Parameter das Wachstum von *K. lactis* in synthetischem Medium limitieren, ist derzeit noch nicht ausreichend untersucht. Aufschluss darüber werden zukünftige Fermentationsstudien unter kontrollierten Bedingungen liefern. Im Zuge der Generierung multivalenter Hefestämme (siehe 4.4.1) zeigten Uracil-prototrophe *K. lactis*-Stämme in Vollmedium ein besseres Wachstum als Uracil-auxotrophe (**Abb. 32A und B**). In kürzlich durchgeführten Fermentationsstudien mit E2- oder H1-rekombinanten, Uracil- und Methionin-prototrophen *K. lactis*-Stämmen, zeigte sich im synthetischen Medium ein besseres Wachstum und es wurden höhere Biomasseausbeuten erzielt. Zudem ließ sich eine stetige Zunahme der Antigen-Konzentration beobachten, die teilweise höher war als bei auxotrophen Hefestämmen (Dr. Matthias Suhr, unveröffentlichte Daten). Die Prototrophie der Hefestämme hat daher einen entscheidenden Einfluss auf das Wachstum und die Biomasseproduktion von *K. lactis*. Ähnliches wurde von einer anderen Arbeitsgruppe für *S. cerevisiae* beobachtet. Es wurde gezeigt, dass im Gegensatz zur Prototrophie die Supplementation von Nährstoffen in einer geringeren Wachstumsgeschwindigkeit resultiert, da dies die aktive Aufnahme der auxotroph benötigten Komponente durch die Zelle erfordert [63, 133]. Des Weiteren lassen dieser Arbeit vorangegangene Studien mit *K. lactis*, welche ein H7-Protein des Influenza-A-Virus produziert, einen Einfluss der Wachstumstemperatur und der Fermentationsdauer auf die Glykosylierung des Proteins vermuten [5]. Es bleibt daher zu untersuchen, inwieweit die Produktion der Hefestämme im Fermenter in synthetischem Medium die Antigenität der rekombinanten Hefe

beeinflusst. Für Fremdgene, die bei Expression einen zytopathischen Effekt induzieren, wie z.B. *H1*, könnte es nötig sein, einen Zweiphasigen Fermentationsprozess durchzuführen. Folglich könnte eine sehr hohe Ausbeute an Hefe-Biomasse in Glucose-Medium (geringe Fremdgenexpression) produziert und durch eine möglichst kurze Induktionsphase in Lactose-haltigem Medium eine maximale Konzentration an Virusantigen erhalten werden.

Sterilisation *K. lactis*-basierter *subunit*-Impfstoffe

Neben der Anzucht selbst hat auch die weitere Prozessierung der Hefe bis hin zum final eingesetzten Hefe-basierten Impfstoff einen erheblichen Einfluss auf das Antigen. Die Anwendung des Standardprotokolls (Gefriertrocknung und Hitzeinaktivierung des Hefematerials) führte bisher nicht zu einem sterilen Endprodukt. Daher wurde der Einfluss der Sterilisation durch ionisierende Strahlung auf die Antigen-Konzentration und die Immunogenität des Impfstoffes untersucht. Diese Methode wird bereits seit längerem zur Inaktivierung von Viren und zur Sterilisation von z.B. Labormaterial eingesetzt [96]. Bereits bei den initialen Stabilitätsuntersuchungen im Western-Blot zeigte sich, dass die Intensität des H1-Signals mit zunehmender Strahlendosis abnahm und bei einer Zieldosis von 50 kGy auf weniger als die Hälfte des Ausgangssignals reduziert war (**Abb. 29A**). Es ist bekannt, dass γ -Strahlung durch Sauerstoffradikale wie Hydroxyradikale die bei der Radiolyse chemischer Bindungen wie z.B. Wasser entstehen, die Proteinstruktur zerstören kann und es zur Degradation und Aggregation von Polypeptidketten kommt [44]. So wurde bereits gezeigt, dass die Entstehung von Radikalen in wässriger Lösung zu Veränderungen in den Glykoproteinen des Sendai Virus (murines Parainfluenzavirus Typ 1) führt, wodurch dessen Funktion der Hämagglutination (Agglutination von Erythrozyten) beeinträchtigt war [106]. Im Unterschied dazu wurde VAK952 gefriergetrocknet, wobei die Eiskristalle im gefrorenen Hefepellet ohne Auftreten einer flüssigen Phase direkt in den gasförmigen Aggregatzustand übergehen (Sublimation). Nach Herstellerangaben der verwendeten Gefriertrocknungsanlage ist eine geringe Restfeuchtigkeit von < 1 % im Lyophilisat möglich und daher die Entstehung von Sauerstoffradikalen in *K. lactis* nicht auszuschließen. Studien anderer Arbeitsgruppen mit Influenzaviren legen zudem nahe, dass die Manifestierung von Strahlenschäden in Glykoproteinen temperaturabhängig ist. So hatte eine Lagerung von Virusproben bei -80 °C keinen Effekt auf die Hämagglutination, eine Lagerung bei 4-20 °C ging mit einer zunehmenden Abnahme dieser Aktivität einher [32, 96]. Trotz dieser Verluste in der Aktivität des Proteins zeigten

die durch γ -Strahlen inaktivierten Viren keinen erheblichen Verlust in der Antigenität [96]. Die in diesen Studien verwendete Zieldosis von 15,6 kGy war jedoch deutlich geringer als die in der vorliegenden Arbeit getesteten. Inwieweit die Lagerung und der Rücktransport der γ -bestrahlten, nicht gekühlten Hefe, einen Einfluss auf die H1-Proteinstruktur hatte ist bisher nicht bekannt.

Die Antigenität γ -bestrahlter VAK952-Proben wurde in Mäusen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Anwendung der maximalen Zieldosis (50 kGy) zu einem 100%igen Verlust der Wirksamkeit von VAK952 führte (**Abb. 29B**). Dies lässt sich wahrscheinlich auf Veränderungen im H1-Protein als Folge der Strahleneinwirkung zurückführen, was zu einer geringeren Konzentration an immunogenem H1 führte. Bei Anwendung der regulär akzeptierten Zieldosis (25 kGy) wurden keine gravierenden Unterschiede zu den nach Standardprotokoll produzierten Hefen beobachtet. Ähnliche Daten wurden für VP2-rekombinante *K. lactis* erhalten (Dr. Hans Hürlimann, unveröffentlichte Daten). Eine Zieldosis von 25 kGy könnte folglich als Sterilisationsverfahren zur Anwendung kommen. Um diese Daten zu verifizieren sind weitere Studien insbesondere mit fermentiertem Hefematerial notwendig. Eine Dokumentation der Sterilität des Hefe-basierten Impfstoffes in finalen Behältnissen steht noch aus.

Lagerstabilität *K. lactis*-basierter subunit-Impfstoffe

Gemäß der Richtlinie Q1A(R2) der ICH (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*) dient die Stabilitätstestung dem Nachweis, inwieweit die Qualität des Produktes in Abhängigkeit von der Zeit unter dem Einfluss von Umweltfaktoren (Temperatur, Luftfeuchte und Licht) variiert. Dies dient dazu, eine Haltbarkeitsdauer und empfohlene Lagerungsbedingungen festzusetzen. In Anlehnung an die Richtlinie wurde daher der Einfluss einer halbjährigen Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen auf das H1-Antigen und die Immunogenität von VAK952 untersucht. Obwohl unabhängig von der Lagerungstemperatur kein erkennbarer Abbau des H1-Proteins zu beobachten war (**Abb. 28A**), zeigte sich nach Immunisierung mit Proben, die bei 4 °C gelagert wurden, ein deutlicher Verlust der Immunogenität in Mäusen (**Abb. 28B**). Immunisierungen mit Proben, die bei 37 °C gelagert wurden, zeigten im Vergleich dazu eine ähnlich gute Wirkung wie frisch produzierte Hefe. Der *K. lactis*-basierte subunit-Impfstoff VAK952 scheint daher eine hohe Haltbarkeit bei trockener Lagerung und auch bei hoher Außentemperatur aufzuweisen. Aufgrund der geringen Anzahl der verwendeten Tiere sind diese Daten als initial zu betrachten und dienen nur als Orientierung für spätere Versuche mit finalen Impfstämmen. Die

Möglichkeit den Impfstoff über einen längeren Zeitraum ohne Kühlung transportieren oder lagern zu können, wäre ein wesentlicher Vorteil und *K. lactis*-basierte Impfstoffe würden sich entsprechend dieser Daten signifikant gegenüber anderen Impfstoffen auszeichnen. So muss bei Lebendimpfstoffen wie z.B. *Marek's disease vaccine* oder dem *subunit*-Impfstoff Vaxxitek HVT (*Herpesvirus of turkeys*) & IBDV (beide von Boehringer Ingelheim) bzw. bei Influenzaimpfstoffen die Kühlkette strikt eingehalten werden, um den Impfstoff aktiv zu halten [82]. Dies erfordert oft eine aufwändige Kryolagerung in flüssigem Stickstoff. Sowohl hohe Temperaturen, als auch niedrige Temperaturen können die HA-Struktur oder die Struktur anderer Komponenten des Impfstoffes beeinträchtigen. So wurde z.B. die Wirksamkeit von Aluminium-Adjuvans sowie inaktivierten Influenzaimpfstoffen durch Einfrieren der Proben z.T. stark beeinträchtigt [82].

4.4 Optimierung von *K. lactis*-basierten Impfstoffen

Die Erhöhung der Impfdosis von VAK952 um einen Faktor von bis zu 50 führte zu einem drastischen Anstieg der Immunreaktion (**Abb. 19**). Aufgrund vereinzelt auftretender Nebenwirkungen (Ulzera, Granulome) bei Verwendung hoher Impfdosen sowie der damit einhergehenden erhöhten Produktionskosten und -zeit wurde diese Strategie nicht präferiert. Die Anwendbarkeit einer weiteren Strategie, nämlich die Expression multipler Fremantigene in einer Hefezelle, wurde in der vorliegenden Arbeit für die Expression multipler Influenza-A-Gene demonstriert. Zudem wurde durch Einsatz eines modifizierten Promoters die Regulierbarkeit der Fremdgenexpression erzielt.

4.4.1 Generierung multivalenter Impfstoffe

Nach Immunisierung von VAK952 mit niedriger Impfdosis oder verkürztem Impfschema traten erste Anzeichen einer verringerten Schutzwirkung auf (siehe 4.2.1 und 4.2.3). Die Immunogenität des Hefe-basierten Impfstoffes sollte daher durch Erhöhung der intrazellulären Antigen-Konzentration gesteigert werden.

Expression von zwei *H1*-Genkopien in *K. lactis*

Ein erster Ansatz verfolgte dabei das Ziel, durch Insertion einer weiteren *H1*-Genkopie in den für die Insertion neu erschlossenen *URA3*-Locus von *K. lactis* die Konzentration des *H1*-Proteins zu erhöhen. Die Insertion einer weiteren Genkopie in VAK952 führte, im Vergleich zu Hefestämmen mit nur einer *H1*-Genkopie, zu einer um etwa 25 % gesteigerten *H1*-Konzentration in *K. lactis*, die zudem mit einer verstärkten Reduktion

des Wachstums korrelierte (**Abb. 31, 32A und B**). Eine Verdopplung der H1-Antigenkonzentration durch Expression der beiden *H1*-Gene an unterschiedlichen Loci, jeweils unter Kontrolle des *LAC4-12*-Promoters, wurde nicht erreicht. Ähnliche Beobachtungen wurden bei einer Koexpression der für die Kapsidproteine VP2, VP6 und VP7 kodierenden Gene des Rotavirus in *S. cerevisiae* gemacht. Dabei zeigte sich, dass bei Verwendung eines Plasmids, das für alle drei Antigene kodiert (Tandem), die Antigen-Konzentration, im Vergleich zum Einbringen von drei einzelnen Plasmiden, deutlich gesteigert werden konnte [73, 139]. Letzteres führte zu einem reduzierten Wachstum der Hefe. Es wurde vermutet, dass die metabolische Belastung durch die nötige Supplementation von drei Auxotrophien oder durch limitierte Ressourcen für die heterologe Proteinsynthese zu einer geringeren Ausbeute des rekombinanten Proteins führte [139]. Inwieweit die H1-Konzentration in *K. lactis* durch Verwendung einer Tandem-Expressions-kassette und / oder prototrophen Varianten der verwendeten Methionin-auxotrophen Stämme verbessert werden kann, gilt es noch im Detail zu untersuchen (Vgl. 4.3). Eine erste Studie in Mäusen indizierte, mit Einschränkung aufgrund fehlender belastbarer Statistik, eine leicht verbesserte Wirksamkeit des *K. lactis*-basierten Impfstoffes durch die Expression von zwei *H1*-Genen (**Abb. 33**).

Expression von zwei verschiedenen Genen des Influenzavirus (*H1, M1*) in *K. lactis*

Ein zweiter Ansatz verfolgte das Ziel, durch Insertion eines weiteren Gens des Influenza-A-Virus, welches für das Matrixprotein 1 (M1) kodiert, die Immunogenität zu steigern. Die Insertion des *M1*-Gens in den *URA3*-Locus von VAK952 führte zum Nachweis des H1- und des M1-Proteins im Zelllysat von VAK1283, wobei M1 ebenfalls in beiden Fraktionen (löslich und Pellet) detektiert wurde (**Abb. 34A**). Das M1-Protein wird im natürlichen Wirt an Ribosomen im Zytoplasma translatiert und gelangt anschließend durch das *nuclear localization signal* in den Zellkern zurück, wo es mit neu gebildeten Ribonukleoproteinen (RNP) und dem *nuclear export protein* (NEP), welches den Export der M1-RNP-Komplexe vermittelt, assoziiert [15, 22]. Da sowohl das RNP als auch das NEP in *K. lactis* nicht vorhanden sind, ist eine Akkumulation des M1-Proteins im Zytoplasma und im Zellkern von *K. lactis* anzunehmen. Ein ähnliches Phänomen wurde mit dem M1-Protein des *Infectious salmon anemia virus* (ISAV), das ebenfalls zur Familie der *Orthomyxoviridae* gehört, in Fischen nachgewiesen [200]. Zudem ist bekannt, dass das M1 an den zytoplasmatischen Teil und die Transmembrandomäne von HA binden kann [10]. Da HA möglicherweise im ER von *K. lactis* mit Detergens-resistenten *lipid rafts* assoziiert (Vgl. 4.1.1), könnte die Bindung von M1 an das HA mit

einer erhöhten Detergens-Resistenz des M1-Proteins einhergehen. Erste Untersuchungen zur Wirksamkeit des Impfstammes weisen auf eine verbesserte Schutzwirkung von VAK1283 in Mäusen bei Anwendung der geringen Impfdosis (2 mg) und verkürztem Impfschema hin (**Abb. 35 und 36**). Die verbesserte Wirksamkeit lässt sich wahrscheinlich auf das zusätzlich zum H1 in *K. lactis* gebildete M1 zurückführen. So ist bekannt, dass M1 die Ausbildung zytotoxischer CD8⁺-T-Lymphozyten (CTL) induziert [37, 79]. Studien in Mäusen zeigten, dass Influenzavirus-spezifische CTL zur Reduktion der Viruslast beitragen und gegen eine letale Virusinfektion schützen [168]. Da es nach Immunisierung mit VAK1283 und anschließender Virusinfektion zu einem Anstieg der AK-Titer kam (**Abb. 35**), wäre es interessant in einem weiteren Experiment, die Viruslast 4 Tage *p.i.* im Lungengewebe der Tiere zu untersuchen. Dadurch ließen sich Aussagen über die Virusreplikation in den mit VAK1283 immunisierten Tieren treffen. In Studien anderer Arbeitsgruppen zeigte sich, dass die Koexpression der für M1 und H1 kodierenden Gene zur Ausbildung von VLPs führen kann [12, 95]. VLPs formen sich aus viralen Strukturproteinen, welche die inhärente Eigenschaft zur Selbstassemblierung besitzen und die Morphologie des Pathogens nachahmen können [83]. Influenza-VLPs, die zum Zwecke der Immunisierung generiert werden, setzen sich oft aus den viralen Glykoproteinen HA und / oder NA und einem der beiden Matrixproteine (M1, M2) zusammen [169]. Es wurde gezeigt, dass Hefen zur Produktion von VLPs, sowohl für unbehüllte als auch für umhüllte Viren verwendet werden können [73]. Über 30 verschiedene VLP-Typen wurden bisher in Hefe hergestellt, eine Vielzahl davon in *S. cerevisiae* und *P. pastoris*, wie z.B. VLPs bestehend aus dem HBsAg-Protein des Hepatitis-B-Virus oder aus dem viralen VP1-Protein des Norovirus [73, 184]. Vor kurzem wurde innerhalb der Arbeitsgruppe die VLP-Bildung in *K. lactis* für das VP2-Protein des IBDV nachgewiesen (Dr. Hans Hürlimann, unveröffentlichte Daten). Im Gegensatz zu Viren der unbehüllten Klasse, welche die Zelle durch Zelllyse nach der intrazellulären Assemblierung verlassen, werden Viren der umhüllten Klasse über das sogenannte *budding* (Knospung) aus der Zelle freigesetzt [73]. Im Unterschied zu Säugerzellen wird die Zellmembran der Hefen von einer Zellwand umgeben. Es wird daher angenommen, dass die Sekretion umhüllter VLPs im Stadium des *buddings* gestoppt wird, da Hefen diesen Prozess nicht ermöglichen [73]. Hinweise, dass VLPs bestehend aus dem H5 von A/Indonesia/5/05 (H5N1) zwischen Zellmembran und Zellwand von Pflanzen akkumulieren können, wurden in *Nicotiana benthamiana* unter Verwendung der Elektronenmikroskopie gewonnen [30]. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von VAK1283 erbrachten bisher keinen Nachweis darüber, dass H1 und M1 zur Ausbildung von VLP-Strukturen in *K. lactis*, insbesondere in den zuvor genannten Bereichen führen

(Daten nicht gezeigt). Vor kurzem wurde aufgezeigt, dass die Qualität und Quantität der in Hefe generierten VLPs durch die Wahl des Plasmids, des Promoters und das Verhältnis der generierten Strukturproteine, beeinflusst werden kann [73]. So zeigte sich für das Parvovirus B19, dessen Viruskapsid zu 95 % aus dem VP2 und einem geringen Anteil des VP1-Proteins besteht, dass durch Kontrolle des Expressionsniveaus von VP2 und VP1 die Ausbildung von VLPs in *S. cerevisiae* signifikant gesteigert werden konnte [25]. Inwieweit sich das Verhältnis von H1- und M1-Konzentration positiv auf die VLP-Bildung in *K. lactis* auswirkt, gilt es unter Anwendung von Plasmiden, die eine Justierung des Expressionsniveaus ermöglichen (siehe 4.4.2), zu untersuchen.

4.4.2 Verbessertes Wachstum durch gezielte Veränderung von $P_{LAC4-12}$

Die heterologe Genexpression in Mikroorganismen ist dann problematisch, wenn dies zu einem zytopathischen Effekt (CPE) führt, der sich, wie für das H1 in *K. lactis* VAK952, in einem reduzierten Wachstum äußert (**Abb. 9A und B**) und zelluläre Stressantworten induziert [116]. Dadurch kann die Biomasseproduktion massiv eingeschränkt werden. Durch einen *fed-batch*-Prozess im Fermenter ist eine Entkopplung der Produktionsphase des Antigens von der Biomasse-Akkumulationsphase partiell möglich, da sich der $P_{LAC4-12}$, unter dessen Kontrolle sich das Fremdgen befindet, mit Lactose induzieren lässt. $P_{LAC4-12}$ ist unter nicht-induzierten Bedingungen nicht vollständig stillgelegt und eine basale Expression des *H1*-Gens findet statt. Folglich zeigt sich bereits bei Anzucht in Glucose-haltigem Medium ein reduziertes Wachstum (**Abb. 9B**). Um die Ausgangsfitness von *K. lactis* und dadurch das Wachstum in der Induktionsphase zu verbessern, sollte die basale Genexpression von *H1* unter nicht-induzierten Bedingungen möglichst niedrig gehalten werden. Es war bereits bekannt, dass die LR2-Deletion der *basal control region* (BCR) im $P_{LAC4-12}$ zur Reduktion der *LAC4*-Transkription in Abwesenheit des induzierenden Zuckers auf ein nicht detektierbares Level führt [107]. Eine entsprechende LR2-Deletion der BCR führte in rekombinanten *K. lactis*-Stämmen zu einer Unterdrückung des H1-bedingten CPEs und folglich zu einem verbesserten Wachstum unter nicht-induzierten als auch unter induzierten Bedingungen, ging jedoch mit einer geringeren H1-Konzentration in *K. lactis* einher (**Abb. 31 und 32**). Inwiefern die LR2-Deletion das Wachstum und die Antigenausbeute rekombinanter *K. lactis*-Stämme in einem zweistufigen Fermentations-Prozess beeinflusst, gilt es noch zu untersuchen. Neben der BCR beinhaltet die 2,6 kb große intergenische Region zwischen *LAC12* und *LAC4* vier *upstream activating sequences* (U) (**Abb. 30**), die als Bindestellen für den Transkriptionsaktivator KIGal4 fungieren [51, 107]. Für eine maximale Induktion ist die vollständige Besetzung der vier Positionen mit KIGal4 nötig [51]. Innerhalb der

Arbeitsgruppe konnte vor Kurzem gezeigt werden, dass eine weitere Modifizierung des $P_{LAC4-12}$, d.h. die LR2-Deletion in Kombination mit der Deletion von U4 und U5, zu einer erfolgreichen Modifizierung des Expressionsniveaus von IBDV-VP2 in *K. lactis* führte (Dr. Hans Hürlimann, unveröffentlichte Daten). Diese Justierung der Expression von Fremdgenen in *K. lactis* eröffnet die Möglichkeit die Expression toxischer Fremdgene gering zu halten oder das Expressionsniveau verschiedener Gene zu regulieren, was u.U. zur Ausbildung von VLPs beitragen kann (Vgl. 4.4.1).

4.5 Evaluierung des Potenzials *K. lactis*-basierter Impfstoffe

Der Nachweis, dass *K. lactis*-basierte Impfstoffe zur Immunisierung gegen Influenzaviren eingesetzt werden können, wurde in der vorliegenden Arbeit erbracht. Im Folgenden soll das Potenzial für die Anwendung des *K. lactis*-basierten Expressionssystems zur Entwicklung von Impfstoffen gegen aviäre Influenzaviren (AIV) abgeschätzt und mögliche Problemstellungen aufgeführt werden.

K. lactis basierte *subunit*-Impfstoffe bieten die Möglichkeit, geimpfte von natürlich infizierten Tieren zu unterscheiden (DIVA), z.B. durch den Nachweis von AK, die durch Infektionen mit Feldviren induziert werden. Der Impfstoff kann in hohen Quantitäten in definiertem Medium kultiviert werden, ist erregerefrei und damit sicher in der Anwendung. Damit adressiert die innovative Impfstoffplattform viele Probleme konventioneller Influenzaimpfstoffe (siehe 1.2). Aufgrund des Impfverbotes in der EU gegen AIV der Subtypen H5 und H7 [19] wird im Rahmen des VEROVACCiNES-Projektes gegenwärtig ein Impfstoff gegen ein niedrigpathogenes AIV vom Subtyp H9N2 entwickelt. H9N2-Viren sind in einigen Ländern Eurasiens endemisch [31, 65, 88] und z.T. in der Lage, Säugetiere und Vögel effizient zu infizieren [161, 199]. Da H9N2-Viren mit anderen relevanten AIV vom Subtyp H5 und H7 koziirkulieren und reassortieren, besteht ein erhöhtes Risiko für die Entstehung neuer Influenzaviren [66, 161] die u.U. auf den Menschen übertragen werden und eine Pandemie auslösen können [66].

Durch Anwendung der bereits gewonnenen Erkenntnisse ließ sich die Entwicklungszeit neuer rekombinanter *K. lactis*-Stämme auf wenige Wochen verkürzen. Die in der vorliegenden Arbeit generierten Daten ließen sich dabei unmittelbar auf die Erstellung rekombinanter *K. lactis* anwenden, welche *H9*-Gene exprimieren und sich derzeit in der Testung befinden. Neben viralen Proteinen wie VP2 (IBDV) sowie E2 und NS3 aus BVDV ließen sich innerhalb des Projektes auch multiple Influenza-A-Gene erfolgreich in *K. lactis* produzieren. Dazu gehören die hier aufgeführten Proteine H1 und M1, das H9

(Daten nicht gezeigt) sowie H5 und H7, die in vorangegangenen Studien charakterisiert wurden [5, 123]. Dabei zeigte sich ein erheblicher Einfluss der Codon-Optimierung des Fremdgens und z.T. des Signalpeptids auf die Antigenausbeute [4, 5, 80, 123]. Das Potenzial von *K. lactis*, verschiedene Virusproteine gleichzeitig herzustellen, bietet die Möglichkeit, das Impfstoffportfolio von AIV auf Influenzaviren von Schweinen und Pferden zu erweitern und sogenannte Kombinationsimpfstoffe zu erstellen. Kombinationsimpfstoffe enthalten eine Vielzahl von Antigenen, die sich gegen einen oder mehrere Krankheitserreger richten und aufgrund des reduzierten Impfaufwandes, vor allem für die Nutztierhaltung, von besonderem Interesse sind [108]. So wird z.B. ein seit August 2017 von der EMA (*European Medicines Agency*) autorisierter rekombinanter Lebendimpfstoff gegen verschiedene Geflügelpathogene verwendet (Innovax-ND-IBD (Merck Animal Health)), mit dem sich durch eine *one shot*-Immunsierung ein Schutz gegen die Erkrankungen *Newcastle disease*, infektiöse Bursitis und die Marek'sche Krankheit in Hühnern induzieren lässt. Außerhalb der EU, z.B. in Südkorea, China oder im Iran, werden inaktivierte Kombinationsimpfstoffe angewandt, die gegen aviäre Influenza-A-Viren (z.B. vom Subtyp H9 oder H5) und *Newcastle disease virus* immunisieren. Die Produktion von Kombinationsimpfstoffen ist aufgrund der separaten Herstellung der einzelnen Erreger und anschließenden Zusammenführung der Komponenten bisher allerdings sehr aufwändig [108]. Die *K. lactis*-basierte Impfstoffplattform bietet die Möglichkeit der stabilen Insertion mehrerer Fremdgene in aktuell drei verschiedene Loci (*LAC4*, *URA3*- und *MET5*-Locus) des Hefegenoms bereits früh in der Entwicklung, was einen wichtigen Fortschritt in der Impfstoffentwicklung markiert.

Für die Zulassung des Impfstoffes und um die Chargen-Reproduzierbarkeit zu gewährleisten wird es unerlässlich sein, eine exakte Quantifizierung aller in *K. lactis* produzierten viralen Antigene durchzuführen. Die densitometrische Analyse (Western-Blot), wie sie bisher durchgeführt wird, ist dahingehend stark limitiert (Vgl. 4.1.1), insbesondere durch die für den Nachweis benötigten Antigen-spezifischen AK und aufgereinigten Proteinstandards, die bei neu auftretenden AIV nur schwer kommerziell erhältlich sind. Für eine absolute Antigen-Quantifizierung durch Massenspektrometrie ist ein Zellaufschluss und die Solubilisierung von Membranproteinen derzeit noch nötig [171]. Eine entsprechende Protokoll-Etablierung wird aber von Firmen wie z.B. *Creative Proteomics* (New York, USA) zusammen mit der Analyse angeboten. Die Quantifizierung der viralen Antigene in *K. lactis* stellt daher eine große Herausforderung dar, die von der zukünftigen Entwicklung innovativer Quantifizierungsmethoden geprägt sein wird. Ebenfalls stellt die Verfügbarkeit effizienter Analyse-Systeme, mit denen sich der aktuelle

Immunstatus sowie eine durch den Impfstoff induzierte Schutzwirkung effizient nachweisen lassen, ein Problem für die Entwicklung der Impfstoffe dar. Im Gegensatz zum Virusneutralisationstest (VNT) ermöglichen schnell durchzuführende Systeme, wie der *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) oder der Hämagglutinations-Inhibitionstest (HAI), keine Aussage über das Virus-neutralisierende Potenzial der gemessenen AK [146, 172]. Der erforderliche Einsatz infektiöser Viruspartikel kann, insbesondere bei hoch pathogenen Viren, die Durchführung des VNTs unter höheren Sicherheitsbestimmungen erfordern.

Insbesondere im Zusammenhang mit der Entwicklung von *K. lactis*-basierten Impfstoffen gegen AIV gilt es, das kreuzprotektive Potenzial zu adressieren. Herkömmliche Influenzaimpfstoffe induzieren keine starke heterosubtypische Immunantwort, da der Hauptanteil der generierten AK nicht mit HA- oder NA-Antigenen anderer Subtypen kreuzreagiert [154]. Dies führt oft zu einem *mismatch* zwischen dem Influenzaimpfstoff und zirkulierenden Influenzastämmen [12, 162]. Um solche Defizite zu überwinden, wird entsprechend schon seit langer Zeit versucht Impfstoffe zu entwickeln, die eine Kreuzprotektion gegen verschiedene Influenzasubtypen aufweisen. AK, die gegen die konservierte Stielregion des HAs oder auf der Virusoberfläche exponierter Epitope des Matrixproteins 2 (M2) gerichtet sind, zeigen z.T. Kreuzreaktivität und neutralisieren Influenzaviren verschiedener Subtypen, werden aber oft nur in geringen Konzentrationen produziert [71, 87, 157]. In den letzten Jahren wurde zunehmend deutlich, dass neben Virus-spezifischen AK vor allem CD8⁺-T-Zellen (CTL) zur Tilgung der Influenzaviren nach Infektion beitragen, indem sie in infizierten Zellen die Apoptose einleiten [2, 154]. Bei der Entwicklung von *K. lactis*-basierten Impfstoffen sollten zukünftige Analysen daher auch die zelluläre Immunantwort untersuchen, insbesondere die Ausbildung Antigen-spezifischer CTL. Entsprechend stimulative Impfstoffe hätten ein großes Potenzial und könnten möglicherweise eine breitere Schutzwirkung erreichen. Dass Hefe-basierte Impfstoffe in der Lage sind, Antigen-spezifische CD4⁺- und CD8⁺-T- zu induzieren, wurde vor kurzem unter Anwendung *S. cerevisiae*-basierter Impfstoffe in Mäusen gezeigt, die das HIV-1 Antigen oder Tumorantigene produzieren [2, 158].

K. lactis bietet daher die Möglichkeit, als Plattform für Impfstoffe gegen AIV als auch gegen eine Vielzahl weiterer Viruspathogene Anwendung zu finden. Die stetige Weiterentwicklung der Plattform wird zu effizienteren, beständigeren Impfstoffen führen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Influenzaviren (IV) zählen zu den weltweit wichtigsten respiratorischen Viruspathogenen, welche unterschiedliche Wirtsspezies (inkl. den Menschen) infizieren. Das Virus ist hoch kontagiös und führt beim Menschen zu jährlich wiederkehrenden Epidemien, die mit ca. einer halben Mio. Todesfällen weltweit einhergehen. Regelmäßig wiederkehrende Ausbrüche der aviären Influenza (AI) im Geflügel führen jährlich zu Milliardenverlusten in der Nutztierhaltung. Aufgrund der raschen Veränderung zirkulierender Viren durch *antigenic-shift* und *-drift*, gestaltet sich die Entwicklung universal einsetzbarer Impfstoffe schwierig. Herkömmlich verwendete Influenzaimpfstoffe enthalten inaktivierte Viren und werden überwiegend in embryonierten Hühnereiern produziert. Aufgrund der damit einhergehenden Risiken, wie Kontaminationen und einer fehlenden oder nur schwer umsetzbaren Unterscheidung geimpfter und ungeimpfter Tiere (DIVA-Strategie), besteht ein großer Bedarf an alternativen Impfstoffen. Innerhalb des Projektes VEROVACCiNES werden innovative Impfstoffe gegen verschiedene Tierseuchen entwickelt. Die Plattform basiert auf der Lebensmittelhefe *Kluyveromyces lactis* in der definierte, immunogene Proteine (Antigene) aus Erregern rekombinant und damit erregerefrei gebildet werden (*subunit*-Markerimpfstoffe). Die Insertion der Fremdgene erfolgt über ein einfaches, Verfahren gezielt in das Genom der Hefe und die Selektion rekombinanter Stämme erfolgt ohne den Einsatz von Antibiotika. Die Synthese des Fremdproteins wird während der Wachstumsphase durch Zugabe des kostengünstigen Zuckers Lactose induziert. Die gesamten Zellen werden in inaktivierter Form direkt als Impfstoff eingesetzt. Zeit- und kostenintensive Antigen-Extraktionsschritte entfallen. In der vorliegenden Arbeit wurden neuartige *K. lactis*-basierte Impfstoffe gegen das Influenza-A-Virus entwickelt. Diese induzieren nach subkutaner Applikation im Mausmodell die Bildung Virus-neutralisierender Antikörper (AK) und generieren einen vollständigen Schutz gegen eine letale Virusinfektion (*proof of principle*). Mit diesen bahnbrechenden Ergebnissen wurde auch erstmals gezeigt, dass das Glykoprotein Hämagglutinin (H1) des Influenzavirus in antigener Form in *K. lactis* synthetisiert werden kann. Es wurde eine Korrelation zwischen eingesetzter Impfdosis und der Höhe der ausgebildeten Antikörpertiter sowie der induzierten Schutzwirkung beobachtet. Durch Einsatz alternativer Adjuvantien ließ sich die AK-Konzentration erhöhen und gleichzeitig die Verträglichkeit des Impfstoffes verbessern, selbst bei hoher Impfdosis. Das Impfschema ließ sich von ursprünglich drei Injektionen auf ein klassisches *prime-boost*-Schema sowie auf eine *one shot*-Immunisierung vereinfachen, ohne dass erhebliche Verluste in der Schutzwirkung

festgestellt wurden. Die Antigenität des *K. lactis*-basierten Impfstoffes konnte durch Erstellung und Anwendung von Hefestämmen nochmals gesteigert werden, die entweder zwei *H1*-Gene oder zwei verschiedene Gene des Influenzavirus (*H1*- und *M1*) exprimieren. Durch Koexpression der für das Hämagglutinin (H1) und das Matrixprotein 1 (M1) kodierenden Gene konnte die Schutzwirkung gegen eine Infektion mit dem Influenzavirus auch bei niedriger Impfdosis erreicht werden. Durch Modifikation des *LAC4-12*-Promoters ließ sich der durch die Expression des *H1*-Gens verursachte zytopathische Effekt unter nicht-induzierten Bedingungen beseitigen, was zu einem verbesserten Wachstum des *K. lactis*-basierten Impfstoffes unter nicht-induzierten und induzierten Bedingungen führte. Das verbesserte Wachstum ging mit einer reduzierten H1-Konzentration einher. Weitere Daten demonstrierten eine hohe Stabilität des *K. lactis*-basierten Impfstoffes bei trockener Lagerung, auch bei hoher Außentemperatur. Der Impfstoff lässt sich entsprechend über einen längeren Zeitraum ohne Kühlung transportieren und lagern, ohne einen gravierenden Verlust der Antigenität aufzuweisen. Die Verwendung ionisierender Strahlung zur Sterilisation des Hefe-basierten Impfstoffes führte bei regulär akzeptierter Zieldosis (25 kGy) nicht zu einem Verlust der Antigenität. Das Verfahren könnte daher zur regulären Sterilisation des Impfstoffes angewandt werden. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sollten sich unmittelbar auf die Entwicklung mono- und multivalenter *K. lactis*-basierter Impfstoffe gegen AI-Viren anwenden lassen, von denen sich derzeit einige in der Testphase befinden. *K. lactis* ist daher ein geeignetes Expressionssystem für die Herstellung innovativer, sicherer Impfstoffe mit einer breiten Anwendbarkeit für Antigene verschiedener Viruspathogene. Die Plattform bietet neue Technologien und Werkzeuge, um flexibel und effizient Impfstämme zu generieren, zu kultivieren und Antigene, auch in Kombination, herzustellen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Akada, R., Kawahata, M., and Nishizawa, Y. 2000. Elevated temperature greatly improves transformation of fresh and frozen competent cells in yeast. *BioTechniques* 28, 5, 854–856.
- [2] Ardiani, A., Higgins, J. P., and Hodge, J. W. 2010. Vaccines based on whole recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells. *FEMS yeast research* 10, 8, 1060–1069.
- [3] Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G. E., and Pedersen, J. 2006. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein expression and purification* 48, 1, 1–13.
- [4] Arnold, M., Durairaj, V., Mundt, E., Schulze, K., Breunig, K. D., and Behrens, S.-E. 2012. Protective vaccination against infectious bursal disease virus with whole recombinant *Kluyveromyces lactis* yeast expressing the viral VP2 subunit. *PloS one* 7, 9, e42870.
- [5] Arnold-Klingbeil, M. 2014. *Entwicklung von Kluyveromyces lactis-basierten Vakzinen gegen Infektiöse Bursitis und Influenza*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- [6] Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E., Grosdidier, A., Hernandez, C., Ioannidis, V., Kuznetsov, D., Liechti, R., Moretti, S., Mostaguir, K., Redaschi, N., Rossier, G., Xenarios, I., and Stockinger, H. 2012. ExPASy. SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic acids research* 40, Web Server issue, W597-603.
- [7] Athmaram, T. N., Saraswat, S., Santhosh, S. R., Singh, A. K., Suryanarayana, W. S., Priya, R., Gopalan, N., Parida, M., Rao, Lakshmana Rao, P. V., and Vijayaraghavan, R. 2011. Yeast expressed recombinant Hemagglutinin protein of novel H1N1 elicits neutralising antibodies in rabbits and mice. *Virology journal* 8, 524.
- [8] Backhaus, K., Heilmann, C. J., Sorgo, A. G., Purschke, G., Koster, C. G. de, Klis, F. M., and Heinisch, J. J. 2010. A systematic study of the cell wall composition of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast (Chichester, England)* 27, 8, 647–660.
- [9] Barbieri M., Ed. 2015. *Code Biology: A New Science of Life*. Springer International Publishing AG Switzerland.
- [10] Barman, S., Ali, A., Hui, E. K.-W., Adhikary, L., and Nayak, D. P. 2001. Transport of viral proteins to the apical membranes and interaction of matrix protein with glycoproteins in the assembly of influenza viruses. *Virus research* 77, 1, 61–69.
- [11] Baxter D. 2007. Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing. *Occupational medicine (Oxford, England)* 57, 8, 552–556.
- [12] Berlanda Scorza, F., Tsvetnitsky, V., and Donnelly, J. J. 2016. Universal influenza vaccines. Shifting to better vaccines. *Vaccine* 34, 26, 2926–2933.
- [13] Billiau, A. and Matthys, P. 2001. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *Journal of leukocyte biology* 70, 6, 849–860.
- [14] Bouvier, N. M. and Lowen, A. C. 2010. Animal Models for Influenza Virus Pathogenesis and Transmission. *Viruses* 2, 8, 1530–1563.
- [15] Bouvier, N. M. and Palese, P. 2008. The biology of influenza viruses. *Vaccine* 26 Suppl 4, D49-53.
- [16] Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248–254.
- [17] Breunig, K. D., Bolotin-Fukuhara, M., Bianchi, M. M., Bourgarel, D., Falcone, C., Ferrero, I., Frontali, L., Goffrini, P., Krijger, J. J., Mazzoni, Milkowski, C., Steensma, H. Y., Wésolowski-Louvel, M., and Zeeman, A. M. 2000. Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. *Enzyme and microbial technology* 26, 9-10, 771–780.
- [18] Breunig, K. D. and Steensma, H. Y. 2003. *Kluyveromyces lactis*: Genetics, physiology, and application. *Functional Genetics of Industrial Yeasts*, 171–205.

- [19] Bundesministeriums der Justiz und für Verbraucherschutz in Zusammenarbeit mit der juris GmbH. 2007. *Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest (Geflügelpestverordnung), GeflPestSchV*. <http://www.gesetze-im-internet.de/geflpestschv/>.
- [20] Burkhart, M. D., Kayman, S. C., He, Y., and Pinter, A. 2003. Distinct Mechanisms of Neutralization by Monoclonal Antibodies Specific for Sites in the N-Terminal or C-Terminal Domain of Murine Leukemia Virus SU. *Journal of virology* 77, 7, 3993–4003.
- [21] Calabro, S., Tritto, E., Pezzotti, A., Taccone, M., Muzzi, A., Bertholet, S., Gregorio, E. de, O'Hagan, D. T., Baudner, B., and Seubert, A. 2013. The adjuvant effect of MF59 is due to the oil-in-water emulsion formulation, none of the individual components induce a comparable adjuvant effect. *Vaccine* 31, 33, 3363–3369.
- [22] Cao, S., Liu, X., Yu, M., Li, J., Jia, X., Bi, Y., Sun, L., Gao, G. F., and Liu, W. 2012. A nuclear export signal in the matrix protein of Influenza A virus is required for efficient virus replication. *Journal of virology* 86, 9, 4883–4891.
- [23] Caton, A. J., Brownlee, G. G., Yewdell, J. W., and Gerhard, W. 1982. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype). *Cell* 31, 2 Pt 1, 417–427.
- [24] Celik, E. and Calik, P. 2012. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology advances* 30, 5, 1108–1118.
- [25] Chandramouli, S., Medina-Selby, A., Coit, D., Schaefer, M., Spencer, T., Brito, L. A., Zhang, P., Otten, G., Mandl, C. W., Mason, P. W., Dormitzer, P. R., and Settembre, E. C. 2013. Generation of a parvovirus B19 vaccine candidate. *Vaccine* 31, 37, 3872–3878.
- [26] Cheng, X., Eisenbraun, M., Xu, Q., Zhou, H., Kulkarni, D., Subbarao, K., Kemble, G., and Jin, H. 2009. H5N1 vaccine-specific B cell responses in ferrets primed with live attenuated seasonal influenza vaccines. *PloS one* 4, 2, e4436.
- [27] Cornelissen, L. A. H. M., Vries, R. P. de, Boer-Luijtzte, E. A. de, Rigter, A., Rottier, P. J. M., and de Haan, C. A. M. 2010. A single immunization with soluble recombinant trimeric hemagglutinin protects chickens against highly pathogenic avian influenza virus H5N1. *PloS one* 5, 5, e10645.
- [28] Cros, J. F. and Palese, P. 2003. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus. Influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus research* 95, 1-2, 3–12.
- [29] Daniell, H., Singh, N. D., Mason, H., and Streatfield, S. J. 2009. Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. *Trends in plant science* 14, 12, 669–679.
- [30] D'Aoust, M.-A., Couture, M. M.-J., Charland, N., Trépanier, S., Landry, N., Ors, F., and Vézina, L.-P. 2010. The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants. A rapid, efficient and safe response to pandemic influenza. *Plant biotechnology journal* 8, 5, 607–619.
- [31] Davidson, I., Fusaro, A., Heidari, A., Monne, I., and Cattoli, G. 2014. Molecular evolution of H9N2 avian influenza viruses in Israel. *Virus genes* 48, 3, 457–463.
- [32] DeFlora, S. de and Badolati, G. 1973. Thermal inactivation of untreated and gamma-irradiated A2-Aichi-2-68 influenza virus. *The Journal of general virology* 20, 2, 261–265.
- [33] Der Rat der Europäischen Union. 2006. Richtlinie 2005/94/EG des Rates vom 20. Dezember 2005. mit Gemeinschaftsmaßnahmen zur Bekämpfung der Aviären Influenza und zur Aufhebung der Richtlinie 92/40/EWG. *Amtsblatt der Europäischen Union*.
- [34] Dubois, J., Terrier, O., and Rosa-Calatrava, M. 2014. Influenza viruses and mRNA splicing. Doing more with less. *mBio* 5, 3, e00070-14.
- [35] Dunkelberger, J. R. and Song, W.-C. 2010. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell research* 20, 1, 34–50.
- [36] Eggink, D., Goff, P. H., and Palese, P. 2014. Guiding the immune response against influenza virus hemagglutinin toward the conserved stalk domain by hyperglycosylation of the globular head domain. *Journal of virology* 88, 1, 699–704.
- [37] Egorov A. Y. 2016. The challenges of creating a universal influenza vaccine. *Microbiological Independent Research Journal*.
- [38] Ferrara, F., Molesti, E., and Temperton, N. 2015. The application of pseudotypes to influenza pandemic preparedness. *Future Virology* 10, 6, 731–749.

- [39] Fischer, G., Rocha, E. P. C., Brunet, F., Vergassola, M., and Dujon, B. 2006. Highly variable rates of genome rearrangements between hemiascomycetous yeast lineages. *PLoS genetics* 2, 3, e32.
- [40] Flynn, P. J. and Reece, R. J. 1999. Activation of Transcription by Metabolic Intermediates of the Pyrimidine Biosynthetic Pathway. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1, 882–888.
- [41] Fontana, J. and Steven, A. C. 2013. At low pH, influenza virus matrix protein M1 undergoes a conformational change prior to dissociating from the membrane. *Journal of virology* 87, 10, 5621–5628.
- [42] Fox, C. B. 2009. Squalene emulsions for parenteral vaccine and drug delivery. *Molecules (Basel, Switzerland)* 14, 9, 3286–3312.
- [43] Freund, J. 1951. The effect of paraffin oil and mycobacteria on antibody formation and sensitization; a review. *American journal of clinical pathology* 21, 7, 645–656.
- [44] Gaber, M. H. 2005. Effect of gamma-irradiation on the molecular properties of bovine serum albumin. *Journal of bioscience and bioengineering* 100, 2, 203–206.
- [45] Galarza, J. M., Latham, T., and Cupo, A. 2005. Virus-like particle (VLP) vaccine conferred complete protection against a lethal influenza virus challenge. *Viral immunology* 18, 1, 244–251.
- [46] Gallagher, J. R., Torian, U., McCraw, D. M., and Harris, A. K. 2017. Structural studies of influenza virus RNPs by electron microscopy indicate molecular contortions within NP supra-structures. *Journal of structural biology* 197, 3, 294–307.
- [47] Gamblin, S. J. and Skehel, J. J. 2010. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *The Journal of biological chemistry* 285, 37, 28403–28409.
- [48] Ge, H., Wang, Y.-F., Xu, J., Gu, Q., Liu, H.-B., Xiao, P.-G., Zhou, J., Liu, Y., Yang, Z., and Su, H. 2010. Anti-influenza agents from Traditional Chinese Medicine. *Natural product reports* 27, 12, 1758–1780.
- [49] Gerdil, C. 2003. The annual production cycle for influenza vaccine. *Vaccine* 21, 16, 1776–1779.
- [50] Gething, M.-J. and Sambrook, J. 1982. Construction of influenza haemagglutinin genes that code for intracellular and secreted forms of the protein. *Nature* 300, 5893, 598–603.
- [51] Gödecke A., Zachariae W., Arvanitidis A., and Breunig K. D. 1991. Coregulation of the *Kluyveromyces lactis* lactose permease and beta-galactosidase genes is achieved by interaction of multiple LAC9 binding sites in a 2.6 kbp divergent promoter. *Nucleic acids research*.
- [52] Graaf, M. de and Fouchier, R. A. M. 2014. Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis. *The EMBO journal* 33, 8, 823–841.
- [53] Hale, B. G., Randall, R. E., Ortín, J., and Jackson, D. 2008. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *The Journal of general virology* 89, Pt 10, 2359–2376.
- [54] Harris, A., Cardone, G., Winkler, D. C., Heymann, J. B., Brecher, M., White, J. M., and Steven, A. C. 2006. Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 50, 19123–19127.
- [55] Harris, A., Forouhar, F., Qiu, S., Sha, B., and Luo, M. 2001. The crystal structure of the influenza matrix protein M1 at neutral pH. M1-M1 protein interfaces can rotate in the oligomeric structures of M1. *Virology* 289, 1, 34–44.
- [56] Hayashi, T., MacDonald, L. A., and Takimoto, T. 2015. Influenza A Virus Protein PA-X Contributes to Viral Growth and Suppression of the Host Antiviral and Immune Responses. *Journal of virology* 89, 12, 6442–6452.
- [57] Hebert, D. N., Zhang, J.-X., Chen, W., Foellmer, B., and Helenius, A. 1997. The Number and Location of Glycans on Influenza Hemagglutinin Determine Folding and Association with Calnexin and Calreticulin. *J Cell Biol* 139, 3, 613–623.
- [58] Huang, X., Liu, T., Muller, J., Levandowski, R. A., and Ye, Z. 2001. Effect of influenza virus matrix protein and viral RNA on ribonucleoprotein formation and nuclear export. *Virology* 287, 2, 405–416.

- [59] Hutchinson, E. C. and Fodor, E. 2013. Transport of the influenza virus genome from nucleus to nucleus. *Viruses* 5, 10, 2424–2446.
- [60] Jabbar M. A., Nayak D. P. 1987. Signal Processing, Glycosylation, and Secretion of Mutant Hemagglutinins of a Human Influenza Virus by *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*
- [61] Janeway C. A., Travers P., Walport M., et al., Ed. 2001. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. Immunological memory*. Garland Science, New York.
- [62] Janeway C. A., Travers P., Walport M., Shlomchik M., Ed. 2002. *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- [63] Jund, R., Chevallier, M. R., and Lacroute, F. 1977. Uracil transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of membrane biology* 36, 2-3, 233–251.
- [64] Kaganovich, D., Kopito, R., and Frydman, J. 2008. Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. *Nature* 454, 7208, 1088–1095.
- [65] Kandeil, A., El-Shesheny, R., Maatouq, A., Moatasim, Y., Cai, Z., McKenzie, P., Webby, R., Kayali, G., and Ali, M. A. 2017. Novel reassortant H9N2 viruses in pigeons and evidence for antigenic diversity of H9N2 viruses isolated from quails in Egypt. *The Journal of general virology* 98, 4, 548–562.
- [66] Kandeil, A., El-Shesheny, R., Maatouq, A. M., Moatasim, Y., Shehata, M. M., Bagato, O., Rubrum, A., Shanmuganatham, K., Webby, R. J., Ali, M. A., and Kayali, G. 2014. Genetic and antigenic evolution of H9N2 avian influenza viruses circulating in Egypt between 2011 and 2013. *Archives of virology* 159, 11, 2861–2876.
- [67] Kang, S.-M., Kim, M.-C., and Compans, R. W. 2012. Virus-like particles as universal influenza vaccines. *Expert review of vaccines* 11, 8, 995–1007.
- [68] Kang, S.-M., Song, J.-M., Quan, F.-S., and Compans, R. W. 2009. Influenza vaccines based on virus-like particles. *Virus research* 143, 2, 140–146.
- [69] Kapp, K., Schrepf, S., and Lemberg, M. K. und Dobberstein, B. 2013. *Post-Targeting Functions of Signal Peptides*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6322/>.
- [70] Khan, K. H. 2013. Gene expression in Mammalian cells and its applications. *Advanced pharmaceutical bulletin* 3, 2, 257–263.
- [71] Khanna, M., Sharma, S., Kumar, B., and Rajput, R. 2014. Protective immunity based on the conserved hemagglutinin stalk domain and its prospects for universal influenza vaccine development. *BioMed research international* 2014, 546274.
- [72] Khurana, S., Verma, S., Verma, N., Crevar, C. J., Carter, D. M., Manischewitz, J., King, L. R., Ross, T. M., and Golding, H. 2010. Properly folded bacterially expressed H1N1 hemagglutinin globular head and ectodomain vaccines protect ferrets against H1N1 pandemic influenza virus. *PLoS one* 5, 7, e11548.
- [73] Kim, H. J. and Kim, H.-J. 2017. Yeast as an expression system for producing virus-like particles. What factors do we need to consider? *Letters in applied microbiology* 64, 2, 111–123.
- [74] Kim, H. M., Lee, Y.-W., Lee, K.-J., Kim, H. S., Cho, S. W., van Rooijen, N., Guan, Y., and Seo, S. H. 2008. Alveolar macrophages are indispensable for controlling influenza viruses in lungs of pigs. *Journal of virology* 82, 9, 4265–4274.
- [75] Kirunda, H., Erima, B., Tumushabe, A., Kiconco, J., Tugume, T., Mulei, S., Mimbe, D., Mworosi, E., Bwogi, J., Luswa, L., Kibuuka, H., Millard, M., Byaruhanga, A., Ducatez, M. F., Krauss, S., Webby, R. J., Webster, R. G., Wurapa, K., Byarugaba, D. K., and Wabwire-Mangen, F. 2014. Prevalence of influenza A viruses in livestock and free-living waterfowl in Uganda. *BMC veterinary research* 10, 50.
- [76] Koonin, E. V., Senkevich, T. G., and Dolja, V. V. 2006. The ancient Virus World and evolution of cells. *Biology direct* 1, 29.
- [77] Krammer, F. and Palese, P. 2013. Influenza virus hemagglutinin stalk-based antibodies and vaccines. *Current opinion in virology* 3, 5, 521–530.
- [78] Krammer, F. and Palese, P. 2015. Advances in the development of influenza virus vaccines. *Nature reviews. Drug discovery* 14, 3, 167–182.

- [79] Kreijtz, J. H. C. M., Fouchier, R. A. M., and Rimmelzwaan, G. F. 2011. Immune responses to influenza virus infection. *Virus research* 162, 1-2, 19–30.
- [80] Krijger, J.-J., Baumann, J., Wagner, M., Schulze, K., Reinsch, C., Klose, T., Onuma, O. F., Simon, C., Behrens, S.-E., and Breunig, K. D. 2012. A novel, lactase-based selection and strain improvement strategy for recombinant protein expression in *Kluyveromyces lactis*. *Microbial cell factories* 11, 112.
- [81] Krijger J.-J. 2002. *Carbon Source-Responsive Elements and gene regulation by CAT8 and SIP4 in the yeast Kluyveromyces lactis*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- [82] Kumru, O. S., Joshi, S. B., Smith, D. E., Middaugh, C. R., Prusik, T., and Volkin, D. B. 2014. Vaccine instability in the cold chain. Mechanisms, analysis and formulation strategies. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization* 42, 5, 237–259.
- [83] Kushnir, N., Streatfield, S. J., and Yusibov, V. 2012. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform. Diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine* 31, 1, 58–83.
- [84] Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 5259, 680–685.
- [85] Lecker, S. H., Goldberg, A. L., and Mitch, W. E. 2006. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 17, 7, 1807–1819.
- [86] Lee, M.-K., Kim, H.-E., Park, E.-B., Lee, J., Kim, K.-H., Lim, K., Yum, S., Lee, Y.-H., Kang, S.-J., Lee, J.-H., and Choi, B.-S. 2016. Structural features of influenza A virus panhandle RNA enabling the activation of RIG-I independently of 5'-triphosphate. *Nucleic acids research* 44, 17, 8407–8416.
- [87] Leung, H.-C., Chan, C. C.-S., Poon, V. K.-M., Zhao, H.-J., Cheung, C.-Y., Ng, F., Huang, J.-D., and Zheng, B.-J. 2015. An H5N1-based matrix protein 2 ectodomain tetrameric peptide vaccine provides cross-protection against lethal infection with H7N9 influenza virus. *Emerging microbes & infections* 4, 4, e22.
- [88] Li, C., Bu, Z., and Chen, H. 2014. Avian influenza vaccines against H5N1 'bird flu'. *Trends in biotechnology* 32, 3, 147–156.
- [89] Li, J., Yu, M., Zheng, W., and Liu, W. 2015. Nucleocytoplasmic shuttling of influenza A virus proteins. *Viruses* 7, 5, 2668–2682.
- [90] Liebler, D. C. and Zimmerman, L. J. 2013. Targeted quantitation of proteins by mass spectrometry. *Biochemistry* 52, 22, 3797–3806.
- [91] Lin, K. L., Suzuki, Y., Nakano, H., Ramsburg, E., and Gunn, M. D. 2008. CCR2+ monocyte-derived dendritic cells and exudate macrophages produce influenza-induced pulmonary immune pathology and mortality. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 180, 4, 2562–2572.
- [92] Liu, B., Gong, X., Chang, S., Yang, Y., Song, M., Duan, D., Wang, L., Ma, Q., and Wu, J. 2009. Disruption of the OCH1 and MNN1 genes decrease N-glycosylation on glycoprotein expressed in *Kluyveromyces lactis*. *Journal of biotechnology* 143, 2, 95–102.
- [93] Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. (2000)., Ed. 2000. *Molecular Cell Biology. Section 6.3, Viruses: Structure, Function, and Uses*. New York: W. H. Freeman.
- [94] Lõoke, M., Kristjuhan, K., and Kristjuhan, A. 2011. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *BioTechniques* 50, 5, 325–328.
- [95] López-Macías, C. 2012. Virus-like particle (VLP)-based vaccines for pandemic influenza. Performance of a VLP vaccine during the 2009 influenza pandemic. *Human vaccines & immunotherapeutics* 8, 3, 411–414.
- [96] Lowy, R., Vavrina, G. A., and LaBarre, D. D. 2001. Comparison of gamma and neutron radiation inactivation of influenza A virus. *Antiviral Research* 52, 3, 261–273.
- [97] Lund, J. M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N. C., Gale, N. W., Iwasaki, A., and Flavell, R. A. 2004. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 15, 5598–5603.
- [98] Magadán, J. G., Khurana, S., Das, S. R., Frank, G. M., Stevens, J., Golding, H., Bennink, J. R., and Yewdell, J. W. 2013. Influenza A virus hemagglutinin trimerization completes monomer folding and antigenicity. *Journal of virology* 87, 17, 9742–9753.
- [99] Maley, F., Trimble, R. B., Tarentino, A. L., and Plummer, T. H. 1989. Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Analytical biochemistry* 180, 2, 195–204.
- [100] Marangon, S. and Busani, L. 2007. The use of vaccination in poultry production. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 26, 1, 265–274.
- [101] Marciani, D. J. 2003. Vaccine adjuvants. Role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *Drug Discovery Today* 8, 20, 934–943.
- [102] Matrosovich, M., Matrosovich, T., Garten, W., and Klenk, H.-D. 2006. New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays. *Virology journal* 3, 63.
- [103] Matrosovich, M., Tuzikov, A., Bovin, N., Gambaryan, A., Klimov, A., Castrucci, M. R., Donatelli, I., and Kawaoka, Y. 2000. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *Journal of virology* 74, 18, 8502–8512.
- [104] McAleer, W. J., Buynak, E. B., Maigetter, R. Z., Wampler, D. E., Miller, W. J., and Hilleman, M. R. 1984. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* 307, 5947, 178–180.
- [105] Medina, R. A. and García-Sastre, A. 2011. Influenza A viruses. New research developments. *Nature reviews. Microbiology* 9, 8, 590–603.
- [106] Megumi, T., Fujita, S., Iwai, Y., and Ito, T. 1993. The effect of gamma-ray-induced radicals on activities and membrane structure of Sendai virus in aqueous solutions. *Radiation research* 134, 2, 129–133.
- [107] Mehlgarten, C., Krijger, J.-J., Lemnian, I., Gohr, A., Kasper, L., Diesing, A.-K., Grosse, I., and Breunig, K. D. 2015. Divergent Evolution of the Transcriptional Network Controlled by Snf1-Interacting Protein Sip4 in Budding Yeasts. *PLoS one* 10, 10, e0139464.
- [108] Merkle, A., Lechner, H., Oppling, V., and Meyer, H. 2014. Prüfung von Impfstoffen. Die Herausforderung der Prüfung komplexer Kombinationsimpfstoffe. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 57, 10, 1188–1192.
- [109] Mignon, C., Sodoyer, R., and Werle, B. 2015. Antibiotic-free selection in biotherapeutics. Now and forever. *Pathogens (Basel, Switzerland)* 4, 2, 157–181.
- [110] Miles, A. P., McClellan, H. A., Rausch, K. M., Zhu, D., Whitmore, M. D., Singh, S., Martin, L. B., Wu, Y., Giersing, B. K., Stowers, A. W., Long, C. A., and Saul, A. 2005. Montanide ISA 720 vaccines. Quality control of emulsions, stability of formulated antigens, and comparative immunogenicity of vaccine formulations. *Vaccine* 23, 19, 2530–2539.
- [111] Milián, E. and Kamen, A. A. 2015. Current and emerging cell culture manufacturing technologies for influenza vaccines. *BioMed research international* 2015, 504831.
- [112] Miller J. H., Ed. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [113] Mollinedo, F. 2012. Lipid raft involvement in yeast cell growth and death. *Frontiers in oncology* 2, 140.
- [114] Morton, D. and Griffiths, P. 1985. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Veterinary Record* 116, 16, 431–436.
- [115] Moyle, P. M. and Toth, I. 2013. Modern subunit vaccines: development, components, and research opportunities. *ChemMedChem* 8, 3, 360–376.
- [116] Munzel L. 2015. *Die unfolded protein response in Kluyveromyces lactis - Transkriptionsregulation und Einfluss auf Zellphysiologie und Produktion heterologer Proteine*. Masterarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- [117] Murakami, S., Horimoto, T., Le Mai, Q., Nidom, C. A., Chen, H., Muramoto, Y., Yamada, S., Iwasa, A., Iwatsuki-Horimoto, K., Shimojima, M., Iwata, A., and Kawaoka, Y. 2008. Growth

- determinants for H5N1 influenza vaccine seed viruses in MDCK cells. *Journal of virology* 82, 21, 10502–10509.
- [118] Muramoto, Y., Noda, T., Kawakami, E., Akkina, R., and Kawaoka, Y. 2013. Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA. *Journal of virology* 87, 5, 2455–2462.
- [119] Nicaud, J.-M., Madzak, C., Broek, P., Gysler, C., Duboc, P., Niederberger, P., and Gaillardin, C. 2002. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS yeast research* 2, 3, 371–379.
- [120] Noda, T. 2011. Native morphology of influenza virions. *Frontiers in microbiology* 2, 269.
- [121] Nolz, J. C. and Harty, J. T. 2011. Strategies and implications for prime-boost vaccination to generate memory CD8 T cells. *Advances in experimental medicine and biology* 780, 69–83.
- [122] O'Hagan, D. T., Ott, G. S., Gregorio, E. de, and Seubert, A. 2012. The mechanism of action of MF59 - an innately attractive adjuvant formulation. *Vaccine* 30, 29, 4341–4348.
- [123] Onuma O. F. 2011. *Erzeugung und Charakterisierung recombinant Hefe-Stämme, Etablierung der Hefe-Fermentation und Downstream Processing der Biomasse*. Postdoctoral Fellowship, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- [124] Osterhaus, A. D., Rimmelzwaan, G. F., Martina, B. E., Bestebroer, T. M., and Fouchier, R. A. 2000. Influenza B virus in seals. *Science (New York, N.Y.)* 288, 5468, 1051–1053.
- [125] Ott, G., Radhakrishnan, R., Fang, J.-H. and Hora, M., Eds. 2000. *The Adjuvant MF59: A 10-Year Perspective. Methods in Molecular Medicine, Vol. 42, 211-228*.
- [126] Palese, P. 2006. Making better influenza virus vaccines? *Emerging infectious diseases* 12, 1, 61–65.
- [127] Paul-Ehrlich-Institut. 2017. *Liste zugelassener Influenza-Impfstoffe*. <http://www.pei.de/DE/arzneimittel/impfstoff-impfstoffe-fuer-den-menschen/influenza-grippe/influenza-grippe-node.html>.
- [128] Paul-Ehrlich-Institut. 2017. *Saisonale Influenza 2017/2018. Langen: PEI. www.pei.de/influenza-impfstoffe*.
- [129] Pielak, R. M. and Chou, J. J. 2011. Influenza M2 proton channels. *Biochimica et biophysica acta* 1808, 2, 522–529.
- [130] Ping, J., Lopes, T. J. S., Nidom, C. A., Ghedin, E., Macken, C. A., Fitch, A., Imai, M., Maher, E. A., Neumann, G., and Kawaoka, Y. 2015. Development of high-yield influenza A virus vaccine viruses. *Nature communications* 6, 8148.
- [131] Pintard, L., Kressler, D., and Lapeyre, B. 2000. Spb1p is a yeast nucleolar protein associated with Nop1p and Nop58p that is able to bind S-adenosyl-L-methionine in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4, 1370–1381.
- [132] Plotkin S., O. W. and Offit P., Eds. 2012. *Vaccines. Section 1: General aspects of vaccination; Vaccine immunology (Siegrist C.-A.)*. Elsevier, Amsterdam.
- [133] Pronk, J. T. 2002. Auxotrophic Yeast Strains in Fundamental and Applied Research. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 5, 2095–2100.
- [134] Reed und Muench. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints.
- [135] Robb, N. C., Smith, M., Vreede, F. T., and Fodor, E. 2009. NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome. *The Journal of general virology* 90, Pt 6, 1398–1407.
- [136] Robert Koch-Institut. 2016. *RKI-Ratgeber für Ärzte: Saisonale Influenza (Teil 1): Erkrankungen durch saisonale Influenzaviren*. http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Influenza_saisonal.html?nn=2370434.
- [137] Rodicio, R. and Heinisch, J. J. 2013. Yeast on the milky way. Genetics, physiology and biotechnology of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast (Chichester, England)* 30, 5, 165–177.
- [138] Rodriguez, A., Pérez-González, A., Hossain, M. J., Chen, L.-M., Rolling, T., Pérez-Breña, P., Donis, R., Kochs, G., and Nieto, A. 2009. Attenuated strains of influenza A viruses do not induce degradation of RNA polymerase II. *Journal of virology* 83, 21, 11166–11174.

- [139] Rodríguez-Limas, W. A., Tyo, K. E. J., Nielsen, J., Ramírez, O. T., and Palomares, L. A. 2011. Molecular and process design for rotavirus-like particle production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial cell factories* 10, 33.
- [140] Rossignol, J. F., La Frazia, S., Chiappa, L., Ciucci, A., and Santoro, M. G. 2009. Thiazolidines, a new class of anti-influenza molecules targeting viral hemagglutinin at the post-translational level. *The Journal of biological chemistry* 284, 43, 29798–29808.
- [141] Rubio-Teixeira, M. 2005. A comparative analysis of the GAL genetic switch between not-so-distant cousins. *Saccharomyces cerevisiae* versus *Kluyveromyces lactis*. *FEMS yeast research* 5, 12, 1115–1128.
- [142] Sabarth, N., Howard, M. K., Savidis-Dacho, H., van Maurik, A., Barrett, P. N., and Kistner, O. 2010. Comparison of single, homologous prime-boost and heterologous prime-boost immunization strategies against H5N1 influenza virus in a mouse challenge model. *Vaccine* 28, 3, 650–656.
- [143] Satyanarayana, T. and Kunze G., Eds. 2009. *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. Springer, Berlin und Heidelberg.
- [144] Schrauwen, E. J. A. and Fouchier, R. A. M. 2014. Host adaptation and transmission of influenza A viruses in mammals. *Emerging microbes & infections* 3, 2, e9.
- [145] Sekikawa, K. and Lai, C. J. 1983. Defects in functional expression of an influenza virus hemagglutinin lacking the signal peptide sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, 12, 3563–3567.
- [146] Selbitz H.-J., Truyen U., and Valentin-Weigand P., Eds. 2011. *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. Enke Verlag, Stuttgart.
- [147] Selman, M., Dankar, S. K., Forbes, N. E., Jia, J.-J., and Brown, E. G. 2012. Adaptive mutation in influenza A virus non-structural gene is linked to host switching and induces a novel protein by alternative splicing. *Emerging microbes & infections* 1, 11, e42.
- [148] Shi, Y., Wu, Y., Zhang, W., Qi, J., and Gao, G. F. 2014. Enabling the 'host jump'. Structural determinants of receptor-binding specificity in influenza A viruses. *Nature reviews. Microbiology* 12, 12, 822–831.
- [149] Shin, D.-L., Hatesuer, B., Bergmann, S., Nedelko, T., and Schughart, K. 2015. Protection from Severe Influenza Virus Infections in Mice Carrying the Mx1 Influenza Virus Resistance Gene Strongly Depends on Genetic Background. *Journal of virology* 89, 19, 9998–10009.
- [150] Short, K. R., Richard, M., Verhagen, J. H., van Riel, D., Schrauwen, E. J. A., van den Brand, J. M. A., Mänz, B., Bodewes, R., and Herfst, S. 2015. One health, multiple challenges. The inter-species transmission of influenza A virus. *One health (Amsterdam, Netherlands)* 1, 1–13.
- [151] Sieczkarski, S. B. and Whittaker, G. R. 2005. Viral entry. *Current topics in microbiology and immunology* 285, 1–23.
- [152] Silva, U. C. de, Tanaka, H., Nakamura, S., Goto, N., and Yasunaga, T. 2012. A comprehensive analysis of reassortment in influenza A virus. *Biology open* 1, 4, 385–390.
- [153] Soema, P. C., Kompier, R., Amorij, J.-P., and Kersten, G. F. A. 2015. Current and next generation influenza vaccines. Formulation and production strategies. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 94, 251–263.
- [154] Spitaels, J., Roose, K., and Saelens, X. 2016. Influenza and Memory T Cells. How to Awake the Force. *Vaccines* 4, 4.
- [155] Spohner, S. C., Schaum, V., Quitmann, H., and Czermak, P. 2016. *Kluyveromyces lactis*. An emerging tool in biotechnology. *Journal of biotechnology* 222, 104–116.
- [156] Sriwilaijaroen N. and Suzuki Y. 2012. Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* 88, 6, 226–249.
- [157] Steel, J., Lowen, A. C., Wang, T. T., Yondola, M., Gao, Q., Haye, K., García-Sastre, A., and Palese, P. 2010. Influenza virus vaccine based on the conserved hemagglutinin stalk domain. *mBio* 1, 1.
- [158] Stubbs, A. C., Martin, K. S., Coeshott C., Skaates, S. V., Kuritzkes, D. R., Bellgrau, D., Franzusoff, A., and Duke, R. C. & Wilson, C. C. Stubbs -2001- Whole recombinant yeast

- vaccine activates dendritic cells and elicits protective cell-mediated immunity. *Nature Medicine* 2001.
- [159] Subathra, M., Santhakumar, P., Narasu, M. L., Beevi, S. S., and Lal, S. K. 2014. Evaluation of antibody response in mice against avian influenza A (H5N1) strain neuraminidase expressed in yeast *Pichia pastoris*. *J Biosci* 39, 3, 443–451.
- [160] Sui, J., Hwang, W. C., Perez, S., Wei, G., Aird, D., Chen, L.-M., Santelli, E., Stec, B., Cadwell, G., Ali, M., Wan, H., Murakami, A., Yammanuru, A., Han, T., Cox, N. J., Bankston, L. A., Donis, R. O., Liddington, R. C., and Marasco, W. A. 2009. Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses. *Nature structural & molecular biology* 16, 3, 265–273.
- [161] Sun, Y. and Liu, J. 2015. H9N2 influenza virus in China. A cause of concern. *Protein & cell* 6, 1, 18–25.
- [162] Sun, Y., Pu, J., Fan, L., Sun, H., Wang, J., Zhang, Y., Liu, L., and Liu, J. 2012. Evaluation of the protective efficacy of a commercial vaccine against different antigenic groups of H9N2 influenza viruses in chickens. *Veterinary microbiology* 156, 1-2, 193–199.
- [163] Swayne, D. E. 2009. Avian influenza vaccines and therapies for poultry. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 32, 4, 351–363.
- [164] Tate, M. D., Job, E. R., Deng, Y.-M., Gunalan, V., Maurer-Stroh, S., and Reading, P. C. 2014. Playing hide and seek. How glycosylation of the influenza virus hemagglutinin can modulate the immune response to infection. *Viruses* 6, 3, 1294–1316.
- [165] Taubenberger, J. K. and Kash, J. C. 2010. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. *Cell host & microbe* 7, 6, 440–451.
- [166] Tauber, S., Ligertwood, Y., Quigg-Nicol, M., Dutia, B. M., and Elliott, R. M. 2012. Behaviour of influenza A viruses differentially expressing segment 2 gene products in vitro and in vivo. *The Journal of general virology* 93, Pt 4, 840–849.
- [167] Te Velthuis, A. J. W. and Fodor, E. 2016. Influenza virus RNA polymerase. Insights into the mechanisms of viral RNA synthesis. *Nature reviews. Microbiology* 14, 8, 479–493.
- [168] Terajima, M., Cruz, J., Leporati, A. M., Orphin, L., Babon, J. A. B., Co, M. D. T., Pazoles, P., Jameson, J., and Ennis, F. A. 2008. Influenza A virus matrix protein 1-specific human CD8+ T-cell response induced in trivalent inactivated vaccine recipients. *Journal of virology* 82, 18, 9283–9287.
- [169] Thompson, C. M., Petiot, E., Lennaertz, A., Henry, O., and Kamen, A. A. 2013. Analytical technologies for influenza virus-like particle candidate vaccines. Challenges and emerging approaches. *Virology journal* 10, 141.
- [170] Tollervey, D., Lehtonen, H., Carmo-Fonseca, M., and Hurt, E. C. 1991. The small nucleolar RNP protein NOP1 (fibrillarin) is required for pre-rRNA processing in yeast. *The EMBO journal* 10, 3, 573–583.
- [171] Trötschel, C. and Poetsch, A. 2015. Current approaches and challenges in targeted absolute quantification of membrane proteins. *Proteomics* 15, 5-6, 915–929.
- [172] Truelove, S., Zhu, H., Lessler, J., Riley, S., Read, J. M., Wang, S., Kwok, K. O., Guan, Y., Jiang, C. Q., and Cummings, D. A. T. 2016. A comparison of hemagglutination inhibition and neutralization assays for characterizing immunity to seasonal influenza A. *Influenza and other respiratory viruses* 10, 6, 518–524.
- [173] Tsoni, S. V. and Brown, G. D. 2008. beta-Glucans and dectin-1. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1143, 45–60.
- [174] Urban, P. L. 2016. Quantitative mass spectrometry. An overview. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences* 374, 2079.
- [175] van de Sandt, C. E., Kreijtz, J. H. C. M., and Rimmelzwaan, G. F. 2012. Evasion of influenza A viruses from innate and adaptive immune responses. *Viruses* 4, 9, 1438–1476.
- [176] van Oers, M. M., Pijlman, G. P., and Vlak, J. M. 2015. Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression. From dark horse to mainstream technology. *The Journal of general virology* 96, Pt 1, 6–23.

- [177] van Ooyen, A. J. J., Dekker, P., Huang, M., Olsthoorn, M. M. A., Jacobs, D. I., Colussi, P. A., and Taron, C. H. 2006. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS yeast research* 6, 3, 381–392.
- [178] Vasin, A. V., Temkina, O. A., Egorov, V. V., Klotchenko, S. A., Plotnikova, M. A., and Kiselev, O. I. 2014. Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses. An overview of recently discovered proteins. *Virus research* 185, 53–63.
- [179] Vigerust, D. J. and Shepherd, V. L. 2007. Virus glycosylation. Role in virulence and immune interactions. *Trends in microbiology* 15, 5, 211–218.
- [180] Voet D., Voet J. G., Pratt C. W., Ed. 2002. *Lehrbuch der Biochemie*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- [181] Walsh, G. and Jefferis, R. 2006. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nature biotechnology* 24, 10, 1241–1252.
- [182] Wang, C. Y., Luo, Y. L., Chen, Y. T., Li, S. K., Lin, C. H., Hsieh, Y. C., and Liu, H. J. 2007. The cleavage of the hemagglutinin protein of H5N2 avian influenza virus in yeast. *Journal of virological methods* 146, 1-2, 293–297.
- [183] Wang, C.-C., Chen, J.-R., Tseng, Y.-C., Hsu, C.-H., Hung, Y.-F., Chen, S.-W., Chen, C.-M., Khoo, K.-H., Cheng, T.-J., Cheng, Y.-S. E., Jan, J.-T., Wu, C.-Y., Ma, C., and Wong, C.-H. 2009. Glycans on influenza hemagglutinin affect receptor binding and immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 43, 18137–18142.
- [184] Wang, M., Jiang, S., and Wang, Y. 2016. Recent advances in the production of recombinant subunit vaccines in *Pichia pastoris*. *Bioengineered* 7, 3, 155–165.
- [185] Wasilewski, S., Calder, L. J., Grant, T., and Rosenthal, P. B. 2012. Distribution of surface glycoproteins on influenza A virus determined by electron cryotomography. *Vaccine* 30, 51, 7368–7373.
- [186] Webby, R. J., Webster, R. G., and Richt, J. A. 2007. Influenza viruses in animal wildlife populations. *Current topics in microbiology and immunology* 315, 67–83.
- [187] Wei, C.-J., Boyington, J. C., Dai, K., Houser, K. V., Pearce, M. B., Kong, W.-P., Yang, Z.-J., Tumpey, T. M., and Nabel G. J. 2010. Cross-Neutralization of 1918 and 2009 Influenza Viruses: Role of Glycans in Viral Evolution and Vaccine Design. *Sci Transl Med March* 24; 2(24).
- [188] Wexler, D. 2012. *Minimum Ages and Minimum Intervals Between Doses of Vaccines in a Series – Why Does It Matter?* <http://www.immunize.org/technically-speaking/20120301.asp>.
- [189] Wildt, S. and Gerngross, T. U. 2005. The humanization of N-glycosylation pathways in yeast. *Nature reviews. Microbiology* 3, 2, 119–128.
- [190] Wood, J. M. and Robertson, J. S. 2004. From lethal virus to life-saving vaccine. Developing inactivated vaccines for pandemic influenza. *Nature reviews. Microbiology* 2, 10, 842–847.
- [191] World Health Organisation. 2012. *Stability of vaccines*. http://www.who.int/biologicals/vaccines/stability_of_vaccines_ref_mats/en/.
- [192] World Health Organisation. 2013. *Global Vaccine Safety Initiative: Technical support and trainings; E-learning course on Vaccine Safety Basics*. http://www.who.int/vaccine_safety/initiative/tech_support/Vaccine-safety-E-course-manual.pdf?ua=1.
- [193] World Health Organisation. 2016. *Avian and other zoonotic influenza. Fact sheet. Geneva: WHO*. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian_influenza/en/.
- [194] World Health Organisation. 2016. Influenza (seasonal). Fact sheet No. 211. Geneva: WHO.
- [195] World Health Organisation. 2017. Vaccine-specific standardization. Influenza. Geneva: WHO.
- [196] Wrammert, J., Smith, K., Miller, J., Langley, W. A., Kokko, K., Larsen, C., Zheng, N.-Y., Mays, I., Garman, L., Helms, C., James, J., Air, G. M., Capra, J. D., Ahmed, R., and Wilson, P. C. 2008. Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. *Nature* 453, 7195, 667–671.
- [197] Wu, W. W. H., Sun, Y.-H. B., and Panté, N. 2007. Nuclear import of influenza A viral ribonucleoprotein complexes is mediated by two nuclear localization sequences on viral nucleoprotein. *Virology journal* 4, 49.

- [198] Yamayoshi, S., Watanabe, M., Goto, H., and Kawaoka, Y. 2015. Identification of a Novel Viral Protein Expressed from the PB2 Segment of Influenza A Virus. *Journal of virology* 90, 1, 444–456.
- [199] Yu, H., Hua, R.-H., Wei, T.-C., Zhou, Y.-J., Tian, Z.-J., Li, G.-X., Liu, T.-Q., and Tong, G.-Z. 2008. Isolation and genetic characterization of avian origin H9N2 influenza viruses from pigs in China. *Veterinary microbiology* 131, 1-2, 82–92.
- [200] Zhang, W., Zheng, W., Toh, Y., Betancourt-Solis, M. A., Tu, J., Fan, Y., Vakharia, V. N., Liu, J., McNew, J. A., Jin, M., and Tao, Y. J. 2017. Crystal structure of an orthomyxovirus matrix protein reveals mechanisms for self-polymerization and membrane association. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114, 32, 8550–8555.
- [201] Zhou, J.-G., Zhang, H.-C., Wang, P., and Qi, Q.-S. 2007. Construction of the Man8 GlcNAc2 glycosylation *Saccharomyces cerevisiae* mutant strain. *Wei sheng wu xue bao = Acta microbiologica Sinica* 47, 5, 785–789.

7. ANHANG

7.1 Bestimmung der MLD₅₀ in BALB/c Mäusen

Die Resultate der Virustitration von Influenza A/PR/8/34 (H1N1) für die Bestimmung der MLD₅₀ in BALB/c Mäusen sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 13: Virustitration zur Bestimmung der MLD₅₀

Virusdosis (PFU/20 µL)	Virusverdünnung	lebend	tot	Total		% Mortalität
				lebend	tot	
10 ⁵	1,25x10 ⁻¹	0	4	0	15	100
10 ⁴	1,25x10 ⁻²	0	4	0	11	100
10 ³	1,25x10 ⁻³	0	4	0	7	100
10 ²	1,25x10 ⁻⁴	1	3	1	3	75
10 ¹	1,25x10 ⁻⁵	4	0	4	0	0

Die Berechnung der MLD₅₀ erfolgte nach der Methode von REED und MUENCH (1938) [134]. Es wurde eine MLD₅₀ von 47 PFU pro 20 µL für das Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1) in BALB/c Mäusen bestimmt.

7.2 Nukleotidsequenzen

7.2.1 H1_{PR8} (mH1_{PR8})

Die in der nachfolgenden Sequenz farbig markierten Nukleotide wurden für die Erstellung der modifizierten H1-Variante (mH1_{PR8}) entfernt.

Nukleotidsequenz (codon usage von *Saccharomyces cerevisiae* [5]):

ATGAAGGCCAACTTGTTAGTATTATTGTGTGCTTTAGCCGCTGCCGACGCCGATACCATTGTATTGGTTATCACGCCAACAACTCCACCGACTGTAGACACCGTTTTGGAAAAAATGTCACCGTCACCCATTCTGTAACCTATTGGAAGATTCTCATAACGGTAAATTGTAGATTGAAGGGTATTGCTCCATTACAATTGGGTAATGCAACATTGCTGGTTGGTTATTGGGTAACCCCTGAATGTGATCCATTATGCCTGTGAGATCCTGGTCCATATCGTCGAAACCCCAAATCCGAAAACGGTATTTGCTATCCTGGTGACTTCATCGACTATGAAGAATTGAGAGAACAATTGAGTTCGGTTCCCTCCTTCGAAAAGATTGAAAATTTCCCAAAGGAATCCTCTTGGCCAAACCATAACACCACTAAGGGTGTCACTGCTGCTTGTCCCATGCCGGTAAAAGTTCTTTCTATAGAACTTGTTGTGGTTGACCGAAAAGGAAGTTTCTATCCAAAATTGAAAACTCCTATGTCAACAAAAGGGTAAGGAAGTCTTGTTTGTGGGGTATCCATCATCCATCCAACCTAAGGATCAACAAAACATCTATCAAAAACGAAAACGCTTATGTCTCCGTTGTCACCTCCAATAATAGAAGATTACCCCTGAAATCGCCGAAAGACCAAAAAGTTAGAGATCAAGCCGGTAGAATGAACTATTATGGACCTTGTGAAACCTGGTGACACAATCATCTCGAAGCCAATGGTAACTTGATTGCCCAAGATATGCTTTTGCTTTGTCTAGAGTTTTCGTTCCGGTATCATTACTAGTAACGCCTCCATGCATGAATGTAACACCAAATGCCAAACCCCAATGGGTGCATCAACTCCTCATTGCCATTTCAAACATCCACCCTGTCACTATCGGTGAATGCCAAAATATGTCAGATCCGCCAAATTGAATGGTTACCGTTTGGAGAAACATCCCATCCATCCAATCCAGAGTTTTATTCGGTGCCATAGCCGGTTTTATCGAAGGTGGTTGGACTGGTATGATAGACGGTTGGTATGTTATCATCACAAAATGAACAAGTTCTGGTTATGCTGCCGACCAAAAATCCACTCAAATGCCATCAACGGTATCACCAACAAAGTCAACTCCGTTATCGAAAAATGAACATCCAATCACTGCCGTCGGT

AAAGAATTCAACAAATTGGAAAAGAGAATGGAAAACCTGAACAAAAAAGTTGACGACGGTTTCTTGGACATCTGGACCTATA
 ATGCCGAATTATTAGTCTTATTAGAAAACGAAAGAACATTGGACTTCCACGACTCCAACGTCAAAAACCTGTATGAAAAAGTC
 AAATCACAATTGAAAAACAACGCCAAGGAAATTGGTAACGGTTGCTTCGAATTCTATCACAAATGTGATAACGAATGCATGG
 AATCCGTTAGAAAACGGTACTTATGACTATCCAAAATATTCCGAAGAATCCAAATTGAATAGAGAAAAAGTTGACGGTGAAAA
 TTGGAATCCATGGGTATCTATCAAATCTTGCCATCTATTCCACTGTTGCCTCATCCTTGGTATTATTGGTATCATTGGGTGC
 CATTTCATTCTGGATGTGCTCCAACGGTTCATTACAATGTAGAATCTGCATCTGA₁₇₀₁

7.2.2 H1_{CAI}

Nukleotidsequenz (codon usage von *Saccharomyces cerevisiae* [5]):

₁ATGAAGGCCAACTTGTTAGTATTATTGTGTGCTTTAGCCGCTGCCGACGCCGACACTTTGTGTATCGGTTATCACGCCAAC
 AACTCTACCGACACCGTAGACACCGTCTTGGAAAAAACGTCACTGTCACCCATTCTGTAACTTATTGGAAGACAAGCATA
 ACGGTAAATTGTGTAATTGAGAGGTGTGCGCCCATTAACACTTGGGTAATGCAACATTGCTGGTTGGATCTTGGGTAACCC
 TGAATGTGAATCTTTATCCACTGCCTCATCTGGTCTATATCGTTGAAACTCCATCCTCCGACAATGGTACTTGCTATCCTG
 GTGACTTCATCGACTATGAAGAATTGAGAGAACAATTGTCTCCGTTTCTCCTTTGAAAGATTGCAAACTTCCCAAAGAA
 TCCTCTTGGCCAAATCATGACTCAAACAAGGGTGTACTGCTGCCTGTCCACATGCCGGTGCCAAATCCTTCTATAAAAACT
 TGATCTGGTTAGTCAAAAAGGGTAACTCCTATCCAAAATTGTCCAAATCCTATATCAATGACAAGGGTAAAGAACTTGGTT
 TTGTGGGGTATTATCACCACATCCACATCTGCCGACCAACAATCCTTGTATCAAAATGCCGACACATATGTCTTTGTGGTT
 CCTCAAGATATTCCAAAAAATTCAAACCTGAAATCGCCATTAGACCAAAAAGTCAGAGATCAAGAAGGTAGAATGAACTATTAT
 TGGACCTTGGTAGAACCTGGTGACAAAAACACCTTGAAGCCACTGGTAACTTGGTTGTCCCAAGATATGCTTTCCGCTATGG
 AAAGAAACGCTGGTTCGGTATCATCATCTCCGACACACCTGTTTCATGACTGTAATACCACCTGCCAAACCCCAAAAGGTG
 CTATCAACACATCCTTGCCTTTCCAAAACATCCACCAATCACTATCGGTAATGCCCAAAATATGTCAAATCCACCAAATTG
 AGATTAGCCACTGGTTTGAGAAACATCCCATCCATTCAATCCAGAGGTTTATTCCGGTGCCATTGCCGGTTTTATCGAAGGTG
 GTTGGACTGGTATGGTGCATGGTTGGTATGGTTATCATCACAAAACGAACAAGGTTCCGGTTATGCCGCCGATTGAAAT
 CCACTCAAACGCTATCGACGAAATCACAAACAAGTCAACTCCGTCATCGAAAAAATGAACACCCAATTCACCGCTGTTGG
 TAAGGAATCAACCACCTTGAAAAAGAGAATCGAAAACCTTGAACAAAAAAGTCGATGATGGTTTCTTGGACATCTGGACCTAT
 AATGCCGAATTATTAGTCTTATTAGAAAACGAAAGAACATTGGACTATCACGATTCCAACGTCAAAAACCTTGTATGAAAAAGT
 CAGATCCCAATTGAAAAACAACGCCAAGGAAATTGGTAACGGTTGCTTCGAATTCTATCACAAATGTGACAACACCTGTATG
 GAATCCGTCAAAAACGGTACTTATGACTATCCAAAATATTCCGAAGAAGCCAAATTGAATAGAGAAGAAATCGATGGTGTCA
 AATTGGAATCCACTAGAATCTATCAAATCTTAGCCATCTATTCCACCGTTGCCTTTCATTGGTATTGGTGCATCTCTGGGT
 GCCATCTCTTCTGGATGTGCTCCAACGGTCTTTACAATGTAGAATTTGCATCTGA₁₇₀₁

7.2.3 M1_{PR8}

Nukleotidsequenz (codon usage von *Kluyveromyces lactis*):

₁ATGTCATTATTAACCGAAGTTGAAACCTATGTTTTATCTATCATCCATCAGGTCCATTGAAGGCAGAAATCGCACAAAGATT
 AGAAGATGTTTTCGCTGGTAAAAATACTGATTTGGAAGTTTTGATGGAATGGTTGAAAACCTAGACCAATTTTGTCTCCATTGA
 CTAAGGGTATCTTGGGTTTCGTTTTACTTTGACTGTTCCATCTGAAAGAGGTTTGCAAAGAAGAAGATTGTTCAAACCGCT
 TTGAATGGTAACGGAGATCCAACAACATGGATAAGGCTGTTAAGTTGTACAGAAAATTGAAGAGAGAAATCACTTTCCATG
 GTGCTAAGGAAATCTTTTGTCTTATTCTGCTGGTGCTTTGGCTTCTTGTATGGGTTTGATCTATAACAGAATGGGTGCTGTT
 ACTACTGAAGTTGCTTTTGGTTTGGTTTGTGCTACTTGTGAACAAATTGCTGATTCTCAACATAGATCTCATAGACAAATGGT
 TACTACTACTAATCCATTGATCAGACATGAAAAAGAAATGGTTTTGGCTTCTACTACTGCTAAAGCTATGGAACAAATGGCTG
 GTTCTTCTGAACAAGCTGCTGAAGCTATGGAAGTTGCTTCTCAAGCTAGACAAATGGTTCAAGCTATGAGAATATCGGTAC
 TCATCCATCTTCTTCTGCTGGTTTGAAAAATGATTTGTTAGAAAACCTTACAAGCATACCAAAAAGAGAATGGGTGTCCAAATGC
 AAAGATTCAATAA₇₅₉

7.3 Vergleich der Primärstrukturen von H1_{PR8}, mH1_{PR8} und H1_{Ca1}

H1 _{PR8}	MKANLLVLLCALAAADA	DTICIGYHANN	STDTVDTVLEKN	VTVTHSVNLLLED	SHNGKLCR	60
mH1 _{PR8}	-----	MDTICIGYHANN	STDTVDTVLEKN	VTVTHSVNLLLED	SHNGKLCR	44
H1 _{Ca1}	MKANLLVLLCALAAADA	DTLCIGYHANN	STDTVDTVLEKN	VTVTHSVNLLLED	KHNGKLCR	60
H1 _{PR8}	LKGIAPLQLGKCN	IAGWLLGNPECD	PLLPVRSWSY	IIVETPNSENG	ICYPGDFIDYEELRE	120
mH1 _{PR8}	LKGIAPLQLGKCN	IAGWLLGNPECD	PLLPVRSWSY	IIVETPNSENG	ICYPGDFIDYEELRE	104
H1 _{Ca1}	LRGVAPLHLGKCN	IAGWILGNPECES	LSSTASSWSY	IIVETPSSD	NGTCYPGDFIDYEELRE	120
H1 _{PR8}	QLSSVS	SFERFEIFPKE	SSWPNH	TTKGVTAAC	SHAGKSSFYRNLLWLTEKEGSYPKLN	180
mH1 _{PR8}	QLSSVS	SFERFEIFPKE	SSWPNH	TTKGVTAAC	SHAGKSSFYRNLLWLTEKEGSYPKLN	164
H1 _{Ca1}	QLSSVS	SFERFEIFPKE	SSWPNH	SDSNKGVTAAC	PHAGAKSFYKNIWLVKKGN	180
H1 _{PR8}	SYVNKKGKEVLV	LWGIHHP	SNSKDQQNI	YQENAYVSVV	TSNYNRRFTPEIAERP	240
mH1 _{PR8}	SYVNKKGKEVLV	LWGIHHP	SNSKDQQNI	YQENAYVSVV	TSNYNRRFTPEIAERP	224
H1 _{Ca1}	SYINDKGKEVLV	LWGIHHP	STADQQS	LYQNADTYV	FGSSRYSKFKFPEIAIRPK	240
H1 _{PR8}	AGRMNYWTLLK	PGDTIIFEANG	NLIAPRYAFAL	SRFGSGIITS	NASMHECNTKCQTPL	300
mH1 _{PR8}	AGRMNYWTLLK	PGDTIIFEANG	NLIAPRYAFAL	SRFGSGIITS	NASMHECNTKCQTPL	284
H1 _{Ca1}	EGRMNYWTLVE	PGDKITFEAT	GNLVVPRYAF	FAMERNAGSGI	IISDTPVHDCNTTCQTPK	300
HA1 ↓ ■						
H1 _{PR8}	GAIN	SSLPFQNIHP	VITIGECKPKY	VRSAKLRMTGLRN	IPSIQSRGLFGAIAG	360
mH1 _{PR8}	GAIN	SSLPFQNIHP	VITIGECKPKY	VRSAKLRMTGLRN	IPSIQSRGLFGAIAG	344
H1 _{Ca1}	GAIN	TSLPFQNIHP	ITIGECKPKY	VKSTKLRLATGLRN	IPSIQSRGLFGAIAG	360
↑ HA2						
H1 _{PR8}	MIDGWYGYHHQ	NEQGSYAADQ	KSTQNAINGIT	TKVNSVIEKMNI	QFTAVGKEFNKLEKR	420
mH1 _{PR8}	MIDGWYGYHHQ	NEQGSYAADQ	KSTQNAINGIT	TKVNSVIEKMNI	QFTAVGKEFNKLEKR	404
H1 _{Ca1}	MVDGWYGYHHQ	NEQGSYAADL	KSTQNAIDEIT	TKVNSVIEKMNT	QFTAVGKEFNHLEKR	420
H1 _{PR8}	MENLNKKVDDG	FLDIWTYNAEL	LVLLLENERTL	DFHDSNVKNLYE	KVKSQKNNAKEIGNG	480
mH1 _{PR8}	MENLNKKVDDG	FLDIWTYNAEL	LVLLLENERTL	DFHDSNVKNLYE	KVKSQKNNAKEIGNG	464
H1 _{Ca1}	IENLNKKVDDG	FLDIWTYNAEL	LVLLLENERTL	DYHDSNVKNLYE	KVRSQKNNAKEIGNG	480
H1 _{PR8}	CFEFYHKCDNE	CMESVR	NGTYDYPKY	SEESKLNREKVD	GKLESMGIYQILAIYSTVASS	540
mH1 _{PR8}	CFEFYHKCDNE	CMESVR	NGTYDYPKY	SEESKLNREKVD	GKLESMGIYQILAIYSTVASS	524
H1 _{Ca1}	CFEFYHKCDNT	CMESVK	NGTYDYPKY	SEEAKLNREEI	DGVKLESTRIYQILAIYSTVASS	540
H1 _{PR8}	LVLVSLGAI	SFWMCSNGSL	QCRICI			566
mH1 _{PR8}	LVLVSLGAI	SFWMCSNGSL	QCRICI			550
H1 _{Ca1}	LVLVSLGAI	SFWMCSNGSL	QCRICI			566

Signalpeptid; putative N-Glykosylierungspositionen; α-HA1 Antikörper-Bindestelle; Transmembrandomäne; zytoplasmatische Region; Fusionspeptid; Antigene Bereiche

Abbildung 37: Alignment der Aminosäuresequenzen von H1 und dem modifizierten (mH1) aus A/PR/8/34 (H1N1) sowie dem modifizierten H1 aus A/CA/04/09 (H1N1). Verändert nach [5]. Das Alignment wurde mit Clone Manager 9 erstellt. Putative N-Glykosylierungspositionen (Asn-X-Ser/Thr) (grün) wurden mit der Software NetNGlyc 1.0, *Technical University of Denmark* ermittelt. Markiert sind bekannte Regionen des H1, die Antikörper-Bindestelle für den Nachweis von H1 im Western-Blot sowie die antigenen Bereiche. Der Übergang von der HA1- zur HA2-Domäne ist durch zwei senkrechte Pfeile angegeben. Die monobasische Spaltstelle wird durch einen schwarzen Balken markiert.

PUBLIKATIONSLISTE

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

Gebauer M., Behrens M., König M., Behrens S.-E. (2014). A bi-cistronic, reporter-encoding bovine viral diarrhoea virus applied in a new, effective diagnostic test. *J Gen Virol.* 95: 1522-1531.

Gebauer M., Hürlimann H.C., Behrens M., Wolff T., Grund C., Beer M., Breunig K.D., Behrens S.-E. Full protection against influenza A virus in a one shot scheme with a novel type of subunit vaccines based on recombinant yeast. Manuskript in Vorbereitung

Tagungsbeiträge-Vorträge

Baroth M., Gebauer M., Kreuzmann D., Kickler K., Behrens S.-E. (2012). A novel assay to detect and evaluate bovine viral diarrhoea virus infections. 2. Infektionsmedizinisches Symposium Mitteldeutschland - Nachwuchs forscht, 10.09.2012, Leipzig, Deutschland.

Tagungsbeiträge-Poster

Gebauer M., Behrens M., König M., Behrens S.-E. (2014). A bi-cistronic, reporter-encoding bovine viral diarrhoea virus applied in a new, effective diagnostic test. 24th Annual Meeting of the Society for Virology, 26.-29.03.2014, Alpbach, Österreich.

Patent

Hürlimann H.C., Behrens M., Gebauer M., Breunig K.D., Behrens S.-E.; Optimiertes Wirts- / Vektorsystem zur Erzeugung protektiver mono- und multivalenter *subunit*-Vakzine auf Basis der Hefe *Kluyveromyces lactis*. Patentanmeldung am 27.12.2017

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Sven-Erik Behrens für die Möglichkeit meine Dissertation im Rahmen des BMBF GO-Bio geförderten Projektes „VEROVACCiNES“ anzufertigen. Anregende Diskussionen und Vorschläge sowie sein stetes Interesse und Vertrauen haben maßgeblich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen.

Ein besonderer Dank gilt ebenfalls Frau Prof. Dr. Karin D. Breunig für die Möglichkeit der engen Zusammenarbeit mit der AG Molekulargenetik sowie die anregenden Diskussionen, insbesondere im Bereich der Hefegenetik.

Herrn Prof. Dr. R. Gary Sawers und Herrn Prof. Dr. Uwe Truyen danke ich für die freundliche Übernahme des Zweit- und Drittgutachtens.

Sehr herzlich danke ich allen Teammitgliedern von VEROVACCiNES. Unsere Zusammenarbeit war stets von einem respektvollen Umgang sowie gegenseitiger Unterstützung und Rücksichtnahme geprägt.

Besonders danken möchte ich Frau Dr. Martina Behrens, Frau Dipl.-Biol. Katja Rostowski und Mandy Koller für zahlreiche Immunisierungen und Probenentnahmen am Versuchstier und ihre tatkräftige Unterstützung während der Belastungsinfektionen sowie bei der Analyse der Proben.

Ebenfalls möchte ich Dr. Hans C. Hürlimann von Herzen für seine stete Hilfsbereitschaft und die kritischen Diskussionen sowie unsere tiefgründigen Gespräche in den Pausen danken. Deine genetischen Vorarbeiten haben die Entwicklung multivalenter Hefestämme erst ermöglicht.

Dr. Hanjo Hennemann danke ich für sein Engagement und seine Hilfsbereitschaft bezüglich Fragestellungen zur Industrie.

Dipl.-Pharm. Johannes J. Stelzner danke ich für die Erstellung des für die Immunisierung verwendeten Hefelysats und der Hilfe bezüglich pharmazeutischer Fragestellungen.

Bei Herrn PD Dr. habil. Ralph P. Golbik bedanke ich mich sehr herzlich für jegliche Unterstützung, insbesondere bei Fragestellungen zur Proteinbiochemie und Statistik sowie das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ebenfalls sehr herzlich bedanke ich mich bei Frau Christine Hamann für ihre Ratschläge bezüglich Fragestellungen zur Zellkultur und unsere wunderbaren Gespräche.

Bedanken möchte ich mich zudem bei Dr. Gerd Hause für die Einblicke in die Elektronenmikroskopie und die zahlreichen Aufnahmen von Hefezellen.

Ein großes Dankeschön gilt allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Mikrobielle Biotechnologie sowie Molekulargenetik für ein sehr angenehmes Arbeitsklima und die gemeinsamen Ausflüge. Vielen Dank für diese schönen Erinnerungen!

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden. Insbesondere meinen Eltern danke ich von Herzen für ihre uneingeschränkte Unterstützung, ihr Verständnis und ihre Geduld. Ohne euch würde ich heute nicht hier stehen! Liebe Kerstin, dir danke ich für nun fast 30 Jahre treue Freundschaft. Es ist ein großes Glück eine Freundin wie dich zu haben. Lieber Maik, dir danke ich besonders dafür, dass du mich auffängst und mich zum Lachen bringst, einen Bruder wie dich sollte jeder haben!

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Gebauer
Vorname: Mandy
Akademischer Grad: Dipl.-Biol.
Geburtsort: Leipzig
Geburtsdatum: 21.02.1986
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

- seit 01/2013 Promotion an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg am Institut für Biochemie und Biotechnologie in der AG „Mikrobielle Biotechnologie“ im BMBF GO-Bio geförderten Projekt „VEROVACCiNES“ (Betreuer: Prof. Dr. Sven-Erik Behrens)
- 10/2012 - 12/2012 Wissenschaftliche Hilfskraft an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der AG „Mikrobielle Biotechnologie“ (Prof. Dr. Sven-Erik Behrens)
- 10/2005 - 09/2012 Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Diplomarbeit angefertigt am Institut für Biochemie und Biotechnologie in der AG „Mikrobielle Biotechnologie“ (Betreuer: Prof. Dr. Sven-Erik Behrens), Thema: „*Weiterentwicklung und Optimierung eines neuen diagnostischen Tests für die Bovine Virusdiarrhoe*“, Diplom
- bis 09/2005 Gustav-Hertz-Gymnasium in Leipzig, allgemeine Hochschulreife

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Weiterhin versichere ich, dass die Dissertation ausschließlich der Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt wurde und ich mich erstmals für die Erlangung des Doktorgrades bewerbe.

Ort, Datum

Mandy Gebauer