

**Entwicklung von *Kluyveromyces lactis*-basierten Vakzinen gegen
Infektiöse Bursitis und Influenza**

Dissertation

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Marina Arnold-Klingbeil

geb. am 2. November 1983 in Salzwedel

1. Gutachter: Prof. Dr. Sven-Erik Behrens

2. Gutachter: Prof. Dr. Karin Breunig

3. Gutachter: PD Dr. Thorsten Wolff

Tag der Verteidigung: 13.03.2014

Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungen.....	VII
1. Einführung.....	1
1.1. Infektiöse Bursitis.....	1
1.1.1. IBD-Virus.....	2
1.1.2. VP2.....	4
1.2. Influenza.....	5
1.2.1. Das Influenza-Virus	6
1.2.2. Hämagglutinin	8
1.3. Immunisierung.....	9
1.3.1. Immunsystem und orale Toleranz	9
1.3.2. Immunisierungsformen.....	10
1.3.3. Impfstoffsituation bei der Infektiösen Bursitis	12
1.3.4. Impfstoffsituation bei Influenza	13
1.4. Expressionssysteme	14
1.4.1. <i>Kluyveromyces lactis</i>	15
1.4.2. Expressionskassette	16
1.4.3. Hefe als Vakzin	18
1.5. Zielstellung der Arbeit.....	19
2. Material und Methoden	20
2.1. Material.....	20
2.1.1. Geräte.....	20
2.1.2. Chemikalien.....	20
2.1.3. <i>Kluyveromyces lactis</i> -Stämme	21
2.1.4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme	22
2.1.5. <i>Escherichia coli</i> -Stämme	22
2.1.6. Zelllinien	22
2.1.7. Oligonukleotide.....	22
2.1.8. Plasmide	23
2.1.9. Antikörper	23
2.1.10. Kulturbedingungen und Medien für die Anzucht von Hefen und <i>E. coli</i>	24
2.1.11. Zellkultur von DF1 und MDCK II.....	24
2.1.12. Puffer	25
2.2. Molekularbiologische Methoden	26
2.2.1. Molekularbiologische Standardmethoden (Klonierungen)	26
2.2.2. Sequenzierung.....	27
2.2.3. Transformation von <i>K. lactis</i>	27
2.2.4. Generierung von <i>K. lactis</i> -Stämmen	27
2.2.5. Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	28
2.2.6. Wachstumstest (Tropfentest).....	28
2.2.7. Isolation von chromosomaler DNA aus <i>K. lactis</i>	28
2.2.8. Isolation von Gesamt-RNA und RT-PCR.....	29
2.2.9. <i>Real time</i> PCR zur Bestimmung der <i>KIGAL4</i> -Kopienzahl	29

2.3.	Proteinbiologische Methoden	31
2.3.1.	Proteinextrakte aus Hefezellen für Western Analysen	31
2.3.2.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
2.3.3.	Western Analyse	31
2.3.4.	Nachweis von HA über <i>Blue Native</i> -Gelelektrophorese (BN)	32
2.3.5.	Immunfluoreszenz	33
2.3.6.	Aufreinigung von IBDV-VP2 aus Hefezellen	33
2.3.7.	Elektronenmikroskopie	34
2.3.8.	Expression von PR8-HA in <i>E. coli</i>	34
2.3.9.	Isolierung von ER-Membranen	35
2.3.10.	Deglykosylierung von Hämagglutinin	35
2.3.11.	Trypsinspaltung von Hämagglutinin	36
2.4.	Hefeproduktion für Immunisierungsversuche	36
2.5.	Immunisierungsversuche und serologische Untersuchungen	38
2.5.1.	Immunisierungsversuche mit Mäusen	38
2.5.2.	Immunisierungsversuche mit Hühnern	39
2.5.3.	IBDV-ELISA	40
2.5.4.	Virusneutralisationsassay für IBDV (Serumneutralisationsassay)	40
2.5.5.	Influenza-HA-ELISA	41
2.5.6.	Virusneutralisationsassay für Influenzaviren (Plaque-Reduktionstest)	42
2.5.7.	Bestimmung der EID ₅₀ für IBDV	43
3.	Ergebnisse	44
3.1.	Virus der Infektiösen Bursitis	44
3.1.1.	Generierung eines VP2-exprimierenden <i>Kluyveromyces lactis</i> -Hefestammes	44
3.1.2.	Optimierung der VP2-Expression	46
3.1.2.1.	Austausch der zweiten Aminosäure von VP2 nach der <i>N-end rule</i>	46
3.1.2.2.	<i>Knock out</i> des KGal4-Inhibitors <i>KGAL80</i> und Überexpression des Transkriptionsaktivators KGal4	47
3.1.2.3.	Sequenzoptimierung des VP2 _{T25} -Gens	50
3.1.3.	Charakterisierung der VP2-Expression	52
3.1.3.1.	Lokalisierung von VP2 in der Hefezelle	52
3.1.3.2.	Untersuchungen zur VP2-Kapsidassemblierung in den rekombinanten <i>K. lactis</i> -Stämmen	54
3.1.3.3.	Abschätzung der VP2 _{T25} -Proteinmenge in der Zelle	57
3.1.3.4.	Proteinstabilität nach Hitze-Inaktivierung der Hefen	58
3.1.4.	Vakzinierung mit rekombinanter Hefe gegen IBD	60
3.1.4.1.	Orale und subkutane Immunisierung mit VP2-exprimierenden Hefen (Mäuse)	60
3.1.4.2.	Subkutane Immunisierung mit verschiedenen VP2 _{T25} -Hefen (<i>S. cerevisiae</i> und <i>K. lactis</i>) ..	63
3.1.4.3.	Orale und subkutane Vakzinierung von Hühnern gegen IBD	64
3.2.	Influenza Hämagglutinin	69
3.2.1.	Orale und subkutane Immunisierung von Hühnern mit H7-HA-Hefen	70
3.2.2.	Generierung und Optimierung von H1-Hämagglutinin-exprimierenden <i>K. lactis</i> -Stämmen ..	72
3.2.2.1.	Expression von PR8-HA in <i>K. lactis</i> -Hefen	73
3.2.2.2.	Optimierung der CA-HA-Expression	78
3.2.3.	Charakterisierung der Hämagglutinin-Expression	80
3.2.3.1.	Glykosylierung von Hämagglutinin	80
3.2.3.2.	Lokalisierung/Kompartimentierung von HA in der Hefezelle	82
3.2.3.3.	Trimerisierung von HA	84
3.2.3.4.	Spaltbarkeit von Hämagglutinin in HA ₁ und HA ₂ durch Trypsin	85

3.2.3.5.	Abschätzung der PR8-HA-Proteinmenge pro Hefezelle.....	86
3.2.4.	Orale und subkutane Immunisierung von Mäusen mit PR8-HA-Hefen.....	87
4.	Diskussion.....	90
4.1.	<i>Expression von IBDV-VP2 und Influenza-Hämagglutinin in K. lactis</i>	90
4.2.	<i>Charakterisierung der Antigene</i>	95
4.3.	<i>Vakzinierung</i>	101
5.	Zusammenfassung	107
6.	Referenzen	109
7.	Anhang	i
7.1.	<i>Nukleotidsequenzen</i>	i
7.2.	<i>Sequenzoptimierungen</i>	ii
7.3.	<i>Sequenzvergleich CA-HA und PR8-HA</i>	v
7.4.	<i>Zugelassene Impfstoffe gegen IBD</i>	vi

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung von IBDV und Genomsegment A.....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Influenza A-Virus	7
Abbildung 3: Schema zur Generierung rekombinanter <i>K. lactis</i> -Stämme nach Krjiger et al., 2012	17
Abbildung 4: Plasmidkarte von VP2_Klp3-MCS.....	44
Abbildung 5: Nachweis des VP2-Proteins im WB und Wachstumstest von VAK887 (VP2)	45
Abbildung 6: Charakterisierung des Stammes VAK888 (VP2 _{T2S})	46
Abbildung 7: Wachstumstest von VAK889 (VP2 _{T2S} ;gal80Δ) auf X-Gal-Platten.....	48
Abbildung 8: Ergebnisse der qPCR an genomischer DNA zur Bestimmung der KIGAL4-Genloci-Anzahl	49
Abbildung 9: Vergleich der VP2 _{T2S} -Proteinexpression von VAK889 (VP2 _{T2S} ;Δgal80) und VAK890 (VP2 _{T2S} ;GAL4)..	50
Abbildung 10: Charakterisierung der Sequenz-optimierten Stämme VAK910 und VAK911.....	52
Abbildung 11: Immunfluoreszenz der Stämme VAK367 und VAK894 (VP2 _{T2S} -HA-Tag).....	53
Abbildung 12: Versuch zur Aufreinigung von VP2 _{T2S} -SVPs	55
Abbildung 13: EM-Aufnahmen von VP2 _{T2S} nach SVP-Aufreinigung	56
Abbildung 14: Quantifizierung der VP2 _{T2S} -Menge in VAK890 (VP2 _{T2S} ;GAL4)	58
Abbildung 15: WB mit inaktivierten Zellen und Hefe-Futterpellets.....	60
Abbildung 16: Schematische Übersicht der Immunisierungsversuche mit Mäusen und VP2 _{T2S} -Hefe	61
Abbildung 17: ELISA und Serumneutralisationsassay nach der Immunisierung von Mäusen mit VP2 _{T2S}	62
Abbildung 18: Übersicht des Immunisierungsversuchs mit Mäusen und verschiedenen VP2 _{T2S} -Hefen	64
Abbildung 19: ELISA-Daten nach subkutaner Immunisierung von Mäusen mit verschiedenen VP2 _{T2S} -Hefen	64
Abbildung 20: Schematische Übersicht der Immunisierungsversuche mit Hühnern und VP2 _{T2S} -Hefen	65
Abbildung 21: ELISA und Serumneutralisationsassay nach der Immunisierung von Hühnern mit VP2 _{T2S}	66
Abbildung 22: ELISA und Serumneutralisationsassay nach subkutaner Immunisierung von Hühnern mit VP2 _{T2S}	67
Abbildung 23: Charakterisierung der H7-HA-Stämme	69
Abbildung 24: Immunisierungsschema der Hühnerexperimente mit H7-Hefe.....	71
Abbildung 25: ELISA-Ergebnisse mit Seren nach der Immunisierung von Hühnern mit H7-HA-Hefen	71
Abbildung 26: Virusneutralisationsassay mit H7N3 nach der Immunisierung von Hühnern mit H7-HA-Hefen	72
Abbildung 27: Charakterisierung der PR8-HA-Stämme.....	74
Abbildung 28: Einfluss der PR8-HA-Expression auf das Wachstum.....	75
Abbildung 29: Untersuchung der UPR in PR8-HA-Expressionsstämmen.....	77
Abbildung 30: Expression von CA _{T137E} -HA nach Austausch des Signalpeptids.....	79
Abbildung 31: Untersuchungen zur Glykosylierung von PR8-HA und CA-HA	80
Abbildung 32: Einfluss von Temperatur und Prozessdauer auf die Glykosylierung.....	81
Abbildung 33: Immunfluoreszenz der Stämme VAK367 und VAK952 (PR8-HA).....	82
Abbildung 34: Isolation von ER-Membranen des Stammes VAK952 (PR8-HA) zur Lokalisation von PR8-HA	83
Abbildung 35: Untersuchung von PR8-HA-Trimeren mittels Blue Native-PAGE.....	84
Abbildung 36: Trypsinspaltung von PR8-HA und PR8-CA _{T137E} -HA.....	86
Abbildung 37: Quantifizierung der PR8-HA-Menge im Stamm VAK952 (PR8-HA)	87
Abbildung 38: Übersicht des Immunisierungsversuchs mit Mäusen und PR8-HA-Hefen	88
Abbildung 39: Virusneutralisationsassay nach der Immunisierung von Mäusen mit PR8-HA-Hefen.....	89
Abbildung 40: Sequenzoptimierung von VP2 _{T2S}	ii
Abbildung 41: Sequenzoptimierung von PR8-HA	iii
Abbildung 42: Sequenzoptimierung von CA-HA	iv

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Geräte und deren Hersteller.....</i>	<i>20</i>
<i>Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Chemikalien und deren Hersteller</i>	<i>20</i>
<i>Tabelle 3: Übersicht aller K. lactis-Stämme.....</i>	<i>21</i>
<i>Tabelle 4: Übersicht des verwendeten S. cerevisiae-Stammes und dessen Genotyp</i>	<i>22</i>
<i>Tabelle 5: Übersicht der E. coli-Stämme und deren Genotyp.....</i>	<i>22</i>
<i>Tabelle 6: Übersicht der Zelllinien und das verwendetet Kulturmedium.....</i>	<i>22</i>
<i>Tabelle 7: Übersicht der Oligonukleotide</i>	<i>22</i>
<i>Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Vektoren und Plasmide.....</i>	<i>23</i>
<i>Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Antikörper und Seren.....</i>	<i>23</i>
<i>Tabelle 10: Übersicht der Puffer und Medien zur Kultivierung von MDCK- und DF1-Zellen.....</i>	<i>25</i>
<i>Tabelle 11: Übersicht der verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung.....</i>	<i>25</i>
<i>Tabelle 12: Reaktionsprogramm der qPCR an genomischer DNA.....</i>	<i>30</i>
<i>Tabelle 13: Übersicht der Reaktionsansätze bei der Deglykosylierung von Hämagglutinin mit PNGase F.....</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 14: Auflistung über die Medienzusammensetzung beim fed-batch Fermentationsprozess</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 15: Zusammensetzung der Spurenelementlösung für die Medien</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 16: Parameter der fed-batch Verfahren</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 17: Ergebnisse des Challenge-Versuchs mit dem IBDV-Stamm Edgar nach Immunisierung von Hühnern</i>	<i>67</i>
<i>Tabelle 18: Übersicht der zugelassenen Impfstoffe gegen Infektiöse Bursitis</i>	<i>vi</i>

Abkürzungen

AK	Antikörper	LDAO	Lauryldimethylamin-N-oxid
APS	Ammoniumperoxodisulfat	MALT	Mukosa-assoziierten Lymphgewebe
APZ	Antigen-präsentierende Zellen	MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
AS	Aminosäure	OD	Optische Dichte
BSA	Bovines Serumalbumin	ORF	<i>open reading frames</i>
CA	A/California/04/2009(H1N1)	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
CAI	Codon-Adaptions-Index	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
CHS	Cholesterylhemisuccinat	PFU	<i>Plaque forming unit</i>
CPE	Cytopathischer Effekt	PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
DDM	Dodecyl- β -D-Maltopyranosid	PR8	A/Puerto Rico/8/34(Cambridge) (H1N1)
DIVA	<i>differentiate infected from vaccinated animals</i>	vRNP	virale Ribonukleoproteinkomplexe
DTT	Dithiothreitol	RT	Raumtemperatur
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	SDS	Natriumdodecylsulfat
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>	SPF	Spezifisch Pathogen-frei
HA	Hämagglutinin	TEMED	Tetramethylethylendiamin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	UPR	<i>unfolded protein response</i>
HRP	Meerrettichperoxidase	WB	Western Blot
IBDV	<i>infectious bursal disease virus</i>	WHO	<i>world health organization</i>
IF	Immunfluoreszenz	LDAO	Lauryldimethylamin-N-oxid

1. Einführung

Die bekannteste und meist gefürchtete Geflügelkrankheit weltweit ist die Vogelgrippe. Dabei handelt es sich um eine anzeigepflichtige Tierseuche, deren Ausbrüche immer wieder für Schlagzeilen sorgen. Bei der H5N1-Grippewelle 2005 starben in Asien, Afrika und Europa geschätzte 260 Millionen Vögel an den Folgen der Infektion bzw. wurden vorsorglich gekeult. Die wirtschaftlichen Schäden werden von der *UN's Food and Agriculture Organization* auf 20 Milliarden US-Dollar geschätzt. Die schnelle Verbreitung der Krankheitserreger wurde vor allem durch den globalen Handel mit Geflügel ermöglicht, aber auch freilebende Wild- und Zugvögel können eine Infektion übertragen. Um dies zu vermeiden, mussten alle Geflügelbestände in Deutschland von Oktober 2005 bis Mitte 2006 in überdachten Stallungen untergebracht werden. Die Infektion eines Tierbestandes führt in der Regel zur Keulung aller Tiere des Halters und zur Einrichtung von Schutzzonen, damit der Erreger sich nicht weiter ausbreiten kann. Neben großen ökologischen Schäden wird immer wieder befürchtet, dass sich der Erreger der Vogelgrippe an den Mensch anpasst und dies zu einer weltweiten Pandemie mit hohen Mortalitätsraten führt. Diese Gefahr besteht insbesondere dort, wo Menschen mit ihrem Geflügel dicht zusammen leben, wie es oft in Südostasien der Fall ist. Es ist vor diesem Hintergrund nicht verwunderlich, dass hier immer wieder Fälle bekannt werden, bei denen sich Menschen mit dem Erreger infiziert haben.

Eine Geflügelkrankheit die weniger bekannt ist, aber dennoch weltweit von großer wirtschaftlicher Bedeutung ist, ist die Infektiöse Bursitis (engl. *infectious bursal disease*; IBD). Im Gegensatz zur Vogelgrippe sind nur Hühner betroffen. Bis Ende der 1980er Jahre verursachten vor allem weniger aggressive Erreger wirtschaftliche Schäden durch eine geringere Mastleistung und IBD-bedingte Sekundärinfektionen mit anderen Pathogenen. Allerdings wurden seit 1987 Infektionen mit hoch virulente IBD-Erreger beobachtet, die zu hohen Mortalitätsraten führen.

Beide Krankheiten werden durch Viren übertragen. Der effektivste Schutz des Tierbestandes wäre eine Impfung. Diese müsste für die Geflügelproduktion kostengünstig, sicher und massenanwendbar sein. Außerdem wäre eine Unterscheidung zwischen infizierten und geimpften Tieren von Vorteil, um eine unnötige Keulung wie bei der Vogelgrippe zu verhindern.

1.1. Infektiöse Bursitis

Die Infektiöse Bursitis ist eine Erkrankung, die vor allem bei jungen Hühnern ein Problem darstellt. Ursache für die Erkrankung, die mit einer Morbiditätsrate von bis zu 100 % einhergehen kann, ist das hochkontagiöse Virus der Infektiösen Bursitis (engl. *infectious bursal disease virus*, IBDV). Aufgrund einer sehr hohen Resistenz gegenüber Umweltbedingungen, kann das Virus bis zu 122 Tage infektiös bleiben. Eine Beseitigung aus infizierten Geflügelbeständen wird zusätzlich durch eine hohe Stabilität gegenüber Hitze, niedrige und hohe pH-Werte sowie Chemikalien (Phenol, Ether und Chloroform)

erschwert. Die Stabilität ermöglicht außerdem eine indirekte Übertragung über Futter, Trinkwasser, Staub und Einstreu sowie durch das Personal [1];[2].

Tiere im Alter von drei bis sechs Wochen sind nach einer Infektion am häufigsten von klinischen Symptomen, wie weißlicher, wässriger Faeces, gestäubtes Gefieder, Erschöpfung und einer verminderten Gewichtszunahme betroffen [3]. Eine Ansteckung in den ersten Lebenswochen führt zwar meist zu einem subklinischen Verlauf, jedoch hat diese häufig eine persistente Immunsuppression aufgrund einer Zerstörung der B-Lymphozyten zur Folge. Die Immunsuppression, die ebenfalls nach einer überstandenen, akuten Infektion auftritt, begünstigt nicht nur eine Infektion mit anderen Pathogenen, wie den Viren der Newcastle-Krankheit, Infektiösen Bronchitis oder Herpesviren [4], sondern reduziert auch die Effizienz von Vakzinierungen gegen diese und weitere Erkrankungen [5];[6]. Ab der 15. Lebenswoche werden nur selten Krankheitssymptome beobachtet.

Die Infektion mit IBD-Viren verläuft zyklisch und erfolgt unter normalen Umweltbedingungen über eine orale Aufnahme. Ein erster Nachweis von infizierten Makrophagen und Lymphozyten ist ca. vier Stunden nach der Infektion zunächst im Caecum, etwas später auch im Duodenum und Jejunum möglich (primär affine Organe). Über das Pfortadergefäßsystem gelangen Virus-infizierte Zellen über die Leber unter anderem in das lymphatische Organ *Bursa fabricii*. Hier kommt es zu einer massiven Virusvermehrung, die vom Alter des Tieres und insbesondere von der Entwicklung des Organes abhängig ist [7]. In den ersten Lebenswochen unterliegt die *Bursa Fabricii* einer sehr schnellen Proliferation und hat einen hohen Anteil von sich entwickelnden IgM-präsentierenden B-Lymphozyten, die am häufigsten von einer Infektion betroffen sind. Die Zellen werden bei der Virusreplikation lysiert, was zur Schädigung der Bursafollikel führt [8]. Im Anschluss kommt es zu einer sekundären Virämie und einer Infektion von Lymphozyten in Thymus, Milz, Zäkaltonsillen und Knochenmark, die ebenfalls eine dauerhafte Schädigung dieser Organe zur Folge hat [7].

Ein Schutz gegen eine IBDV-Infektion erfolgt hauptsächlich über die humorale Immunantwort mittels Virus-neutralisierenden Antikörpern gegen das Oberflächenprotein [9];[10]. Die Immunität kann durch eine Infektion oder Vakzinierung erworben werden und wird von Hennen auf Küken übertragen (maternale Antikörper). Da ökonomische Schäden hauptsächlich durch eine Infektion junger Hühner verursacht werden, ist eine Impfung von Muttertieren sinnvoll und bietet zumindest einen Schutz in den ersten drei bis vier Lebenswochen [11].

1.1.1. IBD-Virus

Das Virus der Infektiösen Bursitis (IBDV) gehört der Familie der *Birnaviridae* an, zu der auch das Virus der Infektiösen Pankreasnekrose zählt, das hauptsächlich Lachse und Forellen infiziert [12]. Bei IBDV werden zwei Serotypen unterschieden: Typ I, der vorwiegend bei Hühnern auftritt und hier Pathogenität verursacht, und Serotyp II, der neben Hühnern auch Puten infiziert, jedoch keine

Krankheitssymptome hervorruft [13];[14];[15]. Eine weitere Unterteilung der Viren in Subtypen erfolgt aufgrund ihrer Virulenz, die ein Maß dafür ist, bei welcher Virenanzahl eine Infektion letal verläuft. Die Subtypen gliedern sich in attenuierte, klassisch virulente, Antigen-variante Stämme und hoch virulente Stämme [16]. Speziell die hoch virulenten Stämme richten wirtschaftliche Schäden an, da sie eine Morbiditäts- und Mortalitätsrate von bis zu 100 % aufweisen können [17]. Die erhöhte Virulenz der Stämme wird in der hypervariablen Region von VP2 vermutet, da Sequenzvergleiche hoch virulenter Stämme zeigten, dass die AS A222, I242, I256 und I294 in vielen Isolaten übereinstimmen [18][19].

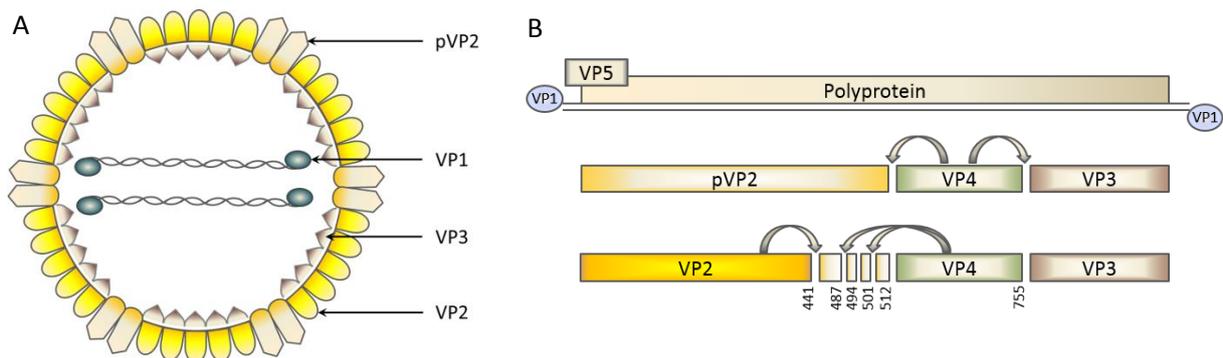


Abbildung 1: Schematische Darstellung von IBDV (A) und Genomsegment A (B); beides modifiziert nach viralzone.expasy.org Avibirnavirus. **A:** Aufbau von IBDV mit den viralen Proteinen VP1, pVP2, VP2 und VP3 sowie den beiden doppelsträngigen RNA-Segmenten A und B. **B:** Das RNA-Segment A codiert für das Polyprotein und das Nicht-Strukturprotein VP5, wobei sich beide ORFs teilweise überlappen. Am 5' Ende der RNA ist die RNA-abhängige RNA-Polymerase VP1 assoziiert. Das Polyprotein wird kotranslational autoproteolytisch durch VP4 in pVP2, VP4 und VP3 gespalten. Anschließend wird der Großteil vom Vorläuferprotein pVP2 durch VP4 und pVP2 in VP2 sowie die vier Peptide pep7a, pep7b, pep11 und pep46 prozessiert.

Das Kapsid von IBDV ist nicht umhüllt und weist eine ca. 60-65 nm große ikosaedrische T13-Struktur auf [20];[21]. Das Genom des Virus basiert auf zwei doppelsträngigen RNA-Segmenten, welche als Segment A und B bezeichnet werden. Das kürzere Segment B (~ 2,8 kb) kodiert für das ca. 97 kDa große VP1-Protein, das als die RNA-abhängige RNA-Polymerase des Virus identifiziert wurde [22]. Das Segment A umfasst ca. 3,4 kb und besitzt zwei sich teilweise überlappende, offene Leserahmen (*open reading frames*; ORFs). Der kleinere ORF kodiert für das Nicht-Strukturprotein VP5 mit einer Größe von 17 kDa. Das Protein ist in allen Stämmen des Serotyps I konserviert und induziert die Apoptose von infizierten Zellen [23];[24]. Der größere ORF kodiert für ein ca. 110 kDa großes Polyprotein, das zunächst in pVP2 (~ 54 kDa), VP4 (~ 27 kDa) und VP3 (~ 29 kDa) kotranslational gespalten wird [25]. Die Prozessierung an den Positionen 512/513 und 755/756 erfolgt autoproteolytisch durch das Protein VP4, welches zu der Familie der Lon-Proteasen gehört (vgl. Abbildung 1). Anders als anderen Mitgliedern der Lon-Proteasen fehlt jedoch IBDV-VP4 eine ATP-abhängige Domäne [26];[27]. Das Strukturprotein VP3 interagiert mit der viralen doppelsträngigen RNA, wodurch es zur Bildung von Ribonukleoproteinkomplexen kommt. Vermutlich schützt VP3 so die IBDV-RNA vor Abwehrmechanismen der Wirtszelle wie dem *RNA-induced silencing complex* [28];[29]. Außerdem

interagiert VP3 mit VP1 und ist mit ca. 450 bis 600 Kopien das zweithäufigste Protein im Virion [21];[30]. Bereits während der Kapsidassemblierung interagiert VP3 mit pVP2 und dient so als *scaffold* Protein [31]. Anschließend wird der Großteil von pVP2 vom C-Terminus ausgehend weiter prozessiert in VP2 und vier Peptide, die aufgrund ihrer Größe als pep46, pep7a, pep7b und pep11 bezeichnet werden. Dazu werden zunächst drei Peptide zwischen den Alanin-Alanin-Bindungen an den AS-Positionen 487/488, 494/495 und 501/502 (pep7a, pep7b und pep11) abgespalten, die als sekundäre Ziele von VP4 beschrieben sind [32]. Anschließend wird ein weiteres Peptid (pep46) durch Spaltung der AS-Bindung zwischen Alanin und Phenylalanin an Position 441 bzw. 442 durch einen autoproteolytischen Mechanismus von pVP2 gebildet [33]. Die abgespaltenen Peptide pep7a, pep7b und pep11 verbleiben auf der Oberfläche des Kapsids und sind zum Teil für die Virusassemblierung notwendig [34];[35]. Pep46 ist in der Lage die Membran von Zielzellen zu deformieren und Poren mit weniger als 10 nm im Durchmesser zu erzeugen. Diese sind zwar zu klein für eine Passage des Virions, jedoch wurde postuliert, dass sie dennoch durch eine Destabilisierung der Zellmembran für den Viruseintritt hilfreich sind [36].

1.1.2. VP2

Das aus der Prozessierung von pVP2 resultierende VP2-Protein ist das Hauptkapsidprotein. Mit einer Kopienzahl von 780 macht es mit ca. 51 % den größten Proteinanteil des Virions aus [12];[21]. Seine Aufgabe besteht in der Interaktion mit spezifischen Zellrezeptoren, wodurch die Aufnahme des Virus durch die Wirtszelle ermöglicht wird [37]. Das Protein setzt sich aus 441 Aminosäuren zusammen und hat ein Molekulargewicht von ca. 40 kDa [25]. Mit Hilfe von Elektronen-Kryomikroskopie konnte gezeigt werden, dass es während der Virusassemblierung zur Ausbildung von VP2-Trimeren kommt, wovon anschließend 260 Trimere die Oberfläche des Kapsids formen [21].

Bereits 1987 wurden die ersten Virus-neutralisierenden Antikörper gegen IBDV isoliert, die gegen VP2 gerichtet waren [38]. Bis heute konnten keine Virus-neutralisierenden Antikörper gegen andere Virusproteine induziert werden. Somit stellt VP2 das Hauptantigen von IBD-Viren dar. Für die Ausbildung von neutralisierenden Antikörpern ist die Proteinstruktur von VP2 entscheidend. So war kein neutralisierendes Immunglobulin in der Lage neben dem nativen auch denaturiertes VP2 zu binden [10]. Diese Vermutung konnte durch die Arbeit von Martinez-Torrecuadrada *et al.* bestätigt werden. Sie verglichen den Immunisierungserfolg mit VP2, das aufgrund verschiedener Assemblierungsformen in unterschiedlichen Konformationen vorlag, und stellten fest, dass der größte Immunschutz mit nativen VP2 erzielt wurde [39].

VP2 enthält zwischen den Aminosäuren 206 und 350 eine hypervariable Region, ein Bereich, der eine hohe Variabilität bei den unterschiedlichen Serotypen und Stämmen von IBDV aufweist und das Ziel neutralisierender Antikörper ist. Diese Region setzt sich aus zwei hydrophilen Bereichen zusammen,

die eine stark hydrophobe Region begrenzen [38]. Außerhalb dieser hypervariablen Region weist das Protein zwischen den verschiedenen Stämmen nur wenige AS-Unterschiede auf [40].

1.2. Influenza

Die Aviäre Influenza kommt vor allem bei Hühnern, Puten, Gänsen, Enten und Wasservögeln vor und wird von Influenzaviren verursacht. Influenzaviren werden aufgrund der Oberflächenproteine Hämagglutinin und Neuraminidase in Subtypen eingeteilt. Die Subtypen H5, H7 und H9 infizieren hauptsächlich Vögel (aviäre Viren), wohingegen H1 und H3 unter anderem beim Menschen auftreten. Allerdings werden immer wieder Zoonosen beobachtet, bei denen es zur Infektion von Säugetieren und Menschen durch aviäre Influenzaviren kommt.

Viren vom Subtyp H5N1 machten 2005 Schlagzeilen, da sie eine hohe Mortalitätsrate bei Vögeln verursachten. Ausgehend von Südostasien infizierten sich Vögel weltweit, wobei mehrfach eine Infektion von Menschen beobachtet wurde. Es erkrankten zwar nur wenige Menschen, jedoch kam es auch hier zu einer hohen Mortalität von über 50 %. Bis August 2012 listete die Weltgesundheitsorganisation (WHO) 608 bestätigte Infektionen von Menschen mit diesem Virusstamm, die in 359 Fällen zum Tode führten.

Die Aufnahme der Grippeviren kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Die meisten Infektionen erfolgen zwar über virushaltige Aerosole, aber auch Kontakt- und Schmierinfektionen sind möglich. Das aviäre Virus bindet mittels des Oberflächenproteins Hämagglutinin an α -2,3-verknüpfte Sialinsäurerezeptoren, die in der Luftröhre und im Darm von Vögeln vorkommen. Humane Viren binden jedoch vor allem α -2,6-verknüpfte Sialinsäurerezeptoren von Epithelzellen der Nasenschleimhäute, des Rachens, der Luftröhre und der Bronchien. Aufgrund der Rezeptorverteilung beim Menschen infizieren und replizieren humane Viren bevorzugt in Zellen des oberen Bronchialbereichs, wohingegen aviäre Viren die unteren Regionen der Bronchien befallen [41]. Im infizierten Bereich kommt es zu einer massiven Virusvermehrung und Zellerstörung, die ihren Höhepunkt am zweiten bzw. dritten Tag erreicht. Durch den hohen Virustiter in den oberen Atemwegen wird eine effiziente Übertragung der humanen Viren von Mensch zu Mensch durch Husten und Niesen ermöglicht. Im Gegensatz dazu können sich aviäre Viren beim Menschen schlechter verbreiten. Allerdings wird befürchtet, dass sich bei gleichzeitiger Infektion eines Wirtes (z. B. Schwein) von aviären und humanen Viren durch eine Re-Assortierung eine Viruskombination bildet, die leicht übertragbar ist und eine hohe Mortalität beim Menschen verursacht.

Als natürliches Reservoir und Hauptwirt der Viren gelten Wasservögel, da hier 103 von 144 Hämagglutinin-Neuraminidase-Kombinationsmöglichkeiten isoliert wurden [42]. Allerdings haben sich die Viren und ihre Wirte aufgrund der Koexistenz über einen langen Zeitraum aneinander angepasst und eine Infektion verläuft zumeist symptomfrei.

Die Übertragung der aviären Krankheitserreger erfolgt vornehmlich durch Fäkalien infizierter Tiere, die oral über das Trinkwasser aufgenommen werden. In Abhängigkeit von der Pathogenität der Viren können Infektionen apparent verlaufen oder aber eine Mortalität von 100 % verursachen. Bei einer Erkrankung sind die klinischen Symptome Apathie, Atemnot, Ödeme, Durchfall sowie ein Abfall der Legeleistung.

Die Vakzinierung gegen aviäre Influenzaviren wäre ein effektiver, kostengünstiger und einfacher Weg eine Erkrankung zu verhindern.

1.2.1. Das Influenza-Virus

Influenzaviren gehören der Familie der *Orthomyxoviridae* an, die zu den Membran-umhüllten Viren zählen. Die Viren besitzen eine segmentierte, einzelsträngige RNA mit negativer Polarität, die in einem helikalen Nukleokapsid verpackt ist. In der Familie sind neben den Genera Thogotoviren und Isaviren die Influenzaviren vom Typ A, B und C eingeordnet. Das Influenza C-Virus grenzt sich durch sieben anstatt acht RNA-Segmente von den anderen beiden Typen ab. Da das Wirtsspektrum der Influenza B- und C-Viren sich hauptsächlich auf Menschen und Schweine beschränkt und die Erkrankungen zumeist einen milden Verlauf nehmen, ist das Influenza A-Virus der bedeutendste Vertreter [43]. Der Virustyp A wird weiter in Subtypen unterteilt, die sich durch die Oberflächenproteine Hämagglutinin und Neuraminidase definieren. Dabei sind bislang 17 verschiedene Hämagglutinin- (H1-17) und neun Neuraminidase-Subtypen (N1-9) beschrieben [44]. Die Nomenklatur der Viren beinhaltet den Virustyp, den Isolationsort, die Referenznummer des Isolates, das Jahr der Isolierung und den Subtyp (z. B.: A/California/7/2009 H1N1) [45].

Influenzaviren verändern regelmäßig ihre Oberflächenproteine. Ein Grund für die Variabilität ist die hohe Fehlerrate während der Replikation durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase, da dieser eine *proof reading* Funktion fehlt. Dadurch kommt es bei der Translation vermehrt zu AS-Austauschen u. a. in Hämagglutinin und Neuraminidase. Diese begünstigen Veränderungen in deren Struktur, die eine Erkennung durch vorhandene Antikörper verhindern können (Antigendrift). Eine weitere Ursache liegt in der Beschaffenheit des segmentierten Genoms. So kann es bei der Infektion einer Zelle mit zwei verschiedenen Influenza-Subtypen zur Neusortierung (Re-Assortierung) der Genomsegmente kommen (Antigenshift). Dadurch entstehen neu-kombinierte Subtypen aus beiden Viren, die die Wirtsspezifität ändern und somit wiederum Spezies ohne vorhandenen Immunschutz infizieren können [46].

Influenzapartikel sind meist sphärisch aufgebaut und haben einen Durchmesser von ca. 100 nm. Allerdings wurden in frühen Passagen in Hühnerembryos häufig zusätzliche filamentöse Formen mit einer Länge von ca. 300 nm beobachtet [47].

Das RNA-Genom von Influenza A-Viren umfasst ca. 13.600 Basen, die für zehn bis elf Proteine kodieren. Die einzelsträngigen Genomsegmente sind als virale Ribonukleoprotein- (vRNP) Komplexe organisiert. Dabei liegt die RNA bis auf die beiden Enden mit mehreren Molekülen des Nukleokapsidproteins (NP) komplexiert vor [48]. Die 5' und 3' Enden der RNA sind partiell komplementär zueinander und mit den trimeren Polymerasekomplexen assoziiert. Ein Polymerasekomplex setzt sich aus den basischen Untereinheiten PB1 und PB2 (*polymerase basic protein 1 und 2*) sowie dem sauren Protein PA (*polymerase acidic protein*) zusammen und ist essentiell für die Transkription und Replikation der viralen RNA [49].

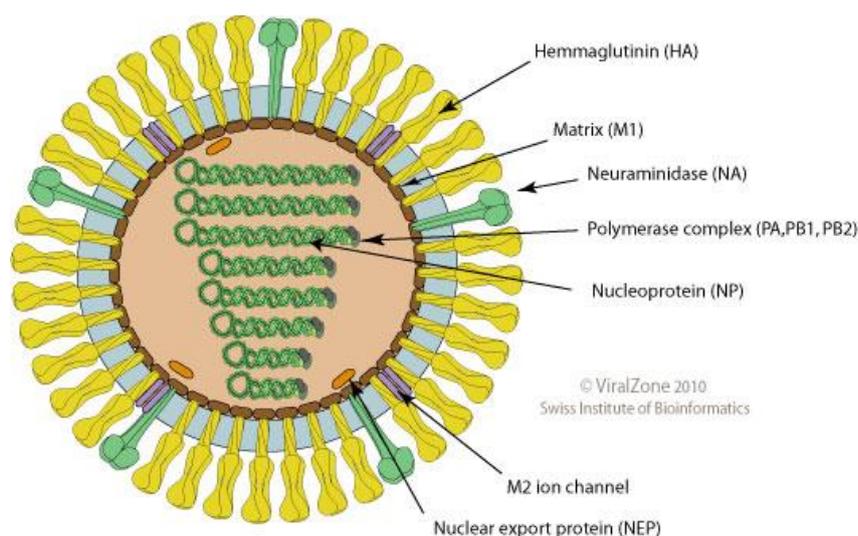


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Influenza A-Virus (viralzone.expasy.org.)

Die Oberflächenproteine Hämagglutinin und Neuraminidase sowie der Protonenkanal M2 sind in der Lipiddoppelschicht verankert. Im Inneren des Virions befinden sich die viralen Ribonukleoprotein-Komplexe (vRNP) mit den einzelsträngigen RNA-Segmenten sowie das Strukturprotein M1, welches sowohl mit den vRNPs als auch der Membran assoziiert ist.

Die vRNP-Komplexe interagieren außerdem mit dem Matrixprotein 1 (M1), welches das Kapsid des Virus bildet und die vRNPs mit der Virushülle verbindet [50]. Des Weiteren sind die drei Nicht-Strukturproteine Nicht-Strukturprotein 1 (NS1), das Nukleus-Export Protein (NEP) sowie das basische Polymeraseprotein-F2 (PB1-F2) im Inneren des Viruskapsids lokalisiert. Für das NS1-Protein sind verschiedene Funktionen beschrieben. Es wurde im Zusammenhang mit der zeitlichen Regulation der viralen RNA-Synthese, dem *splicing* und der Translation von viraler mRNA, der Assemblierung von Viruspartikeln, der Suppression der Immunantwort des Wirtes, der Aktivierung von Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und der Stamm-spezifischen Pathogenese gefunden [51]. NEP ist beim Export von neu synthetisierten vRNPs aus dem Zellkern ins Cytosol aktiv [52]. Das PB1-F2 Protein, das nicht in allen Virusisolaten zu finden ist, wird durch einen alternativen ORF des PB1-Segments kodiert und induziert vermutlich den Caspase 3-unabhängigen Apoptosevorgang von infizierten Zellen [53].

Umhüllt ist das Kapsid von einer Lipidschicht, in der die Proteine Matrixprotein 2 (M2), Neuraminidase und Hämagglutinin verankert sind. Das M2-Protein, das mit 20-60 Kopien im Virion vertreten ist, bildet als Homotetramer einen Protonenkanal aus. Dieser transmembrane Kanal ist wichtig für die Ansäuerung im Inneren des Virions, die nach der Aufnahme des Virus für die Freisetzung des Genoms ins Cytosol und der anschließenden Transkription und Replikation erforderlich ist [54];[55]. Neuraminidase und Hämagglutinin sind beides Glykoproteine, die auf der

Virusoberfläche sogenannte Spikes darstellen. Die Funktion der Neuraminidase liegt in der hydrolytischen Spaltung der Sialinsäuren von Glykoproteinen wie Hämagglutinin und Glykolipiden in der späten Phase der Infektion. Dadurch wird die Freilassung der neu-synthetisierten Viren ermöglicht und eine Reinfektion von bereits infizierten Zellen verhindert [56]. Neuraminidase ist wie das M2-Protein ein Homotetramer, deren Untereinheiten über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind [57].

Sowohl Neuraminidase, M2 als auch Hämagglutinin induzieren die Bildung Virus-neutralisierender Antikörper, jedoch blockieren nur Antikörper gegen Hämagglutinin die Bindung der Viren an die Zellrezeptoren und somit eine Zellinfektion. Antikörper gegen Neuraminidase und das M2-Protein verhindern lediglich die Virusfreisetzung von neu-synthetisierten Viren. Da Hämagglutinin außerdem mit 400-1.000 Kopien im Gegensatz zu 100-200 Kopien von Neuraminidase das häufigste Protein auf der Virusoberfläche ist, wird es häufig für die Entwicklung von *subunit* Vakzinen genutzt.

1.2.2. Hämagglutinin

Das Oberflächenprotein Hämagglutinin (HA) ist während des Replikationszyklus von Influenzaviren für das Andocken an die Wirtszellmembran sowie für die Fusion zwischen der viralen und zellulären endosomalen Membranen verantwortlich. Beim Andocken des Virus an die Oberfläche von Zielzellen bindet HA an Sialinsäurerezeptoren im respiratorischen (Vögel, Säugetiere) oder intestinalen Trakt (Vögel). Anschließend gelangen die Viruspartikel über Rezeptor-vermittelte Endozytose ins Innere der Wirtszelle, wo es zunächst in Endosomen eingeschlossen vorliegt. Im Laufe des Reifungsprozesses der Vesikel sinkt im Inneren der pH-Wert durch zelluläre Protonenpumpen, die eine Konformationsänderung von HA zur Folge haben. Diese strukturelle Veränderung führt zur Exposition des HA-Fusionspeptides und -Membranankers, wodurch eine Fusionspore entsteht. Dies ermöglicht die Fusion der Virusmembran mit der endosomalen Membran, die schließlich für die Freisetzung der vRNPs ins Cytosol erforderlich ist [58].

HA wird als Vorläuferprotein HA₀ translatiert, das aus dem Signalpeptid (17 AS) und den beiden Untereinheiten HA₁ (326 AS) und HA₂ (223 AS) besteht. Das Signalpeptid, welches später abgespalten wird, vermittelt die Translation ins ER und ist somit für die Glykosylierung des Proteins und anschließender Membranverankerung essentiell [59]. Die Untereinheit HA₁ bildet die globuläre Kopfdomäne, die nach außen exponiert ist. In HA₂ ist das Fusionspeptid (AS 343 bis 352), die Transmembrandomäne (AS 529 bis 550) und eine cytoplasmatische Domäne (AS 551 bis 566; alle Aminosäureangaben beziehen sich auf den Subtyp A/Puerto Rico/8/1934 H1N1; vgl. 7.3) lokalisiert. HA₀ wird auf der Virusoberfläche in die Untereinheiten HA₁ und HA₂ gespalten, die anschließend über eine Disulfidbrücke verbunden bleiben. Die Aminosäuren an der Spaltstelle bestimmen die Einteilung der aviären Influenzaviren in niedrig- und hoch-pathogene Stämme [60]. Monobasische

Erkennungssequenzen (Gln/Glu-X-Arg), die bei niedrig-pathogenen Stämmen auftreten, werden durch Trypsin-ähnliche Proteasen im respiratorischen und intestinalen Trakt gespalten. Hoch-pathogene, aviäre Stämme weisen eine multibasische Sequenz (Arg-X-Arg/Arg-Lys) auf, die durch Subtilisin-ähnliche Proteasen, wie Furin, erkannt werden. Da diese Proteasen auch außerhalb des respiratorischen und intestinalen Trakts vorhanden sind und die Spaltung bereits intrazellulär im Golgi-Vesikel erfolgt, kann sich eine Infektion mit diesen Stämmen systemisch ausbreiten [61].

Der Aufbau von verschiedenen HA-Subtypen wurde in zahlreichen Kristallstrukturen gelöst [62];[63];[64]. HA liegt als Homotrimer in der Virusmembran verankert vor. In der Kopfdomäne sind die Rezeptorbindestellen lokalisiert, die für die Bindung an die Sialinsäuren verantwortlich sind. Die Aminosäuren in der Rezeptorbindetasche bestimmen die Spezifität für α -2,3- oder 2,6-verknüpfte Sialinsäurereste [65]. Außerdem sind in der Kopfdomäne die vier meist konformations-abhängigen, antigenen Bereiche Ca, Sb, Sa, und Cb lokalisiert, an die Virus-neutralisierende Antikörper binden [66]. Mutationen in diesen Regionen (Antigendrift) führen häufig dazu, dass neutralisierende Antikörper nicht mehr binden können.

Die Glykosylierung beeinflusst die Faltung sowie die Interaktion des Virus mit den Rezeptoren und ist für eine effiziente Virusfreisetzung erforderlich [67]. Obwohl die Modifikation Einfluss auf die strukturelle Integrität und Stabilität während der HA-Biosynthese und deren Spaltbarkeit hat, variieren Anzahl und Lokalisierung außerhalb der Stammdomäne bei den HA-Subtypen zum Teil stark [68];[69]. Eine zusätzliche Glykosylierungsstelle bzw. deren Verlust kann sowohl die Rezeptorbindung als auch die Erkennung durch Antikörper beeinflussen [70].

1.3.Immunisierung

1.3.1. Immunsystem und orale Toleranz

Die meisten Pathogene (Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten) gelangen über Respirations-, Verdauungs- oder Urogenitaltrakt in den Organismus. Zur Neutralisation der Krankheitserreger gibt es in diesen Bereichen Ansammlungen von Mukosa-assoziierten Lymphgewebe (MALT), die in der Submukosa lokalisiert sind und einen Großteil der Lymphozyten enthalten. Zunächst werden Pathogene von Makrophagen oder Dendritischen Zellen (APZ; Antigen-präsentierende Zellen) phagozytiert und prozessiert. Die Antigenpeptide werden anschließend über MHC-Klasse II auf der Zelloberfläche den Lymphozyten präsentiert (MHC-Restriktion). Zusätzlich setzen APZ kostimulatorische Moleküle (Zytokine) frei, die die Antigenerkennung durch T-Helfer-Zellen (T_H1 -Zellen und T_H2 -Zellen) fördern. T_H1 -Zellen induzieren eine Zell-vermittelte Immunantwort über Makrophagen und T_H2 -Zellen aktivieren B-Lymphozyten.

B-Lymphozyten gehören zum adaptiven Immunsystem. Zum einen können sie aktiviert werden, indem Antigene direkt an ihre oberflächengebundenen Immunglobuline binden. Zum anderen

differenzieren sich B-Zellen nach T_H2-Zellkontakt sowie unter Einfluss von Zytokinen (IL-4 und IL-5) zu Plasmazellen und sekretieren nach Ig-Klassen-Switch Antikörper. So können Plasmazellen unter anderem pathogen-spezifische IgA-Antikörper in die Mukosa sekretieren, die Pathogene neutralisieren bzw. das Komplementsystem (angeborenes Immunsystem) aktivieren. Damit kann eine Infektion bereits in der Mukosa eingedämmt werden (lokale Infektion), bevor Pathogene in die Blutbahn gelangen und sich im ganzen Organismus verteilen (systemische Infektion). Einige T- und B-Lymphozyten differenzieren zu langlebigen Gedächtniszellen, die bei erneutem Antigenkontakt eine schnelle und effiziente Immunreaktion induzieren.

IBDV und aviäre Influenza-Viren gelangen hauptsächlich über eine orale Aufnahme in den Organismus. Für die Antigenaufnahme im Intestinum sind mehrere Möglichkeiten beschrieben. Der am besten charakterisierte Weg erfolgt über M-Zellen (*microfold*) in den Peyer-Plaques. Diese nehmen Partikel (Makromoleküle, Viren, Bakterien und Hefen) über Transzytose aus dem intestinalen Lumen auf und geben sie an ihrer basolateralen Seite an APZ ab [71];[72]. Anschließend können die Antigene von APZ sowie B-Zellen präsentiert werden, die ebenfalls in diesem Bereich lokalisiert sind [73]. Zusätzlich können Enterozyten als APZ fungieren, die den weitaus größten Anteil des Dünndarmepithels ausmachen. Sie sind in der Lage Makropartikel durch das Epithel zu phagozytieren und zu transzytieren [74]. Eine weitere Möglichkeit der Antigenaufnahme stellen Dendritische Zellen dar, die zwischen den Enterozyten des Darmepithels lokalisiert sind und so direkt Pathogene aus dem intestinalen Lumen aufnehmen können. Einige Pathogene sind in der Lage durch Schädigung des Epithels oder aktiv das mukosale Epithel zu passieren und gelangen so zu den basal sitzenden Immunzellen [75].

Damit das Immunsystem nicht auf Nahrungsmittel reagiert, besteht eine orale Toleranz. Sie wird unter anderem durch T-Suppressorzellen organisiert, die über spezifische Zytokine (TGF- β , IL-10 und IL-4), Deletion von Effektorzellen und Antikörper-vermittelte Suppression agieren. Für die Ausbildung einer oralen Toleranz gegenüber einem Antigen wirken viele Faktoren. Hierzu zählen das Alter, MHC-Restriktion, Zusammensetzung und Größe des Antigens, die Dosis, Antigenaufnahme und -prozessierung sowie mit welcher Häufigkeit das Antigen aufgenommen wurde [76].

1.3.2. Immunisierungsformen

Die effektivsten und kostengünstigsten Maßnahmen zur Bekämpfung und Kontrolle von Infektionskrankheiten stellen Impfungen dar. Der Großteil der Impfstoffe unterteilt sich in lebende, attenuierte und inaktive sowie Spalt- bzw. *subunit* Vakzine. Lebendimpfstoffe enthalten noch vermehrungsfähige Erreger, die zu einer Infektion führen. Häufig sind diese durch chemische Mutagenese und Selektion abgeschwächt (attenuiert), damit nur eine stark reduzierte Pathogenese erzeugt wird. Der Vorteil von Lebendvakzinen ist der hohe Impferfolg. Jedoch besteht die Gefahr,

dass es aufgrund von Neukombinationen oder Mutationen zu einer erhöhten Pathogenität des attenuierten Erregers kommt. Totimpfstoffe, die abgetötete Erreger enthalten, sind zwar sicherer, jedoch führen sie häufig zu einer schwächeren Immunantwort und sind somit meist auf Wirkstoffverstärker (Adjuvantien) angewiesen. Adjuvantien erhöhen unspezifisch die Immunreaktion und steigern die Antikörperproduktion, indem z. B. das Antigen verzögert freigegeben wird. Ebenfalls häufig auf Adjuvantien angewiesen sind Spalt- und *subunit* Impfstoffe, die nur Fragmente bzw. ein Protein des Erregers enthalten. Der Vorteil von Spalt- und *subunit* Impfstoffen ist eine Unterscheidung zwischen geimpften und infizierten Tieren (*DIVA, differentiate infected from vaccinated animals*). So genannte Markervakzine, die eine *DIVA* ermöglichen, fehlen bestimmte Antigenbereiche, wodurch gegen diese Regionen keine Antikörper gebildet werden können. Geimpfte und infizierte Tiere können schließlich durch das Vorhandensein dieser Antikörper unterschieden werden.

Subunit Vakzine können auch als Vektorimpfstoff entwickelt werden, bei denen zum Beispiel Viren, Bakterien oder Hefen als Träger von rekombinanten Proteinen dienen. Der Träger könnte dabei als Adjuvans wirken, da zusätzliche immunstimulatorische Moleküle (z. B. Lipopolysaccharide, Muramylpeptide, β -Glykane) verabreicht werden und durch eine Verkapselung des Antigens, die Freigabe verzögert erfolgt. Der Träger muss sehr sicher sein und stabil fremdes, genetisches Material aufnehmen. Zudem ist eine mukosale Applikationsform (oral oder nasal) meist das angestrebte Ziel der Entwicklung [77].

Die Applikation eines Impfstoffes richtet sich nach deren Wirksamkeit und sollte an den Impfling und dessen Umgebung angepasst sein. Es werden parenterale und lokale Applikationen unterschieden. Die parenterale Verabreichung ist eine invasive Methode, zu der u. a. subkutane und intramuskuläre Injektionen zählen. In der Regel wird für den Impferfolg weniger Antigen benötigt als für die lokale Verabreichung. Die subkutane Immunisierung erfolgt durch Applikation in die Unterhaut (Subkutis), wo relativ wenig Blutgefäße und Immunzellen lokalisiert sind. Dies führt dazu, dass die Antigenaufnahme und -prozessierung verzögert stattfindet, was zu einer langanhaltenden Immunantwort mit hoher Antikörperproduktion führen kann [78]. Die Antigene werden von Dendritischen Zellen und Makrophagen aufgenommen, welche anschließend in die Lymphknoten migrieren. Dort werden die prozessierten Antigene über MHC-Klasse II den T-Zellen präsentiert. Es kommt sowohl zur Induktion einer humoralen als auch zu einer zellvermittelten Immunantwort. Bei der lokalen Verabreichung erfolgt die Impfstoffgabe über die intakte Haut oder Schleimhäute, wie es bei der oralen und nasalen Vakzinierung der Fall ist. Die Antigenaufnahme und Immunreaktion erfolgt wie bei der natürlichen Infektion mit Pathogenen, wobei ebenfalls eine humorale und zellvermittelte Immunantwort induziert wird (vgl. 1.3.1). Die orale Vakzinierung findet große Akzeptanz in der Bevölkerung und spielt bei der Massentierhaltung eine bedeutende Rolle [2].

Jedoch scheitern viele orale Immunisierungsansätze an der geringeren Erfolgsrate im Vergleich zu parenteralen Applikationen. Die Ursache ist häufig eine proteolytische Degradation des Antigens während der Magen-Darm-Passage und die orale Toleranz, die für die Nahrungsaufnahme essentiell ist [76]. Für eine erfolgreiche Immunisierung muss die Ausbildung einer Toleranz gegen das Antigen verhindert werden. Inwiefern dafür die Impfstoffdosis, die Applikationszahl und Antigenzusammensetzung eine Rolle spielen, konnte bisher nicht generell geklärt werden.

1.3.3. Impfstoffsituation bei der Infektiösen Bursitis

Eine Vakzinierung von Nutztieren gegen eine IBD ist aufgrund der hohen Infektiosität und Stabilität der Viren der effizienteste Schutz vor einem Krankheitsausbruch und damit verbundenen wirtschaftlichen Schäden. Der ideale IBD-Impfstoff sollte so appliziert werden können, dass dieser eine Massenanwendbarkeit ermöglicht. Außerdem sollte das Vakzin einen breiten Immunschutz gegen verschiedene Serotypen sowie gegen hoch virulente Stämme liefern. Zudem muss eine Impfung sicher sein, sie darf möglichst keine Nebenwirkungen verursachen und zu keiner Interferenz mit maternalen Antikörpern führen. Die maternalen Antikörper, die von vakzinierten oder infizierten Hennen auf die Küken übertragen werden, haben Einfluss auf den optimalen Impfzeitpunkt. Zu hohe Antikörpertiter in den Küken können z. B. Impfviren neutralisieren, ohne dass ein Impfschutz induziert werden kann. Deshalb sollte bei der Wahl des Impfstoffes (Attenuierungsgrad: mild, *intermediate* oder *intermediate plus*) zuvor der persistierende maternale AK-Titer für den einzelnen Tierbestand bestimmt werden. Bei den derzeit in Deutschland zugelassenen Impfstoffen handelt es sich fast ausschließlich um attenuierte Lebendvakzine (Übersicht im Anhang Tabelle 18). Da die Vollvirusimpfstoffe in embryonierten Hühnereiern produziert werden, ist die Kultivierung nicht nur kostenintensiv und zeitaufwendig, sondern birgt auch immer das Risiko, dass der hergestellte Impfstoff nicht frei von Pathogenen ist. Ein weiterer Nachteil ist, dass die Verabreichung von Lebendimpfstoffen häufig zu einer vorübergehenden Immunsuppression führt, da diese aufgrund ihrer Infektiosität die *Bursa Fabricii* schädigen und einen Abbau der B-Lymphozyten verursachen. Totimpfstoffe sind zwar nicht in der Lage eine Infektion mit einer vorübergehenden Immunsuppression zu verursachen, jedoch müssen diese aufgrund der niedrigeren Effektivität meist parenteral appliziert werden.

Subunit Vakzine stehen zurzeit im Fokus der IBDV-Impfstoffentwicklung. Wie Totimpfstoffe haben diese den Vorteil, dass es zu keiner IBD-Infektion kommt, da hier nur mit einzelnen Proteinen oder Peptiden vakziniert wird. Für die Entwicklung von *subunit* Vakzinen wurde das Hauptantigen VP2 in *Escherichia coli* [79], Insektenzellen [80], *Arabidopsis thaliana* [81], *Saccharomyces cerevisiae* [82] sowie *Pichia pastoris* [83] exprimiert. Jedoch wurde für die Immunisierung das VP2-Protein nach der Synthese gereinigt, was zeitaufwendig und kostenintensiv ist. Ein erfolgreiches Beispiel für ein

Vektorvakzin ist die Verkapselung von VP2 in rekombinanten Herpesviren (HVT), die in Zellkultur herangezogen werden können (VAXXITEK® HVT+IBD (Merial, Frankreich) [84]. Die Vakzinierung mit den Impfviren führt zusätzlich zum Schutz gegen die Mareksche Krankheit. Der Nachteil bei diesem Impfstoff, der bereits in Deutschland zugelassen wurde, ist die Applikationsform. Im Gegensatz zu Lebendvakzinen, die einfach ins Trinkwasser gegeben oder zum Teil auch intranasal oder intraokular appliziert werden können, muss VAXXITEK® HVT+IBD *in ovo* oder intramuskulär injiziert werden.

Wu *et al.*, zeigten, dass auch eine orale Vakzinierung mit VP2 *subunit* Impfstoffen möglich ist [85]. Dazu wurden transgene VP2-Reispflanzenlinien generiert und die Reiskörner an Hühner verfüttert, ohne dass das Antigen vorher gereinigt wurde. Der Nachteil an transgenen Pflanzen ist eine zeitaufwändige Generierung und die Kultivierung, die in der Bevölkerung häufig keine Akzeptanz findet.

1.3.4. Impfstoffsituation bei Influenza

Die Impfung von Geflügel gegen Influenzaviren ist derzeit in der gesamten EU verboten und wird nur in Ausnahmefällen genehmigt. Somit sind die Maßnahmen zum Schutz vor Infektionen eine strenge Hygiene und bei Ausbruch eine Tötung des gesamten Tierbestandes des Halters (Keulung). Von einer prophylaktischen Impfung wird seitens der WHO abgeraten, da die gängigen Vollvirus-Vakzine häufig eine Unterscheidung nach dem *DIVA*-Prinzip nicht ermöglichen. Außerdem erhöht eine Impfung den Selektionsdruck und es wird befürchtet, dass die Verabreichung von Vollvirus-Vakzinen zur Re-Assortierung der Viren führen könnte (Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems).

Für eine Impfung in Ausnahmefällen sind in Deutschland derzeit zwei Vakzine zugelassen. Die Impfstoffe Nobilis Influenza H5N2 (inaktiviertes H5N2-Virus; Intervet International B.V.) und Gallimune FLU H5N9 (inaktiviertes H5N9-Virus; Merial GmbH) werden beide intramuskulär verabreicht, was vor allem bei Nutztieren sehr aufwendig ist (Angaben vom Paul-Ehrlich-Institut, Stand Januar 2013). Aus diesem Grund wird an Alternativen geforscht, die zum einen nicht auf eine Produktion in Hühnereiern angewiesen sind, und zum anderen das *DIVA*-Prinzip erfüllen.

Deutlich mehr Erfahrung gibt es bei der Entwicklung von Vakzinen gegen humane Influenzaviren, da der erste Impfstoff bereits 1936 auf den Markt gebracht wurde. Bei dem saisonalen Vakzin handelt es sich um einen trivalenten Impfstoff aus den beiden Typ A-Viren H3N2 und H1N1, sowie einem Typ B-Virus. Die WHO ermittelt hierfür eine Wahrscheinlichkeit, welcher Virusstamm sich in der kommenden Saison ausbreitet und gibt eine Empfehlung für den Impfstoff heraus. Die Herstellung erfolgt ebenfalls in embryonierten Hühnereiern, was den Nachteil hat, dass es sehr zeitaufwendig und kostenintensiv ist. Zunächst wird dafür das saisonale Virus mit einem Laborstamm (A/Puerto Rico/8/1934 H1N1) kombiniert, damit es für die Kultivierung in Eier adaptiert ist. Dafür wird nach der Re-Assortierung der RNA-Segmente ein Hybridvirus selektiert, das die Oberflächenproteine vom

saisonalen Stamm exponiert, sich jedoch effizient kultivieren lässt [86]. Anschließend können die Hybridviren produziert, gereinigt, gegebenenfalls inaktiviert oder attenuiert und getestet werden. Eine Herstellung des Impfstoffes dauert mit diesem Prozedere von der Empfehlung bis zur Auslieferung ca. sechs Monate. Damit ist der Prozess für eine unerwartet auftretende Grippewelle, wie es zum Beispiel 2009 mit dem Virusstamm A/California/7/2009 der Fall war, sehr langwierig.

Eine Applikation der Vakzine beim Menschen erfolgt derzeit mit einer intramuskulären Injektion. Seit 2012 ist auch ein Impfstoff für Kinder und Jugendliche auf dem Markt, der lebend-attenuiertes Reassortanten-Influenzavirus enthält und nasal appliziert wird (Fluenz[®], AstraZeneca GmbH).

Alternativ werden derzeit unter anderem Impfstoffe auf folgender Basis getestet: Virus-analoge Partikel, virale Vektoren, DNA-basierte Vakzine und universale Vakzine. Universale Vakzine sollen zur Bildung von Stamm-unabhängigen, neutralisierenden Antikörpern gegen die Proteine M2, NP oder auch HA führen. Bereits in der dritten klinischen Testphase befindet sich ein trivalenter Impfstoff mit rekombinant hergestelltem HA aus Insektenzellen [87].

1.4. Expressionssysteme

Für eine erfolgreiche Vakzinierung ist häufig eine native Konformation der Antigene ausschlaggebend. Da einige Proteine nur nach posttranslationaler Modifikation wie Glykosylierung, Phosphorylierung oder eine Ausbildung von Disulfidbrücken korrekt gefaltet werden, spielen diese Modifizierungen oftmals eine entscheidende Rolle bei der Induktion neutralisierender Antikörper. Bakterielle Expressionssysteme wie *Escherichia coli* (*E. coli*) lassen sich schnell entwickeln und können kostengünstig zu hohen Zelldichten fermentiert werden, jedoch fehlen hier meist die posttranslationalen Modifikationen, wodurch ungefaltete oder fehlerhaft gefaltete Proteine meist in unlöslicher Form, in *inclusion bodies*, vorliegen. Es ist zwar möglich, nach einer Reinigung der Proteine die korrekte Faltung zu induzieren, jedoch ist es häufig mit einem hohen Aufwand verbunden. Eukaryotische Expressionssysteme, wie mit Baculoviren infizierte Insektenzellen oder transgene Pflanzen sind zwar in der Lage Proteine zu modifizieren, jedoch entspricht das Glykosylierungsmuster nicht dem humaner Zellen. Insektenzellen haben zusätzlich den Nachteil, dass die viralen bzw. zellulären Proteasen die Produktausbeute mindern können. Transgene Pflanzen liefern zwar hohe Proteinausbeuten, jedoch ist die Generierung sehr zeitaufwendig. Ein weiteres eukaryotisches System, das für heterologe Proteinexpression geeignet wäre, sind Säugerzellen (z. B. *chinese hamster ovary cells*; CHO-Zellen). Ihr Vorteil ist, dass modifizierte Proteine in ihrer nativen Form synthetisiert werden können. Allerdings sind die Wachstumsgeschwindigkeiten niedrig und die Ausbeuten zumeist gering. Darüber hinaus sind die Kultivierungskosten aufgrund der speziellen Medien deutlich höher als bei anderen Systemen.

Ein System, das viele Vorteile anderer Expressionssysteme vereint, sind Hefezellen. Die Einzeller haben eine geringe Zellgröße und können unter einfachen Kultivierungsbedingungen mit kostengünstigen Nährmedien zu hohen Zelldichten fermentiert werden. Außerdem sind viele Gattungen genetisch gut charakterisiert, wodurch die Generierung rekombinanter Hefestämme vereinfacht wird. Zudem können die meisten Proteine vollständig prozessiert und posttranslational modifiziert werden, da Hefen zu den Eukaryoten gehören [88]. Proteine können in das Medium sekretiert werden, aus dem sie anschließend einfach gereinigt werden können oder in der Zelle verbleiben und so appliziert werden. Das erste aus rekombinanten Hefen hergestellte Vakzin wurde gegen Hepatitis B entwickelt. Dabei wurde das Oberflächenprotein von Hepatitis B HBsAg (*hepatitis B surface antigen*) in *S. cerevisiae* exprimiert und anschließend über mehrere Schritte gereinigt [89]. Eine Übersicht der forschenden Pharmaunternehmen zeigt, dass nicht nur die derzeitigen Impfstoffe gegen Hepatitis A und B mit Hilfe von rekombinanter Bäckerhefe produziert werden, sondern auch das Vakzin gegen humane Papiloma-Viren. Des Weiteren konnten vielversprechende Ergebnisse für Impfstoffe gegen Malaria, Influenza, Infektiöse Pankreasnekrose und Dengue Fieber mit rekombinanten Hefezellen erzielt werden [90];[91];[92];[93];[94].

Für die heterologe Proteinexpression sind die wichtigsten Hefegattungen die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), die methylo-trophen Hefen *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) und *Hansenula polymorpha* (*H. polymorpha*) sowie die Milchhefe *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*). Die einzelnen Hefegattungen haben zum Teil sehr unterschiedliche Eigenschaften hinsichtlich ihres Metabolismus und eignen sich unterschiedlich gut für die Synthese verschiedener Proteine. Ein Nachteil von *S. cerevisiae* ist die hohe Ethanol-syntheserate unter aeroben Bedingungen, die sich negativ auf den Produktausbeute-Koeffizienten auswirken kann [95]. Außerdem kam es im Laufe der Evolution in der Bäckerhefe zu einer Genomduplikation, was zur Folge hat, dass einige Gene mehrfach im Genom vorkommen und eine genetische Manipulation, wie der *knock out* bestimmter Gene, problematisch sein kann. Die methylo-trophen Hefen *P. pastoris* und *H. polymorpha* werden zwar gerne als alternative Hefen für die Proteinsynthese verwendet, da sie zu höheren Zelldichten wachsen und die Proteine eine geringere Hyperglykosylierung aufweisen, jedoch wird Methanol als Kohlenstoff eingesetzt, was den Einsatz von speziellen explosions-sicheren Fermentern notwendig macht [96].

1.4.1. *Kluyveromyces lactis*

Die Milchhefe *K. lactis* wird bereits seit Jahrzehnten für die heterologe Proteinexpression in der Biotechnologie genutzt [17]. Wie die Hefegattungen *S. cerevisiae* und *P. pastoris* wurde *K. lactis* ebenfalls als sicher eingestuft (GRAS-Status – *generally recognized as safe*), wodurch sie als Lebensmittel und Pharmazeutikum verwendet werden kann [97]. Außerdem hat sie den Vorteil, dass

das Genom vollständig sequenziert wurde, was die genetische Manipulation deutlich vereinfacht. Das Genom kodiert für über 5.300 Gene, die sich auf sechs Chromosomen mit einer Gesamtgröße von 10,6 Mb verteilen [98]. Für die Expression von Fremdgenen stehen sowohl integrative Vektoren, die eine Integration des Gens ins Genom ermöglichen, als auch episomale Expressionsvektoren zur Verfügung, die autonom mit einer hohen Kopienzahl replizieren [99];[100]. Ein weiterer Vorteil ist, dass für eine Fermentation im Gegensatz zu den methylotrophen Hefen keine explosionsfähigen Fermenter benötigt werden, da kein Methanol zum Einsatz kommt. Dennoch kann auch *K. lactis* wie *P. pastoris* zu hohen Zelldichten fermentiert werden und erreicht dabei beispielsweise für humanes Serumalbumin mit ca. 3 g pro Liter eine hohe Proteinausbeute [99];[101]. Bisher wurde bereits eine ganze Reihe an pharmazeutisch-relevanten Proteinen in *K. lactis* synthetisiert, wie Interleukin 1- β , Interferon α A, β -Laktoglobulin, Lysozym, Monozytenkolonien-stimulierender Faktor und das Insulin-Vorläuferprotein Pro-Insulin [97].

Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* kann *K. lactis* ein breiteres Spektrum als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen. Hierzu zählt auch die kostengünstige Laktose. Die zwei wichtigsten Gene, die für die Laktoseassimilation benötigt werden, sind *LAC4* und *LAC12*. *LAC12* kodiert für die membranständige Laktose-Permease, die die Aufnahme des Milchzuckers aus dem Medium vornimmt, und *LAC4* für die β -Galaktosidase, die die Spaltung von Laktose in Glukose und Galaktose katalysiert [102]. Die Expression beider Gene wird durch den bidirektionalen und Laktose-induzierbaren *LAC4-LAC12*-Promoter (Abk.: *LAC4*-Promoter) reguliert [103]. Er zählt aufgrund seiner Induzierbarkeit und der hohen Transkriptionsaktivität zu den bestcharakterisierten und am häufigsten für die Fremdproteinexpression in *K. lactis* verwendeten Promotern [97].

1.4.2. Expressionskassette

Ein System, mit dem neue stabile *K. lactis*-Stämme effizient generiert werden können, ohne dass heterologe Marker ins Genom integriert werden, wurde von Krijger *et al.* entwickelt. Dabei wird die Fremdgenexpression nach erfolgreicher Integration in den *LAC4*-Genlokus von dem *LAC4*-Promoter reguliert [104]. Der *LAC4*-Promoter ist durch den Transkriptionsaktivator KIGal4 und dessen Repressor KIGal80 regulierbar. KIGal4 bindet als Homodimer an die vier *UAS_{GAL}* (*upstream activation sequences*) im *LAC4*-Promoterbereich [105]. Ist keine Laktose oder Galaktose 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. Wenn Laktose oder Galaktose im Medium vorhanden ist (induzierende Bedingungen), dissoziiert KIGal80 von KIGal4 ab und die Transkription der Zielgene wird aktiviert [106];[107]. Durch die Integration des Fremdgens in den *LAC4*-Lokus kann somit eine Regulation über die Kohlenstoffquelle erfolgen. Zusätzlich kann über die Regulatorproteine KIGal4 und KIGal80 Einfluss auf die Synthese genommen werden. Dies ist nicht nur

für die Expression von toxischen Proteinen von Vorteil, sondern reduziert auch den Stress durch die Überexpression eines Fremdproteins.

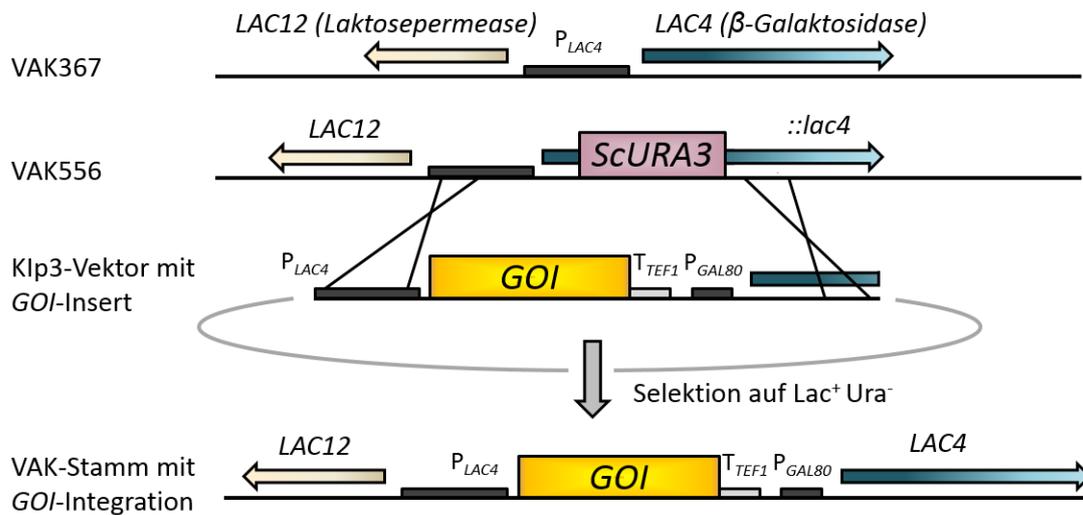


Abbildung 3: Schema zur Generierung rekombinanter *K. lactis*-Stämme nach Krjiger *et al.*, [104]. Der Ausgangsstamm VAK367 enthält den nativen *LAC*-Lokus mit den Genen *LAC4* (β -Galaktosidase) und *LAC12* (Laktose-Permease), deren Expression durch den divergenten *LAC4*-Promoter reguliert wird. Beide Genprodukte sind für die Laktoseverwertung essentiell. Beim Stamm VAK556 ist das *LAC4*-Gen durch das *S. cerevisiae* *URA3*-Markergen disruptiert, wodurch der Stamm Laktose nicht als Kohlenstoffquelle nutzen kann. Auf dem Plasmid Klp3 ist die Expressionskassette mit *LAC4*-Promoter, Gen von Interesse (*GOI*, z. B. VP2), *TEF1*-Terminator, *GAL80*-Promoter sowie den im Stamm VAK556 disruptierten Bereich von *LAC4* nacheinander angeordnet. Das Plasmid wird für die Generierung von Expressionstämmen mit einem Restriktionsenzym (z. B. *EcoRI*) geschnitten und in den Stamm VAK556 transformiert. Nach erfolgreicher homologer Rekombination kann der resultierende Stamm Laktose verwerten und ist Uracil-auxotroph.

Für die Konstruktion der Hefestämme nach Krjiger *et al.* wird der Ausgangsstamm VAK556 genutzt [104]. Hier ist das 5' Ende des *LAC4*-Gens so durch ein *ScURA3*-Markergen disruptiert, dass keine funktionsfähige β -Galaktosidase gebildet werden kann und die Hefen nicht mehr in der Lage sind, Laktose als Kohlenstoffquelle zu verwerten. Der Klp3-Vektor, mit Hilfe dessen das Fremdgen ins Genom integriert werden kann, enthält den fehlende 5' Bereich des *lac4* Gens. Dieser ist hinter einem *GAL80*-Promoter angeordnet, wodurch nach einer erfolgreichen Rekombination dieses Fragmentes in das Genom vom Stamm VAK556, die *LAC4*-Expression durch den ebenfalls K*G*al4-abhängigen *GAL80*-Promoter erfolgen kann. Auf dem Vektor Klp3-MCS ist außerdem vor dem *GAL80*-Promoter ein 1,6 kb großer Bereich des *LAC4*-Promoters mit einer *multiple cloning site* platziert, die eine Insertion von Fremdgenen (*GOI*; *gene of interest*) hinter dem *LAC4*-Promoter ermöglicht. Nach Spaltung des Klp3-MCS_*GOI* Plasmids mit einem Restriktionsenzym, welches im *LAC4*-Promoter und *lac4'*-Genfragment schneidet, und einer Transformation in den Stamm VAK556, erfolgt die Selektion positiver Kandidaten auf Laktose-Verwertung. Denn nur bei erfolgreicher Rekombination des Fragmentes in das Hefegenom kommt es zur Expression einer funktionsfähigen β -Galaktosidase, wodurch die Rekombinanten in der Lage sind auf Nährmedium mit Laktose als einzige Kohlenstoffquelle zu wachsen.

Mit Hilfe dieses Systems konnten bereits mehrere Hefestämme generiert werden. Zum einen wurde das Gen für scFv_{ox} (*single-chain antibody fragment*) genomisch integriert, was die Sekretion des synthetisierten Proteins in das Medium bewirkte. Da das Protein in der Lage war Epitope zu binden, deutete dies auf eine vollständige Prozessierung und Proteinfaltung hin. Zum anderen konnte das hoch immunogene Membranprotein E2 vom Bovinen Virusdiarrhoe-Virus (BVDV) exprimiert und intrazellulär angereichert werden. Eine zusätzliche Genkopie vom Transkriptionsaktivator K1Gal4 in dem Stamm bewirkte eine Erhöhung der E2-Proteinmenge pro Hefezelle. Der Großteil des Proteins wurde über Immunfluoreszenzaufnahmen in der Peripherie des Zellkerns detektiert, wodurch eine Assoziation mit intrazellulären Membranen vermutet wurde. Erste Vakzinierungsstudien von Mäusen mit ganzen Hefezellen führten zum Nachweis von Antikörpern, die in der Lage waren BVDV-Viren zu erkennen [104].

1.4.3. Hefe als Vakzin

In der Vergangenheit wurden die rekombinant exprimierten Antigenproteine häufig für die Vakzinierung aus Hefen gereinigt. Die Reinigung ist dabei ein kostenintensives und aufwendiges Verfahren, selbst wenn es zuvor ins Medium sekretiert wird. Außerdem ist die Reinigung aufgrund des GRAS-Status von Hefen nicht zwingend notwendig, denn dieser erlaubt ebenfalls eine Verabreichung ganzer Hefezellen an Tiere und Menschen. Deshalb verfolgen einige Arbeitsgruppen auch den Ansatz ganze Hefezellen für die Immunisierung gegen HIV-1, Hepatitis B und C und einige humane Krebserkrankungen einzusetzen [108];[109];[110];[111]. Die ersten Arbeiten dazu stammen von Schreuders *et al.*, die ebenfalls mit dem HBsAg von Hepatitis B-Viren intraperitoneale Immunisierungsversuche mit Mäusen durchführten [109]. Dabei wurden Peptide des Antigens mit dem Zellwandprotein α -Agglutinin fusioniert. Die Applikation führte neben einer schwachen Antikörperantwort gegen HBsAg zu einer starken AK-Reaktion gegen *S. cerevisiae*-Zellwandproteine. Dies deutet einen weiteren Vorteil der Verabreichung von ganzen Hefezellen an, bei dem ein zusätzlicher adjuvierender Effekt postuliert wurde. Die Zellwandbestandteile Mannan und β -Glukan signalisieren dem Körper eine mikrobielle Infektion, weshalb Hefen über Mannan- und Toll-ähnliche Rezeptoren von Dendritischen Zellen und Makrophagen erkannt und aufgenommen werden [112]. Nachdem die Zellen von Dendritischen Zellen phagozytiert wurden, wurde eine Kreuzpräsentation der Antigene auf MHC Klasse I und II sowie eine erhöhte Expression von kostimulatorischen Molekülen wie Zytokine und Chemokine beobachtet [113]. Dies deutet darauf hin, dass Hefen sowohl für die Induktion einer T-Zellantwort über CD4⁺ und CD8⁺-Zellen als auch für eine humorale Immunreaktion geeignet sind [112].

Als Applikationsform bieten sich unterschiedliche Methoden an. Die meisten Studien erfolgten mittels subkutaner Verabreichung [112];[113];[114];[115]. Jedoch steht vor allem die orale

Vakzinierung von Tieren im Interesse der Forschung, da nicht nur die Durchführung einfacher ist, sie ist auch kostengünstiger. Hefe wird bereits seit vielen Jahren als Zusatzstoff im Futtermittel von Nutztieren eingesetzt und gilt deshalb als unbedenklich. Ein Beispiel für eine Erfolgs-versprechende orale Vakzinierung von Mäusen mit rekombinanten Hefen wurde durch Zhang *et al.* beschrieben [116]. Ihnen gelang es nach oraler Verabreichung von *S. cerevisiae*-Hefen, die den negativen Regulator der Skelettmuskelmasse Myostatin exprimierten, vergleichbare Ergebnisse des Körpergewichts und der Muskelzusammensetzung zu erzielen wie nach subkutaner Injektion.

1.5. Zielstellung der Arbeit

Seit über 50 Jahren werden Impfstoffe aufwendig in embryonierten Hühnereiern produziert. Hierfür muss zunächst ein Saatvirus etabliert werden, welches eine effiziente Kultivierung in Eiern ermöglicht. Die Eier müssen spezifisch pathogen-frei sein, damit der produzierte Impfstoff keine Krankheitserreger enthält. Die Produktion ist zeitaufwändig und die Immunisierung mit einem Vollvirusimpfstoff hat das Risiko der Re-Assortierung von Viren. Zudem erfüllen die Vakzine häufig nicht das DIVA-Prinzip. Deshalb liegt seit einiger Zeit der Fokus der Forschung auf der Entwicklung von alternativen Impfstoffen wie beispielsweise *subunit* Impfstoffe. Besonders geeignet wäre ein Hefe-basiertes *subunit* Vakzin, da es nicht nur günstig und schnell produziert werden könnte, sondern durch fehlende Virusproteine auch eine Unterscheidung von geimpften und infizierten Tieren ermöglichen würde.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist der Nachweis, dass mit einem *Kluyveromyces lactis*-basierten Vakzin eine protektive Immunantwort induziert werden kann. Dabei standen die von Viren-übertragenen Geflügelkrankheiten Infektiöse Bursitis und Influenza im Mittelpunkt. Dazu wurden zunächst rekombinante Hefestämme mit Hilfe der Expressionskassette von Krijger *et al.* erzeugt, die das IBDV-Hauptkapsidprotein VP2 bzw. das Influenzavirus-Oberflächenprotein HA synthetisieren [104]. Anschließend wurden die generierten Stämme hinsichtlich der Fremdproteinausbeute durch Steigerung der Expressionsrate und Anpassung der Nukleotidsequenz an die Hefe optimiert. VP2 kann zu subviralen Partikeln assemblieren, weshalb sich die Frage stellte, ob diese ebenfalls in *K. lactis* ausgebildet werden können. Für das Glykoprotein HA wurde untersucht, ob das Protein in der Milchhefe ebenfalls glykosyliert und in der Plasmamembran verankert vorliegt.

Nach der Charakterisierung und Optimierung der Hefestämme wurde geprüft, ob eine Verabreichung der viralen Proteine eine Immunantwort induziert. Dabei sollte bewusst auf eine Reinigung des Antigens verzichtet werden und die ganze Hefezelle subkutan bzw. oral appliziert werden. Für die Immunisierung wurden Mäuse als Modell und Hühner als natürlicher Wirt der Viren eingesetzt. Um den Vakzinierungserfolg zu bestimmen, wurden die Seren auf bindende bzw. neutralisierende Antikörper untersucht und VP2-vakzinierte Hühner einem Challenge-Versuch unterzogen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Geräte und deren Hersteller.

Geräte	Hersteller
Autoklav	Varioklav
Brutschränke, Schüttler	Memmert, Infors
10 l Biostat ED Bioreaktor	Braun Biotech
Mini-PROTEAN-Apparaturen, MyiQ™2 <i>Real-Time PCR Detection System</i>	BioRad
Axioskop, Mikroskop	Zeiss
Geldokumentation	MWG, BioRad
Heizblock, Pipetten, Thermocycler	Eppendorf
Lyophilie, alpha 1-4	Christ
Nanophotometer	IMPLEN
pH-Meter	WTW
Thermorührer	IKA-Labortechnik
Spektralphotometer	Pharmacia
Vibrax-Schüttler	VWR
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waage, Feinwaage	Sartorius
Zentrifugen	Eppendorf, Beckmann

2.1.2. Chemikalien

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Chemikalien und deren Hersteller.

Chemikalien	Hersteller
Aceton, Agar Agar, Albumin Fraktion V (BSA), 6-Aminohexansäure, Ammoniumperoxodisulfat (APS), Ampicillin, β -Mercaptoethanol, Calciumchlorid, Di-Ammoniumsulfat, Di-Kaliumhydrogenphosphat, Di-natriumhydrogenphosphat, Dithiothreitol (DTT), Essigsäure, Ethanol, Ethanolamin, Ethidiumbromid, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Formaldehyd, HEPES, Imidazol, IPTG, Isopropanol, Kaliumacetat, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumhydroxid, Kristallviolett, Magnesiumacetat, Magnesiumchlorid, Methanol, Milchpulver, MOPS, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumdodecylsulfat (SDS), Natriumhydroxid, PEG3350, PEG 4000, Pepton, Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol, Phosphorsäure, PIPES, Rotiphorese 30 (Acrylamid), Saccharose, Salzsäure, Sorbitol, Tyrosin, Trichloressigsäure (TCA), Tricin, Tween 20, Valin	Carl Roth
Agarose, Bromphenolblau, Coomassie Brilliantblau G250, Glycerol, Hefeextrakt, Trypton	SERVA
Adenin, Arginin, Glycin, Histidin, Leucin, Methionin, Phenylalanin, Threonin, Tris, Triton X-100, Tryptophan, Uracil	AppliChem
Laktose, Lithiumacetat, DAPI, Nickelchlorid, PBS, TPCK-Trypsin	SIGMA
Galaktose, Isoleucin, TEMED	Fluka
YNB	Difco
Natriumfluorid	Merck
ECL Plus Western Detection System	GE Healthcare
Entwickler und Fixierer für CEA-Filme	Kodak

2.1.3. *Kluyveromyces lactis*-StämmeTabelle 3: Übersicht aller *K. lactis*-Stämme. Dargestellt sind die Ausgangsstämme, der relevante Genotyp sowie das Fremdprotein.

Stammname	Ausgangs-stamm	Genotyp	Fremdprotein	Referenz
VAK367	CBS 2359/152	<i>MATa; ura3-20; metA1-1</i>	Keine	[104]
VAK556	VAK367	<i>MATa; ura3-20; metA1-1; lac4D2::ScURA3</i>	Keine	[104]
VAK815	VAK556	<i>MATa; ura3-20; metA1-1; P_{LAC4}::H7-HA-T_{AgTEF}-P_{KIGAL80}::LAC4</i>	H7-HA	Osita Onuma
VAK880	VAK556	<i>MATa; ura3-20; metA1-1; P_{LAC4}::H7-HA-T_{AgTEF}-P_{KIGAL80}::LAC4; (pLI-1)_n</i>	H7-HA	Osita Onuma
VAK887	VAK556	<i>MATa; ura3-20; metA1-1; P_{LAC4}::VP2-T_{AgTEF}-P_{KIGAL80}::LAC4</i>	IBDV-VP2	[117]
VAK888	VAK556	<i>MATa; ura3-20; metA1-1; P_{LAC4}::VP2_{T2S}-T_{AgTEF}-P_{KIGAL80}::LAC4</i>	IBDV-VP2 _{T2S}	[117]
VAK889	VAK888	<i>MATa; ura3-20; metA1-1; P_{LAC4}::VP2_{T2S}-T_{AgTEF}-P_{KIGAL80}::LAC4; Klgal80Δ2::ScURA3</i>	IBDV-VP2 _{T2S}	Diese Arbeit
VAK890	VAK888	<i>MATa; ura3-20; metA1-1; P_{LAC4}::VP2_{T2S}-T_{AgTEF}-P_{GAL80}::LAC4; (pLI-1)_n</i>	IBDV-VP2 _{T2S}	[117]
VAK894	VAK556	<i>MATa; ura3-20; metA1-1; P_{LAC4}::VP2_{T2S}-HA-Tag-T_{AgTEF}-P_{KIGAL80}::LAC4</i>	IBDV-VP2 _{T2S} -HA-Tag	Diese Arbeit
VAK942	VAK556	<i>MATa; ura3-20; metA1-1; P_{LAC4}::OH7-HA-T_{AgTEF}-P_{KIGAL80}::LAC4</i>	H7-HA	Osita Onuma
VAK943	VAK942	<i>MATa; ura3-20; metA1-1; P_{LAC4}::OH7-HA-T_{AgTEF}-P_{KIGAL80}::LAC4; (pLI-1)_n</i>	H7-HA	Osita Onuma
VAK944	VAK556	<i>MATa; ura3-20; metA1-1; (P_{LAC4}::OH7-HA-T_{AgTEF}-P_{KIGAL80}::LAC4)_n</i>	H7-HA	Osita Onuma
VAK945	VAK556	<i>MATa; ura3-20; metA1-1; (P_{LAC4}::OH7-HA-T_{AgTEF}-P_{KIGAL80}::LAC4)_{inverse}</i>	keine	Osita Onuma
VAK952	VAK556	<i>MATa; ura3-20; metA1-1; P_{LAC4}::OPR8-HA-T_{AgTEF}-P_{KIGAL80}::LAC4</i>	PR8-HA	Osita Onuma
VAK953	VAK952	<i>MATa; ura3-20; metA1-1; P_{LAC4}::OPR8-HA-T_{AgTEF}-P_{GAL80}::LAC4; (pLI-1)_n</i>	PR8-HA	Osita Onuma
VAK955	VAK556	<i>MATa; ura3-20; metA1-1; P_{LAC4}::OCA-HA-T_{AgTEF}-P_{KIGAL80}::LAC4</i>	CA-HA	Osita Onuma
VAK907	VAK367	<i>MATa; ura3-20; metA1-1; (pLI-1)₂</i>	Keine	Jan Baumann
VAK910	VAK556	<i>MATa; ura3-20; metA1-1; P_{LAC4}::OVP2_{T2S}-T_{AgTEF}-P_{KIGAL80}::LAC4</i>	IBDV-oVP2 _{T2S}	[117]
VAK911	VAK910	<i>MATa; ura3-20; metA1-1; P_{LAC4}::OVP2_{T2S}-T_{AgTEF}-P_{GAL80}::LAC4; (pLI-1)_n</i>	oVP2 _{T2S} , ScURA3	[117]
VAK964	VAK367	<i>MATa; ura3-20; metA1-1; Klgal4::ScURA3</i>	keins	J. Wieczorek
VAK1004	VAK964	<i>MATa; ura3-20; metA1-1; Klgal4::ScURA3; Xi1::KIGAL4</i>	Keins	J. Wieczorek
VAK1005	VAK1004	<i>MATa; ura3-20; metA1-1; KIGAL4; Xi1::KIGAL4</i>	keins	J. Wieczorek
VAK1042	VAK556	<i>MATa; ura3-20; metA1-1; P_{LAC4}::OCA_{T137E}-HA-T_{AgTEF}-P_{KIGAL80}::LAC4</i>	CA _{T137E} -HA	Diese Arbeit
VAK1043	VAK1042	<i>MATa; ura3-20; metA1-1; P_{LAC4}::OCA_{T137E}-HA-T_{AgTEF}-P_{KIGAL80}::LAC4; (pLI-1)_n</i>	CA _{T137E} -HA	Diese Arbeit
VAK1047	VAK556	<i>MATa; ura3-20; metA1-1; P_{LAC4}-OPR8-oCA_{T137E}-HA-T_{AgTEF}-P_{KIGAL80}::LAC4</i>	PR8-CA _{T137E} -HA	Diese Arbeit

2.1.4. *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Tabelle 4: Übersicht des verwendeten *S. cerevisiae*-Stammes und dessen Genotyp.

Stammbezeichnung	relevanter Genotyp	Referenz
W303-1a	<i>MATa ura3-1 leu2-3, -112 his3-11,-15 trp1-1, ade2-1, can100-1</i>	R. Rothstein

2.1.5. *Escherichia coli*-Stämme

Tabelle 5: Übersicht der *E. coli*-Stämme und deren Genotyp.

Stammnummer	relevanter Genotyp	Referenz
TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1 araD139</i> Δ (<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Life Technologies
Rosetta (DE3) pLysS	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB- mB-) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysSRARE (CamR)	Novagen

2.1.6. Zelllinien

Tabelle 6: Übersicht der Zelllinien und des verwendeten Kulturmediums.

Zelllinie	Medien	Referenz
DF-1	DMEM mit 4,5 g/l Glukose; 10 % FBS (Mediatech); 100 U/ml Penicillin; 100 μ g/ml Streptomycin	[118]
MDCK II	1x MEM; 2 mM L-Glutamin; 100 U/ml Penicillin; 100 μ g/ml Streptomycin; 10 % FBS (PAN Biotech)	ATCC CRL-2936

2.1.7. Oligonukleotide

Tabelle 7: Übersicht der genutzten Oligonukleotide. Für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstellen sind in der Sequenz unterstrichen.

Name	Sequenz	Beschreibung
MCS Klp3-I	TCGACGGCGCGCCTCTAGACCCGGGTGCCAGCGGCCGCC	Insertion der MCS in Klp3
MCS Klp3-II	TCGAGGCGGCCGCTGGCCACCCGGGTCTAGAGGCGCGCCG	Insertion der MCS in Klp3
IBDV_Aspl_fwd	<u>GGCGCGCCG</u> ATGACAAACCTGCAAGATC	Klonierung von VP2 in Klp3-MCS
VP2_NotI_rev	ATAAGAAT <u>GCGGCCGCT</u> CACACAGCTATCCTCCTTATG	Klonierung von VP2 in Klp3-MCS
IBDV-S:T_Aspl_fwd	<u>GGCGCGCCG</u> ATGTCTAACCTGCAAGATCAAACCA	Klonierung von VP2 _{T2S} in Klp3-MCS
VP2-HA_NotI_rev	ATAAGAAT <u>GCGGCCGCT</u> CAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTAT GGGTACACAGCTATCCTCCTTATG	Klonierung von VP2 _{T2S} -HA-Tag in Klp3-MCS
VP2-T2S_XhoI_fwd	<u>CTCGAGATGTCTAACCTGCAAGATCA</u>	Klonierung von VP2 _{T2S} für pPGK
VP2_XbaI_rev	<u>TCTAGATCACACAGCTATCCTCCTTA</u>	Klonierung von VP2 _{T2S} für pPGK
ALG9-F	ATACTGCGAGGGCGTTATTG	Kontrollgen für qPCR (KIGAL4-Kopien)
ALG9-R	ACACTGGCATGAAACCATCC	Kontrollgen für qPCR (KIGAL4-Kopien)
GAL4qRT-3_fwd	TACACGGGATCTACCAAC	qPCR für KIGAL4-Kopien
GAL4qRT-3_rev	CAATAATGAGGGCCTCCAG	qPCR für KIGAL4-Kopien
KL-ACT1-Int-fwd	TTGTCCGCGACAGGACTTTTATG	RT-PCR für URP
KL-ACT1-Int-rev	TACCGACGATGGATGGGAAGAC	RT-PCR für URP
KL-HAC1-fwd2	ACCGCATGGAATGGTAACTG	RT-PCR für URP
KL-HAC1-rev2	CGTCAAAGTCCACGGCTAAC	RT-PCR für URP

CA-HA_Sall_fwd	<u>GTCGAC</u> ATGAAGGCCATCTTGGTAGT	Klonierung von CA-HA in Klp3
CA-HA_XhoI_rev	<u>CTCGAG</u> TCAGATGCAAATTCTACATT	Klonierung von CA-HA in Klp3
CA_T137E-HA_fwd	TCTTCCCAAAGAATCCTCTTGGCCAAATC	Austausch der T ₁₃₇ nach E in CA-HA
CA-HA_T137E_rev	GATTTGGCCAAGAGGATTCTTTGGGAAGA	Austausch der T ₁₃₇ nach E in CA-HA
PR8-CA-HA-Fus_fwd	GTCGACATGAAGGCCAACTTGTAGTATTATTGTGTGCT TTAGCCGCTGCCGACGCCGACACTTGTGTATCGGTTA	Klonierung von PR8-CA-HA in Klp3
PR8-HA_NdeI_fwd	<u>CATATG</u> AAGGCCAACTTGTAGT	Klonierung von PR8-HA in pET21b
PR8-HA_NotI_rev	<u>GCGGCCG</u> GATGCAGATTCTACATTGTA	Klonierung von PR8-HA in pET21b

2.1.8. Plasmide

Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Vektoren und Plasmide. Aufgelistet sind Plasmidname, der Ausgangsvektor, sowie das klonierte Insert mit den relevanten Restriktionsschnittstellen.

Plasmidname	Ausgangsvektor (Restriktion)	Kloniertes Insert	Referenz/Quelle
pJET1.2			Thermo Scientific [104]
Klp3			
Klp3-MCS	Klp3	<i>Multiple cloning site</i>	Diese Arbeit
Klp3-MCS_VP2	Klp3-MCS, <i>Ascl</i> und <i>NotI</i>	<i>Ascl</i> -VP2- <i>NotI</i>	Diese Arbeit
Klp3-MCS_VP2 _{T25}	Klp3-MCS, <i>Ascl</i> und <i>NotI</i>	<i>Ascl</i> -VP2 _{T25} - <i>NotI</i>	Diese Arbeit
Klp3-MCS_VP2 _{T25} -HA	Klp3-MCS, <i>Ascl</i> und <i>NotI</i>	<i>Ascl</i> -VP2 _{T25} -1xHA- <i>NotI</i>	Diese Arbeit
pD802			[107]
pLI1			[119]
oVP2 _{T25} _pMA-T		<i>Ascl</i> -oVP2 _{T25} - <i>NotI</i>	Diese Arbeit
Klp3-MCS_oVP2 _{T25}	Klp3-MCS, <i>Ascl</i> und <i>NotI</i>	<i>Ascl</i> -oVP2 _{T25} - <i>NotI</i>	Diese Arbeit
pTS32x			[120]
pTS32x_ADH1-P_VP2 _{T25}	pTS32x	<i>Ascl</i> -P _{ADH1} -VP2 _{T25} - <i>NotI</i>	Diese Arbeit
pPGK			Frank Breinig (Uni. D. Saarlandes)
pPGK_VP2 _{T25}	pPGK, <i>XhoI</i> und <i>XbaI</i>	<i>XhoI</i> -VP2 _{T25} - <i>NotI</i>	Diese Arbeit
Klp3_PR8-HA	Klp3, <i>Sall</i>	<i>Sall</i> -PR8-HA- <i>XhoI</i>	Osita Onuma
Klp3_CA-HA	Klp3, <i>Sall</i>	<i>Sall</i> -CA-HA- <i>XhoI</i>	Osita Onuma
Klp3_CA _{T137E} -HA	Klp3, <i>Sall</i>	<i>Sall</i> -CA _{T137E} -HA- <i>XhoI</i>	Diese Arbeit
Klp3_PR8-CA _{T137E} -HA	Klp3, <i>Sall</i>	<i>Sall</i> -PR8-CA _{T137E} -HA- <i>XhoI</i>	Diese Arbeit
pET21_PR8-HA	pET21	<i>NdeI</i> -PR8-HA- <i>NotI</i>	Diese Arbeit
pET21_PR8-HA'(330)	pET21	<i>NdeI</i> -PR8-HA'(330)- <i>NotI</i>	Diese Arbeit

2.1.9. Antikörper

Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Antikörper und Seren.

Bezeichnung	Zielepitop	Konjugat	Wirt	Anwendung	Referenz/Hersteller
anti-IBDV Antiserum	IBDV-VP2, -VP3, -VP4	---	Kaninchen (p)	WB, EM	[121]
anti-VP2 AK (R63)	VP2	---	Maus (m)	ELISA	[122]
anti-mouse-HRP AK	IgG (H+L)	HRP	Ziege (p)	WB	Jackson Immuno Research
anti-mouse-HRP AK	IgG (ganzes Molekül)	HRP	Ziege (p)	ELISA	Sigma Aldrich
anti-rabbit-HRP AK	IgG (H+L)	HRP	Ziege (p)	WB	Jackson Immuno Research
anti-HA-Tag AK	HA-Tag	---	Maus (m)	IF	Santa Cruz Biotechn.

anti-mouse-Alexa555 AK	IgG (H+L)	Alexa Fluor® 555	Ziege (p)	IF	Inc. Invitrogen
anti-rabbit-10 nm Gold AK	IgG	10 nm Gold	Ziege (p)	EM	Sigma Aldrich
anti-H7 AK	H7	---	Maus (m)	WB	Egbert Mundt, UGA
CM1-1-Hybridomazelllinie	PR8-HA-Peptid (SFERFEIFPKE)	---	Maus (m)	WB, IF	Wistar Institute Collection, Camden, NJ
H37-66-Hybridomazelllinie	H1	---	Maus (m)	VN	Wistar Institute Collection, Camden, NJ
anti-HA-(A/California/04/2009)	H1	---	Maus (m)	WB	Sino Biological Inc.

HRP: Merrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*); H+L: schwere (*heavy*) und leichte (*light*) Antikörperketten

(m) monoklonal; (p) polyklonal

WB: Western Blot; IF: Immunfluoreszenz, EM: Elektronenmikroskopie; VN: Virusneutralisationsassay

2.1.10. Kulturbedingungen und Medien für die Anzucht von Hefen und *E. coli*

K. lactis und *S. cerevisiae*:

Minimalmedium (YNB): 0,81 % *yeast nitrogen base* (YNB) ohne Aminosäuren und Nukleotide; 11,2 mg/l Adenin; 14,4 mg/l Tyrosin; 38,4 mg/l Uracil; 38,4 mg/l Histidin; 38,4 mg/l Tryptophan; 38,4 mg/l Arginin; 38,4 mg/l Methionin; 48 mg/l Phenylalanin; 57,7 mg/l Leucin; 57,7 mg/l Isoleucin; 57,7 mg/l Valin; 57,7 mg/l

Vollmedium (YEP): 2 % Pepton, 1 % Hefeextrakt

Zusätze:
Für Nährplatten: 2 % Agar-Agar
Als Kohlenstoffquelle: 2 % Glukose; 2 % Laktose; 2 % Galaktose
Für X-Gal-Platten: 4 µg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal)
Für FOA-Platten: 1,5 mg/ml 5-Fluororotsäure

E. coli:

Vollmedium (LB): 1 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 0,5 % Natriumchlorid

Plasmidselektion: Vollmedium (LB); 100 mg/l Ampicillin (Amp)

Für Nährplatten: 2 % Agar-Agar

2.1.11. Zellkultur von DF1 und MDCK II

Die Kultivierung der beiden Zelllinien DF1 und MDCK II erfolgte im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ (v/v). DF1-Zellen wurden routinemäßig in T-75 cm² Zellkulturflaschen mit 15 ml ZB9-Medium (DMEM mit 4,5 g/l Glukose; 10 % FBS; 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin) kultiviert. Bei einer Konfluenz von ca. 90 % wurden diese passagiert. Dafür wurde das überständige Medium abgenommen und die adhärent wachsenden Zellen mit 3 ml Trypsin/EDTA abgelöst. Nach zweiminütiger Inkubation im Brutschrank wurden 3 ml ZB9 hinzugefügt und je 2 ml der Zellsuspension (Verhältnis 1:3) in neue Zellkulturflaschen mit 13 ml ZB9 überführt.

MDCK II wurden routinemäßig in T-150 cm² Zellkulturflaschen mit 25 ml Medium (1x MEM; 2 mM L-Glutamin; 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin; 10 % FBS) kultiviert. Zum Passagieren wurde das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 3 ml Trypsin/EDTA hinzugegeben, für 5 min im Brutschrank inkubiert und der Überstand verworfen. Das Ablösen der Zellen erfolgte schließlich mit 5 ml Trypsin/EDTA für ca. 15 min im Inkubator. Die Zellen wurden schließlich im Verhältnis von 1:2 bis 1:8 erneut ausgesät.

Tabelle 10: Übersicht der Puffer und Medien zur Kultivierung von MDCK- und DF1-Zellen.

Medium	Zusammensetzung
PBS	1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat pH 7,2; 137 mM Natriumchlorid; 2,7 mM Kaliumchlorid; 2,6 mM Dinatriumhydrogenphosphat
Trypsin/EDTA	0,25 % Trypsin; 1 mM EDTA
2x Overlay-Medium	2x MEM; 40 mM HEPES; 4 mM L-Glutamin; 0,15 % Natriumcarbonat; 200 U/ml Penicillin; 200 µg/ml Streptomycin
Virustransportmedium (IBVD)	1x Minimum Essential Medium (MEM); 7,5 % NaHCO ₃ ; 15 mM HEPES; 1 % fetales Rinderserum; 4.000 U/ml Penicillin; 400 µg/ml Gentamicin; 8 µg/ml Amphotericin B; 4 mg/ml Streptomycin; 1 mg/ml Kanamycinsulfat

2.1.12. Puffer

Tabelle 11: Übersicht der verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung.

Puffer	Zusammensetzung
PLAG-Puffer	40 % PEG4000; 0,1 M Lithiumacetat; 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 15 % Glycerin
SORB-Puffer	100 mM Lithiumacetat; 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA/NaOH pH 8,0; 1 M Sorbitol
PEG	100 mM Lithiumacetat; 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA/NaOH pH 8,0; 40 % PEG3350
Aufschlusspuffer	2 % Triton X-100; 1 % SDS; 100 mM Natriumchlorid; 10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0
B60-Puffer	50 mM HEPES-KOH pH 7,3; 60 mM Kaliumacetat; 5 mM Magnesiumacetat; 0,1 % Triton X-100; 10 % Glycerin; 1 mM Natriumfluorid; 20 mM Glycerolphosphat; 10 mM Magnesiumchlorid; 1 mM DTT; Protease-Inhibitor: Complete (Roche)
Ladepuffer für SDS-PAGE (5x)	300 mM Tris/HCl pH 6,8; 10 % SDS; 50 % Glycerin; 25 % β-Mercaptoethanol; 0,05 % Bromphenolblau
Laufpuffer (SDS-PAGE)	192 mM Glycin; 25 mM Tris
PBS (Zellkultur)	1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat pH 7,2; 137 mM Natriumchlorid; 2,7 mM Kaliumchlorid; 2,6 mM Dinatriumhydrogenphosphat
Coomassie-Färbelösung	20 % Ethanol; 2 % Phosphorsäure; 10 % Diammoniumsulfat; 0,2 % Coomassie Brilliantblau G250
Kaliumphosphatpuffer	132 mM Di-Kaliumhydrogenphosphat; 875 mM Kaliumdihydrogenphosphat
Coomassie-Entfärbelösung	5 % Ethanol; 7,5 % Essigsäure
Transferpuffer	192 mM Glycin; 25 mM Tris; 20 % Methanol
TBST	20 mM Tris/HCl pH 7,6; 137 mM Natriumchlorid; 0,3 % Tween
Solubilisierungspuffer (BN)	50 mM Natriumchlorid; 50 mM Imidazol; 2 mM 6-Aminohexansäure; 1 mM EDTA pH 7,0
Kathoden-Puffer B (BN)	50 mM Tricin; 7,5 mM Imidazol; 0,02 % Coomassie Brilliantblau G250 pH 7,0
Kathoden-Puffer B/10 (BN)	50 mM Tricin; 7,5 mM Imidazol; 0,002 % Coomassie Brilliantblau G250 pH 7,0
Anoden-Puffer (BN)	25 mM Imidazol/HCl pH 7,0
Sorbitol-Puffer	50 mM HEPES; 1 M Sorbitol
Zymolyase-Puffer	50 mM HEPES; 1 M Sorbitol; 100 µg/ml Zymolyase; 10 mM DTT

Lysispuffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM Natriumchlorid; 20 mM Calciumchlorid; 1 mM EDTA
PES-Puffer (SVP)	25 mM PIPES pH 6,5; 150 mM Natriumchlorid; 20 mM Calciumchlorid
ER-Puffer I	100 mM Tris/HCl pH 9,4; 10 mM DTT
ER-Puffer II	10 mM Tris/HCl pH 7,4; 700 mM Sorbitol; 1,5 % Pepton; 0,75 % Hefeextrakt; 0,5 % Glukose
ER-Puffer III	20 mM HEPES pH 7,4; 700 mM Sorbitol; 50 mM Kaliumacetat
ER-Puffer IV	20 mM HEPES pH 7,4; 100 mM Sorbitol; 50 mM Kaliumacetat
ELISA-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0; 0,14 M Natriumchlorid; 1 % FCS
TPCK-Trypsin	1 mg/ml TPCK-Trypsin/PBS
2x Kristallviolett	1,3 g/l Kristallviolett; 10 % Formaldehyd; 5 % Methanol

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Standardmethoden (Klonierungen)

Alle Klonierungen von Plasmiden erfolgten nach folgendem Ablaufplan:

Zuerst erfolgte eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) um das zu klonierende DNA-Fragment zu amplifizieren. Hierfür wurden folgende Polymerasen entsprechend den Empfehlungen des Herstellers verwendet:

- Fast-Start *Taq* (Roche)
- Pfu-Polymerase (Thermo Scientific)
- Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific)

Die verwendeten Primer für die PCRs wurden mit der Software *Clone Manager Professional 9* (Sci-Ed) designt und von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert. Anschließend wurde der PCR-Ansatz zur Überprüfung und Reinigung auf ein Agarosegel aufgetragen. In Abhängigkeit von der zu erwartenden Molekülgröße wurde ein 0,8 % oder 2 % Agarose-Gel verwendet und die Elektrophorese erfolgte bei 80 bzw. 120 V. Als Größenstandard diente der GeneRuler™ DNA-Ladder Mix (Thermo Scientific).

Nach der Elektrophorese wurde das entsprechende Fragment ausgeschnitten und die DNA mit Kits von QIAGEN (QIAEX II) oder Zymo Research (Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit) entsprechend den Empfehlungen der Hersteller eluiert.

Nach der Elution erfolgte eine Zwischenklonierung mit Hilfe des CloneJET PCR Cloning Kits (Thermo Scientific) entsprechend den Herstellerangaben. Der Ligationsansatz wurde in chemisch kompetente TOP10-Zellen transformiert, die nach dem Protokoll von Inoue *et al.* hergestellt wurden [123]. Der Ansatz wurde auf LB-Amp Nährmediumsplatten gebracht und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) bzw. für größere Mengen das QIAGEN Plasmid Midi Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die Konzentrationsbestimmung der isolierten Plasmide erfolgte mittels Nanophotometer.

Um Mutationen bei der Klonierung auszuschließen, wurde die Plasmid-DNA sequenziert (vgl. 2.2.2). Danach wurde das entsprechende DNA-Fragment aus dem pJET1.2-Vektor bzw. der Zielvektor mit

Restriktionsenzymen (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers hydrolysiert. Für die Entfernung der 5' Phosphat-Enden des linearisierten Zielvektors wurde dieser mit Alkalische Phosphatase (FastAP, Thermo Scientific) behandelt. Die Enzyme wurden anschließend hitzeinaktiviert.

Für die finale Ligation wurde ein Vektor-Insert-Verhältnis von 1:3 gewählt. Die Ligation erfolgte mit T4-DNA-Ligase (Thermo Scientific) über Nacht bei 16 °C. Anschließend wurde der Ligationsansatz in TOP10 transformiert und die Plasmide anschließend aus *E. coli* präpariert. Zur Überprüfung der Klonierung wurden Testrestriktionsverdau oder Kontroll-PCRs durchgeführt.

2.2.2. Sequenzierung

Sequenzierungen von Plasmid-DNA erfolgten mit Hilfe des BigDye® Terminator DNA-Sequenzierungskits (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben, wobei 500 ng DNA eingesetzt wurden. Die Amplifikation und Markierung der DNA erfolgte in einem Thermocycler mit folgendem Programm: 95 °C 5 min; 40x (95 °C 45 s; 55 °C 45 s; 60 °C 4 min); 10 °C ∞.

Anschließend wurden zum Reaktionsansatz 80 µl dest. Wasser und 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,8) hinzugegeben. Die DNA wurde mit 250 µl Ethanol (96 %) präzipitiert und 20 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Nach zwei Waschschritten mit 1 ml 70 %igen Ethanol wurde das Pellet bei 50 °C getrocknet und mit einem ABI Prism™ 377 DNA Sequenzer (Perkin Elmer) analysiert.

2.2.3. Transformation von *K. lactis*

Die Transformationsmethode von *K. lactis*-Zellen basierte auf dem Protokoll von Akada *et al.* [124]. Hierfür wurde eine 50 ml-Zellkultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 in 2 % Glukose YEP-Medium angezogen. Die pelletierten Zellen wurden anschließend in 2 ml PLAG-Puffer aufgenommen und mit 250 µl *E. coli*-RNA (10 mg/ml) versetzt. Schließlich wurden die Hefen in 200 µl-Aliquot schrittweise eingefroren (-20 °C, -70 °C) und bei -70 °C bis zur Transformation gelagert.

Für eine genomische Integration von DNA-Fragmenten wurden 5 µg gespaltenes Plasmid eingesetzt. Ein Zellaliquot wurde dafür zunächst aufgetaut und mit der Fremd-DNA 1,5 h bei 37 °C und 30 min bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurden die Hefen zur Regeneration auf 2 % Glukose YEP-Nährmediumsplatten kultiviert und erst am nächsten Tag auf Selektionsmedium replika-plattiert.

Bei einer Transformation von episomalen Plasmiden wurde 1 µg Plasmid-DNA transformiert und die Zellen wurden ohne Regenerationsschritt direkt auf Selektionsmedium gebracht.

2.2.4. Generierung von *K. lactis*-Stämmen

Zur Generierung eines Stammes wurde zunächst die kodierende Sequenz von einem Protein in den Klp3-MCS Vektor inseriert (Klp3-MCS_GOI). Das Plasmid Klp3-MCS_GOI (5 µg) wurde anschließend

mit *EcoRI* hydrolysiert und die DNA-Fragmente in den Stamm VAK556 (Laktose negativ) transformiert. Die Selektion von Laktose-positiven Hefen erfolgte auf Minimalmediumsplatten, welche mit 2 % Laktose als Kohlenstoffquelle versetzt waren. Nur bei homologer Rekombination mit dem 3' Ende des disruptierten *LAC4*-Gens kann eine aktive β -Galaktosidase gebildet werden und die Laktose assimiliert werden. Meist kommt es dabei zum Verlust des *ScURA3*-Markergens, welches im *LAC4*-Lokus des Stammes VAK556 angeordnet war. Das *URA3*-Gen kodiert für die Orotidin-5'-monophosphat-Decarboxylase, ein Enzym, das für die Biosynthese von Uracil essentiell ist. Somit können die gewünschten Rekombinanten anhand der Uracil-Auxotrophie identifiziert werden. Dafür wurde untersucht, ob die Laktose-positiven Hefen einen Wachstumsdefekt auf Minimalmedium ohne Zusatz von Uracil besitzen, jedoch in der Lage sind auf 5-FOA-Platten zu wachsen. Die Zellen, die das Enzym Orotidin-5'-monophosphat-Decarboxylase besitzen (*URA3*⁺), wandeln 5-FOA (5-Fluororotsäure) in das toxische Produkt 5-Fluorouracil um und sind nicht in der Lage zu wachsen. Die Rekombinanten wurden schließlich zum Nachweis des Fremdproteins im Western Blot untersucht.

2.2.5. Transformation von *S. cerevisiae*

S. cerevisiae-Zellen wurden nach Knop *et al.* für die Transformation vorbereitet und transformiert [125]. Hierbei wurde 1 μ g Plasmid-DNA eingesetzt und die Zellen wurden anschließend auf 2 % Glukose YNB-Nährmediumsplatten für 2-3 Tage bei 30 °C kultiviert.

2.2.6. Wachstumstest (Tropfentest)

Die zu untersuchenden Hefestämme wurden in 2 % Glukose YEP-Medium über Nacht angezogen. Anschließend wurden die Zellen in sterilem Wasser so verdünnt, dass eine OD₆₀₀ von 0,4 erreicht wurde. Davon ausgehend wurden weitere serielle 1:10 Verdünnungen (10⁻¹; 10⁻²; 10⁻³) hergestellt und jeweils 3-5 μ l auf entsprechende Nährmediumsplatten getropft. Die Platten wurden schließlich für zwei bis fünf Tage bei 30 °C kultiviert.

2.2.7. Isolation von chromosomaler DNA aus *K. lactis*

Chromosomale DNA aus *K. lactis*-Zellen wurde nach einem Protokoll aus „Current Protocols of Molecular Biology“ isoliert [126]. Dafür wurden 5 ml einer Übernachtskultur zentrifugiert (4.000 rpm, 5 min) und das Zellpellet in 500 μ l Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 200 μ l Aufschlusspuffer resuspendiert und zusammen mit ca. 200 μ l Glycerperlen (Sartorius) und 200 μ l eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) für 5 min im Vibrax-Schüttler aufgeschlossen. Zum Abtrennen der Zelltrümmer wurden zunächst 200 μ l Wasser hinzugegeben und 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Präzipitation der DNA mit 1 ml 96 %igen Ethanol versetzt und nochmals für 3 min

bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde bei 50 °C getrocknet und anschließend in 400 µl dest. Wasser aufgenommen.

2.2.8. Isolation von Gesamt-RNA und RT-PCR

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurden Hefezellen sechs Stunden in 2 % Glukose bzw. 2 % Laktose YEP-Medium angezogen. Für die Behandlung mit Tunicamycin wurde nach vier Stunden das Tunicamycin (5 µg/ml Kultur) hinzugegeben und die Zellen für weitere zwei Stunden kultiviert. Ca. 20 ODE der Kulturen wurden vor dem Pelletieren auf Eis abgekühlt und anschließend 5 min bei 4.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die RNA-Extraktion erfolgte mit dem *Universal RNA Purification Kit* (EUR_x, Roboclon) nach Herstellerangaben, wobei das getrocknete RNA-Pellet in 50 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen wurde. Da die Hydrolyse von DNA mit *DNase I* auf der Säule in Vorversuchen nicht vollständig war, erfolgte diese in Abweichung vom Protokoll erst nach der RNA-Isolation. Dafür wurden 30 µl RNA-Probe mit 14 µl RNase-freiem Wasser, 5 µl *Incubation Buffer* (Roche) und 1 µl *DNase I (recombinant, RNase-free)* (Roche) versetzt und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die *DNase I* für 10 min bei 70 °C inaktiviert und die RNA-Konzentration mittels Nanophotometer bestimmt. Die reverse Transkription erfolgte mit dem *RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Scientific) und Oligo (dT)₁₈-Primern nach Herstellerangaben. Hierfür wurde 1 µg RNA eingesetzt. Um DNA-Verunreinigungen auszuschließen, erfolgte jeweils eine Kontrollreaktion ohne Zugabe von Reverser Transkriptase. Die finale PCR-Reaktion erfolgte mit 1 µl cDNA bzw. dem Kontrollansatz ohne Reverser Transkriptase und *Fast-Start Taq* (Roche) nach Standardprotokoll.

2.2.9. Real time PCR zur Bestimmung der *KIGAL4*-Kopienzahl

Für die Bestimmung, wie viele *KIGAL4*-Genkopien nach genomischer Integration des pLI1-Plasmids in den generierten Stämmen vorhanden waren, erfolgte eine quantitative PCR (qPCR) an genomischer DNA. Dabei wurde im Gegensatz zur einfachen PCR ein Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green) zum Reaktionsansatz hinzugefügt. Dieser interkaliert in doppelsträngige DNA, wodurch nach jedem PCR-Zyklus eine relative Quantifizierung der DNA-Menge ermöglicht wurde. Hierfür wurden die Ct-Werte (engl. *cycle threshold*; Schwellenwert-Zyklus) von zwei PCR-Fragmenten (*KIGAL4* und Referenzgen) für jeden Stamm bestimmt. Der Ct-Wert beschreibt dabei den Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal aufgrund der zunehmenden PCR-Produkte exponentiell über das Hintergrundsignal ansteigt. Ebenfalls wurde die Effizienz (Verdopplungsrate) der PCR-Reaktionen bestimmt, die im Idealfall einem Wert von 2 entspricht.

Zunächst wurde die chromosomale DNA aus Hefe-Zellen isoliert (vgl. 2.2.7) und die Konzentration auf 15 ng/µl eingestellt. Die qPCR erfolgte für *KIGAL4* mit dem Primerpaar GAL4qRT-3_fwd und GAL4qRT-3_rev. Außerdem wurde ein Fragment des *ALG9*-Gens mit den Primern ALG9-F und ALG9-R

amplifiziert, das als Referenzwert genutzt wurde. Beide Primerpaare hatten in etwa gleiche Effizienzen (ALG9: 1,894; GAL4-3: 1,906), die mit dem Programm LinRegPCR bestimmt wurden [127].

Der PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 5 µl 2x iQ™ SYBR® Green Supermix (Biorad)
- 1 µl Primer I (0,3 µM)
- 1 µl Primer II (0,3 µM)
- 1 µl genomische DNA (15 ng/µl)
- 2 µl Wasser

Die Reaktionen erfolgten in Tripletts mittels MyiQ™2 *Real-Time PCR Detection System* (BioRad) und folgendem PCR-Programm inklusive Schmelzkurve (melt curve):

Tabelle 12: Reaktionsprogramm der qPCR an genomischer DNA mit dem MyiQ™2 *Real-Time PCR Detection System* (Biorad).

<i>Cycle</i>	<i>Repeats</i>	<i>Step</i>	<i>Dwell Time</i>	<i>Hold</i>	<i>Setpoint</i>	<i>PCR/Melt Data</i>	<i>Temp. Change</i>	<i>End Temp.</i>
1	1							
		1	10:00 min		95,0 °C			
2	40							
		1	0:15 min		95,0 °C			
		2	0:15 min		55,0 °C			
		3	0:30 min		72,0 °C	<i>real time</i>		
3	81							
		1	0:15 min		50,0 °C	<i>melt curve</i>	0,5 °C	90,0 °C
4	1							
	1			x	12,0 °C			

Da das *ALG9*-Gen nur einmal im *K. lactis*-Genom vorkommt und bei der qPCR für jede Probe die gleichen DNA-Mengen eingesetzt wurden, konnte aus den Ct-Werten die *KIGAL4*-Kopienzahl bestimmt werden. Zur Auswertung wurden die Ct-Werte der Tripletts einer Probe gemittelt und die *KIGAL4*-Kopien mittels folgender Gleichungen bestimmt.

$$(A) \Delta Ct(ALG9) = Ct(VAK556) - Ct(P)$$

$$(B) \Delta Ct(KIGAL4) = Ct(VAK556) - Ct(P)$$

$$(C) R = E(KIGAL4)^{\Delta Ct(KIGAL4)} / E(ALG9)^{\Delta Ct(ALG9)}$$

Ct *cycle threshold*

ΔCt Differenz der Ct-Werte aus Referenzstamm [Ct(VAK556)] und zu untersuchendem Stamm [Ct(P)]

R Quotient ΔCt -Werte des Zielgens *KIGAL4* und des Referenzgens *ALG9*

K Kontrollstamm VAK556

P zu untersuchender Stamm

E PCR-Effizienz

Aus drei unabhängigen Messungen wurden die Werte schließlich gemittelt und die Standardabweichung bestimmt.

2.3. Proteinbiologische Methoden

2.3.1. Proteinextrakte aus Hefezellen für Western Analysen

Mindestens 30 ODE einer Kultur wurden 5 min bei 4.000 rpm zentrifugiert und einmal mit Wasser gewaschen. Das Zellpellet wurde in 400 µl B60-Puffer resuspendiert und zusammen mit ca. 300 µl Glasperlen viermal für 3 min im Vibrax-Schüttler aufgeschlossen. Anschließend wurde zur Abtrennung der Zelltrümmer bei 14.000 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Danach wurde der Extrakt nochmals bei 14.000 rpm 20 min lang zentrifugiert. Die Proteinkonzentration im Überstand (Proteinextrakt) wurde mittels der Methode nach Bradford (1976) bestimmt. Dies erfolgte nach Herstellerangaben mit „Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent“ (BioRad) bzw. Bradford-Reagenz (Thermo Scientific) und einer Standardreihe. Anschließend wurde der Proteinextrakt für die Auftrennung im SDS-Gel mit 5fach Ladepuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C denaturiert.

2.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel erfolgte nach dem Molekulargewicht mit Hilfe der Methode von Laemmli (1970). Die Gele wurden stets frisch in den Mini-PROTEAN-Apparaturen (BioRad) hergestellt und setzten sich aus einem Trenngel (375 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1 % SDS; 7-15 % PAA (Rotiphorese Gel 30 37,5:1 Acrylamid/Bisacrylamid); 0,17 % APS; 0,07 % TEMED) und einem Sammelgel (125 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,1 % SDS; 5 % PAA; 0,1 % APS; 0,05 % TEMED) zusammen. Die Proteinproben wurden zuvor mit 5fach Ladepuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C denaturiert (vgl.2.3.1). Anschließend wurden sie zusammen mit *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific) auf ein SDS-Gel aufgetragen und bei 200 V aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden entweder mit Hilfe der Western Analyse weiter untersucht (vgl. 2.3.3) oder mit dem Farbstoff Coomassie markiert. Hierfür wurde das SDS-Gel einmal in dest. Wasser geschwenkt und anschließend über Nacht in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Zum Entfärben des Hintergrundes wurde es zunächst mit dest. Wasser gewaschen und danach ca. 45 min in Coomassie-Entfärber geschwenkt.

2.3.3. Western Analyse

Mit Hilfe der Western Blot Analyse können Proteine spezifisch mit Immunglobulinen nachgewiesen werden. Dazu wurden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine (vgl. 2.3.2) auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (Immobilon P, Millipore) transferiert. Hierfür wurde das SDS-Gel und die PVDF-Membran zusammen mit 3MM Filterpapier (Whatman) in eine Klammer gespannt und in eine mit Transferpuffer gefüllte *Mini Trans-Blot Cell* (BioRad) platziert. Der Transfer erfolgte für 1 bis 1,5 h bei 110 V und 4 °C. Die Absättigung freier Bindestellen auf der Membran erfolgte für 1 h in 5 %

Milch/TBST. Für die Markierung der Proteine mit primären Antikörpern wurden diese entsprechend in 5 % Milch/TBST verdünnt und für mind. 1 h jedoch meist über Nacht bei 4 °C geschwenkt. Anschließend wurden ungebundene Immunglobuline in mindestens drei Waschschritten mit TBST entfernt. Der sekundäre Antikörper wurde ebenfalls in 5 % Milch/TBST verdünnt zu der Membran gegeben und für ca. 1 h schwenkend inkubiert. Danach wurde die Membran mindestens dreimal mit TBST gewaschen. Da die sekundären Antikörper HRP-konjugiert waren, erfolgte der Nachweis mittels *ECL Plus Western Detection System* (GE Healthcare) und *X-ray* Filmen (CIA) im Dunkeln oder aber mit einer Diaminobenzidin/Nickelchlorid-Färbelösung (100 mM Tris/HCl pH 7,5; 4 mg/ml Diaminobenzidin; 2 mg/ml Nickelchlorid) bis Signale zu erkennen waren.

2.3.4. Nachweis von HA über *Blue Native*-Gelelektrophorese (BN)

Mit Hilfe der *Blue Native*-Gelelektrophorese können gefaltete Proteine in einem elektrischen Feld anhand ihrer Molekülgröße aufgetrennt werden, wodurch ein Nachweis von Oligomeren ermöglicht wird. In dieser Arbeit wurde sich an dem Protokoll von Wittig *et al.* orientiert [128].

Zellaufschluss und Solubilisierung von Hämagglutinin: Ca. 200 ODE einer Hefekultur wurden bei 4.000 rpm für 5 min pelletiert und einmal mit Wasser gewaschen. Das Zellpellet wurde in 3 ml Lysispuffer resuspendiert und je 600 µl wurden zusammen mit Glasperlen aliquotiert. Der Aufschluss erfolgte mittels Vibrax-Schüttler für viermal 3 min, wobei die Proben zwischendurch für 5 min auf Eis gekühlt wurden. Zur Abtrennung von großen Zellbestandteilen und nicht aufgebrochenen Zellen wurde der Extrakt 5 min bei 150 x g zentrifugiert und anschließend die Überstände vereinigt. Um Membranen zu pelletieren wurde der Extrakt anschließend für 40 min bei 21.000 x g zentrifugiert. Da Hämagglutinin ein Membranprotein ist, musste es vor der Elektrophorese aus diesen gelöst werden. Dazu wurde das Pellet in 220 µl Solubilisierungspuffer resuspendiert und 44 µl 1 %iges Lauryldimethylaminoxid (LDAO) dazu gegeben. Die Proben wurden 1 h bei RT inkubiert und anschließend für eine weitere Stunde bei 21.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 5 µl 50 %igem Glycerin und 1 µl 5 %igem Coomassie Brilliantblau G250 versetzt.

BN-Gelelektrophorese und Western Blot: Die nativen Gele für die Elektrophorese wurden in den Mini-PROTEAN-Apparaturen gegossen, aufgetrennt und transferiert. In Abweichung vom Protokoll wurde ein kontinuierliches Trenngel verwendet, bei dem die Acrylamid-Konzentration bei 7 % lag (25 mM Imidazol/HCl pH 7,0; 167 mM 6-Aminohexansäure; 7 % PAA; 0,067 % APS; 0,067 % TEMED). Darauf wurde ein Sammelgel geschichtet (25 mM Imidazol/HCl pH 7,0; 167 mM 6-Aminohexansäure; 3,5 % PAA; 0,084 % APS; 0,084 % TEMED). Die polymerisierten Gele wurden zusammen mit Anoden-Puffer und Kathoden-Puffer B in die Apparaturen eingespannt. Es wurden 4 µl Probe aufgetragen und die Elektrophorese erfolgte zunächst bei 100 V und 4 °C. Als die Lauffront 1/3 des Gels

durchlaufen hatte, wurde der Kathoden-Puffer B gegen Kathoden-Puffer B/10 ausgetauscht und die Elektrophorese fortgesetzt. Nachdem die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte, wurden die aufgetrennten Proteine mittels Western Blot analysiert. Dies erfolgte wie unter 2.3.3 beschrieben, außer das nach dem Proteintransfer die Membran zum Entfärben des Coomassie-Farbstoffes die Membran kurz in Methanol geschwenkt wurde, bevor sie mit 5 % Milch/TBST blockiert wurde.

2.3.5. Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz diente der Lokalisierung von Fremdprotein in der Hefezelle. Zur Fixierung der Proteine und Aufrechterhaltung der Zellstruktur wurden die zu untersuchenden Hefen mit 5 % Formaldehyd versetzt und für 3 h bei 30 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 4.000 rpm für 1 min zentrifugiert, einmal in Sorbitol-Puffer gewaschen und schließlich über Nacht in Sorbitol-Puffer bei 4 °C gelagert. Am Folgetag wurden die Glukane der Zellwände mittels Zymolyase-Puffer für 45 min bei 37 °C hydrolysiert. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, wurde nach einem Waschschrift (Sorbitol-Puffer) mit 3 % BSA/PBS für 30 min bei RT blockiert. Anschließend wurden die Zellen mit den primären Antikörpern (1:50 Verdünnung für anti-HA-Tag AK bzw. 1:25 für CM1-1 in 3 % BSA/PBS) für 90 min bei RT inkubiert. Nach viermaligen Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1:500 anti-mouse-Alexa555 AK in 3 % BSA/PBS) für eine Stunde bei RT im Dunkeln. Schließlich wurden die Hefen erneut viermal mit PBS gewaschen. Die Markierung der DNA zur Lokalisierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (1 µg/ml) für weitere 10 min bei RT im Dunkeln. Nach einem letzten Waschschrift mit PBS wurde die Suspension auf einen Objektträger gebracht und zusammen mit einem Deckgläschen mit Nagellack versiegelt. Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten an einem Axioskop mit CCD-Kamera (Photometrix).

2.3.6. Aufreinigung von IBDV-VP2 aus Hefezellen

Für die Aufreinigung von subviralen Partikeln aus Hefezellen wurde sich an den Arbeiten von Caston *et al.*, Garriga *et al.* sowie Pous *et al.* orientiert [129];[130];[131].

Zunächst wurden 400 ml 2 % Laktose-Vollmedium mit einer Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 30 °C angezogen. Die Zellen wurden bei 2.000 x g für 5 min zentrifugiert und das Pellet einmal mit Wasser und ein weiteres Mal mit 1 M Sorbitol-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 5 ml Lysispuffer resuspendiert und je 700 µl wurden zusammen mit Glasperlen (ca. 300 µl) aliquotiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Vibrax-Schüttler für viermal 3 min, wobei die Proben zwischendurch für 5 min auf Eis gekühlt wurden. Zum Abtrennen der Zelltrümmer wurde anschließend zentrifugiert (16.000 x g, 5 min und 4 °C) und die Überstände aus den einzelnen Aliquot vereinigt. Das Lysat wurde nochmals zentrifugiert (10.000 x g, 1 h, 4 °C) und mit gleichem Volumen des organischen Lösungsmittels Vertrel® XF (Dupont de Nemours) versetzt. Danach wurde der Ansatz 2 min homogenisiert und für 2 min bei 2.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand (ca. 7,5 ml)

wurde nochmals mit Vertrel® XF extrahiert und anschließend auf 4,5 ml Saccharose/PES-Puffer geschichtet. Die Auftrennung der Proteine durch das Saccharose-Kissen erfolgte bei 170.000 x g für 3 h bei 4 °C. Vom Saccharose-Kissen wurden 1 ml-Fractionen mit einer Pipette von oben abgenommen, wobei das Pellet in der letzten Fraktion resuspendiert wurde. Für die Ausbildung des Saccharose-Gradienten wurden je 4 ml 18 %, 36 % und 54 % Saccharose/PES-Lösungen in einem Röhrchen untereinander geschichtet und dieses waagrecht für 3 h bei 4 °C gelagert. Anschließend wurde der Gradient vorsichtig aufgerichtet und mit der Pellet-Fraktion des Saccharose-Kissens überschichtet. Der darauf folgende Zentrifugationsschritt erfolgte bei 4 °C für 18 h und 115.000 x g. Geerntet wurde der Gradient in 700 µl-Fractionen. Die Dichte der einzelnen Fractionen wurde mit einem Refraktometer bestimmt und weitere Untersuchungen erfolgten mittels Western Blot Analyse und Elektronenmikroskopie.

2.3.7. Elektronenmikroskopie

Um das gereinigte VP2-Protein hinsichtlich möglicher Kapsidstrukturen untersuchen zu können, wurden die Fractionen des Saccharose-Gradienten (vgl. 2.3.6) elektronenmikroskopisch untersucht. Dafür wurden die Proben an Dr. Dr. Gerd Hause (MLU Halle-Wittenberg) übergeben, der diese teilweise immunogold-markiert im Negativkontrast analysierte. Dafür wurden 3 µl Probe auf Kupfer- oder Nickel-Grids mit einer Kohlenstoff/Formvarbeschichtung getropft, 1 min inkubiert und dreimal mit bidest. Wasser gewaschen. Für die Immunogold-Markierung wurde der Grid mit anti-IBDV Antiserum (1:7.500) in PBS (versetzt mit 1 % acetyliertem BSA und 0,1 % Tween) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgten vier 15-minütige Waschschrte mit PBS-Puffer und eine Inkubation mit anti-rabbit-10 nm Gold AK (1:100 in PBS-Puffer) für 90 min bei RT. Danach wurden vier 5-minütige Waschschrte mit bidest. Wasser durchgeführt. Anschließend wurden die Grids auf einer 1 %igen Uranylacetat-Lösung platziert, für 25 s inkubiert und schließlich bei 37 °C getrocknet. Die Aufnahmen erfolgten mit einem EM 900 Elektronenmikroskop (Zeiss).

2.3.8. Expression von PR8-HA in *E. coli*

Für die Gewinnung von rekombinantem HA-Protein aus *E. coli*-Zellen wurden kompetente Rosetta (DE3) pLysS mit den Plasmiden pET21_PR8-HA bzw. pET21_PR8-HA'(330) transformiert. Die Anzucht erfolgte in 25 ml LB-Medium (mit Ampicillin), das mit einer Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft und anschließend bei 37 °C auf einem Schüttler kultiviert wurde. Nachdem die Kultur eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht hatte, wurde mit 1 mM IPTG die Expression des HA-Gens induziert. Nach drei Stunden wurden die Kolben zunächst für 5 min auf Eis abgekühlt und anschließend die Zellen bei 5.000 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit 20 mM Tris/HCl pH 8,0-Lösung gewaschen und bis zum Zellaufschluss bei -70 °C gelagert.

Für den Zellaufschluss wurde das Pellet in 10 ml PBS resuspendiert und die Zellen mittels Ultraschall lysiert. Dafür wurden die Proben auf Eis zweimal für 45 s bei einer Amplitude von 40 % beschallt, wobei dazwischen 2 min pausiert wurde. Von dem Lysat wurde 1 ml abgenommen und für 10 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde zur weiteren Analyse zusammen mit 5fach Ladepuffer für 10 min bei 95 °C denaturiert. Das Pellet wurde mit PBS gewaschen und in 200 µl 1x Ladepuffer/PBS resuspendiert und ebenfalls für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Analyse der Proben erfolgte mittels Coomassie-gefärbten SDS-Gelen und Western Analysen.

2.3.9. Isolierung von ER-Membranen

Zur genaueren Lokalisierung von HA in der Hefezelle wurden die endoplasmatischen Membranen von *K. lactis*-Zellen mittels differentieller Zentrifugation isoliert. Dafür wurde ein Protokoll verwendet, das auf der Arbeit von Wuestehube und Schekman basiert [132]. Ca. 800 ODE einer unter induzierten Bedingungen gewachsenen Hefekultur wurden für 5 min bei 4.000 rpm zentrifugiert, in 10 ml ER-Puffer I resuspendiert und für 10 min bei 25 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut für 5 min bei 4.000 rpm sedimentiert und in 10 ml ER-Puffer II aufgenommen. Um Spheroblasten zu erhalten wurden 65 µl Zymolyase (10 mg/ml) und 50 µl β-Mercaptoethanol hinzugegeben und der Ansatz für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Spheroblasten bei 3.500 rpm für 10 min sedimentiert und zweimal mit ER-Puffer III gewaschen. Das Hefepellet wurde dann in 0,5 ml ER-Puffer III resuspendiert und 10 ml eiskalter ER-Puffer IV hinzugefügt. Durch sorgfältiges Homogenisieren und einer Inkubation von 10 min bei -20 °C wurden die Zellen lysiert. Für die Abtrennung größerer Zellbestandteile wurde anschließend bei 2.000 rpm für 5 min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann 10 min bei 27.000 x g und 4 °C nochmals zentrifugiert und das Pellet in 0,3 ml ER-Puffer IV resuspendiert. Die Suspension wurde schließlich auf ein Saccharose-Kissen (0,4 ml 1,5 M Saccharose/ER-Puffer IV und 0,4 ml 1,2 M Saccharose/ER-Puffer IV) geschichtet und für 1 h bei 105.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Danach wurden vier in etwa gleich große Fraktionen mit einer Pipette von oben abgenommen.

Zur Solubilisierung der Membranproteine wurden jeweils 50 µl der Saccharose-Fractionen mit 0,4 % Decyl-β-D-Maltopyranosid (DDM) und 0,16 % Cholesterylhemisuccinat (CHS) versetzt und 1 h bei 4 °C auf einem Rotator inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 5fach Ladepuffer versetzt und die Proteine für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Analyse erfolgte im Western Blot.

2.3.10. Deglykosylierung von Hämagglutinin

Die Deglykosylierung von HA erfolgte mit dem Enzym PNGase F (NEB). Hierfür wurden 0,5 ODE einer Hefe-Kultur bei 8.000 rpm für 2 min zentrifugiert und das Pellet nach einem Waschschrift mit Wasser in 9 µl dest. Wasser aufgenommen. Zu der Suspension wurde 1 µl Denaturierungspuffer (NEB)

gegeben und für 10 min bei 94 °C denaturiert. Anschließend wurden folgende Reagenzien zum Ansatz dazu gegeben:

Tabelle 13: Übersicht der Reaktionsansätze bei der Deglykosylierung von HA mit PNGase F.

Reagenz	PNGase F-Versuch	Kontrollansatz
10x NP40-Puffer (NEB)	2,5 µl	2,5 µl
10x G7 Reaktionspuffer (NEB)	2,5 µl	2,5 µl
25x BSA (NEB)	1 µl	1 µl
PNGase F (NEB)	1,5 µl	---
Dest. Wasser	9,5 µl	11 µl

Die Ansätze wurden über Nacht bei 37 °C deglykosyliert und schließlich mit 5fach Ladepuffer versetzt nochmals für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Analyse erfolgte im Western Blot, wobei 8 µl des Reaktionsansatzes aufgetragen wurden.

2.3.11. Trypsinspaltung von Hämagglutinin

Trypsinspaltung mit Spheroblasten: Es wurden 45 ODE einer Hefekultur pelletiert (4.000 rpm, 5 min) und mit Sorbitol-Puffer gewaschen. Das Zellpellet wurde in Zymolyase-Puffer resuspendiert und die Hydrolyse der Zellwand-Glukane erfolgte für 1 h bei 37 °C. Die Proben wurden erneut in Sorbitol-Puffer gewaschen und auf drei Aliquot verteilt. Zu den Aliquot wurden 10 µg/ml oder 1 µg/ml TPCK-Trypsin gegeben bzw. die Kontrolle blieb unbehandelt. Alle Proben wurden für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit 5fach Ladepuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C denaturiert.

Trypsinspaltung von Proteinextrakten: 40 ODE einer Hefekultur wurden bei 4.000 rpm für 5 min pelletiert und einmal mit Wasser gewaschen. Das Pellet wurde in 600 µl Lysispuffer resuspendiert und mit Glasperlen (ca. 300 µl) versetzt. Für den Zellaufschluss wurden die Proben in einem Vibra-Schüttler viermal für 3 min geschüttelt und zwischendurch auf Eis gekühlt. Die Glasperlen und große Zellbestandteile wurden durch einen Zentrifugationsschritt bei 150 x g und 5 min abgetrennt. Der Rohextrakt wurde geteilt, zu einem Aliquot wurde 1 µg/ml TPCK-Trypsin (Sigma Aldrich) hinzugefügt und das andere Aliquot blieb unbehandelt. Beide Proben wurden für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 5fach Ladepuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Analyse der Trypsinspaltung erfolgte im Western Blot.

2.4. Hefeproduktion für Immunisierungsversuche

Anzucht:

Für das Immunisierungsexperiment „Subkutane Immunisierung mit verschiedenen VP2T2S-Hefen (*S. cerevisiae* und *K. lactis*)“ unter 3.1.4.2 wurden die Hefen in Schüttelkolben für 24 h bei 30 °C angezogen. Die Stämme VAK367, VAK890 (VP2_{T2S};GAL4) und VAK911 (oVP2_{T2S};GAL4) wurden in 2 %

Laktose Vollmedium kultiviert und die Plasmid-tragenden Hefen *S. cerevisiae* LV, *S. cerevisiae* pVP2_{T2S}, VAK367 LV und VAK367 pVP2_{T2S} in supplementiertem Minimalmedium ohne Uracil.

Für die Versuche „Orale und subkutane Immunisierung mit VP2-exprimierenden Hefen“ unter 3.1.4.1 sowie „Orale und subkutane Vakzinierung von Hühnern gegen IBD“ unter 3.1.4.3 wurden die Hefestämme in einem 10 l Biostat ED Bioreaktor (B. Braun Biotech, Melsungen, Deutschland) angezogen. Die Hefen für die Hühnervakzinierungsversuche wurden durch die Firma ORGANOBALNCE GmbH (Berlin) fermentiert. Die Anzucht im Fermenter erfolgte stets in einem *fed-batch* Verfahren mit einem linearen Fütterungsprofil. Die Medien und Parameter der Fermentationen sind nachfolgend aufgelistet:

Tabelle 14: Auflistung über die Medienzusammensetzung beim *fed-batch* Fermentationsprozess. * die Inhaltstoffe der Spurenelementlösung sind in Tabelle 15 zusammen gefasst.

Zusätze	Batch Medium	Feed Medium
Pepton	20 g/l	50 g/l
Hefeextrakt	10 g/l	25 g/l
Laktose	-	200 g/l
Ammoniumchlorid	0,5 g/l	1,25 g/l
Magnesiumchlorid	0,68 g/l	1,7 g/l
Kaliumphosphatpuffer	50 ml/l	125 ml/l
Spurenelementlösung*	10 ml/l	25 ml/l
Methionin	20 mg/l	50 mg/l
Uracil	20 mg/l	50 mg/l
Adenin	20 mg/l	50 mg/l
Niacin	12 mg/l	30 mg/l
ster. Antifoam	0,05 ml/l	0,05 ml/l

Tabelle 15: Zusammensetzung der Spurenelementlösung für die Medien.

Spurenelement	Konzentration
Borsäure	0,1 g/l
Eisensulfat-Heptahydrat	0,3 g/l
Calciumchlorid-Dihydrat	0,45 g/l
Cobalt(II)chlorid-Hexahydrat	0,03 g/l
Kupfersulfat-Pentahydrat	0,03 g/l
Mangansulfat-Monohydrat	0,12 g/l
Natriumiodid	0,035 g/l
Natriummolybdat-Dihydrat	0,05 g/l
Zinksulfat-Heptahydrat	0,45 g/l
EDTA	0,15 g/l

Tabelle 16: Parameter der *fed-batch* Verfahren. Der pH-Wert wurde über eine 2 M Natriumhydroxid- und eine 2 M Phosphorsäurelösung geregelt. Die Kaskadenregelung der Drehzahl und der Begasungsrate erfolgten um die Sauerstoffsättigung bei 30 % konstant zu halten.

Parameter	Setpoint
Temperatur	30 °C
Drehzahl	Kaskade (300 – 1.200 rpm)
pH	5,0

pO₂	30 % Sättigung
Begasungsrate	Kaskade (4-20 sLpm)
Druck	500 mbar

Gefriertrocknung und Hitze-Inaktivierung:

Die pelletierten Zellen wurden anschließend bei -20 °C eingefroren und mittels einer Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert. Danach wurden die Hefen ggf. für 2 h bei 90 °C im Hybridisierungsöfen hitze-inaktiviert. Die Hefepellets wurden anschließend mit Mörser und Pistill pulverisiert. Zur Überprüfung der Inaktivierung wurden die Zellen in Wasser resuspendiert und in verschiedenen Konzentrationen auf Platten mit 2 % Glukose-Vollmedium ausplattiert. Nach einer Kultivierung von zwei Tagen bei 30 °C wurden die gewachsenen Kolonien gezählt. Vor der Applikation wurden die Hefen im Western Blot erneut hinsichtlich des Antigens getestet.

Applikation der Hefe (vgl. 2.5.1 und 2.5.2):

Für die orale Immunisierung von Mäusen wurden die getrockneten und ggf. hitze-inaktivierten Hefen als Pulver zur Verfügung gestellt.

Für die subkutane Injektion bei Mäusen wurde die pulverisierte Hefe in Wasser resuspendiert und gegebenenfalls 1:1 mit kompletten bzw. inkompletten Freund's Adjuvans (KFA bzw. IFA; Thermo Scientific) versetzt, so dass eine Hefe-Endkonzentration von 0,5 mg/ml erreicht wurde.

Für die orale Immunisierung von Hühnern wurde die pulverisierte Hefe in Kooperation mit Dr. Michael Bulang (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Nutztierwissenschaftliches Zentrum Merbitz) zusammen mit Hühnerfutter (all-mash R, Deuka) vermischt und in Pellets gepresst. Die Endkonzentration betrug 5 % Hefe.

Zur subkutanen Injektion bei Hühnern wurden 5 mg Hefe in 500 µl bidest. Wasser gelöst und mit 750 µl PBS versetzt. Zu der Zellsuspension wurden 1,25 ml inkomplettes Freund's Adjuvans (IFA; Thermo Scientific) gegeben und anschließend beschallt bis eine Emulsion entstanden war. Die Hefe-Endkonzentration betrug 0,5 mg/ml.

2.5. Immunisierungsversuche und serologische Untersuchungen

2.5.1. Immunisierungsversuche mit Mäusen

Die Immunisierungsversuche mit Mäusen erfolgten am Zentrum für Angewandte Medizinische und Humanbiologische Forschung der MLU Halle-Wittenberg durch Dr. Hendryk Aurich oder Dr. Martina Behrens. Die Verträglichkeit der *K. lactis*-Hefen wurde in Vorversuchen getestet, wobei keine Auffälligkeiten in der Gewichtszunahme oder im Verhalten der Tiere zu beobachten waren. Es

wurden sechs Wochen alte, weibliche CL57BL/6 Mäuse (Harlan Laboratories, Niederlande) eingesetzt.

Orale Immunisierung: Die orale Verabreichung der Hefe erfolgte in Pulverform. Dabei wurde die getrocknete Hefe unter das Futter gemischt (5 % Hefeanteil) und pro Tier wurde ihnen 0,2 g Hefe am Tag zur Verfügung gestellt. Da sich immer mehrere Tiere in einem Isolator befanden, wurde nicht ermittelt, wie viel Hefe jede einzelne Maus zu sich genommen hat. Bei den Tieren, die das orale Adjuvans Saponin (*Quillaja saponaria* Molina; Sigma Aldrich) erhielten, wurde dieses einen Tag vor den Immunisierungsperioden verabreicht. Dafür wurden 500 µg Saponin in 200 µl Wasser gelöst und der Maus ösophagial intubiert.

Subkutane Applikation: Für die subkutane Injektion wurden die Mäuse anästhesiert (effektgesteuerte Inhalationsnarkose mit etwa 1.5 % Isofluran und 2 l Sauerstoff pro Minute). Es wurden dabei jeweils 100 µl der Hefe-Freunds Adjuvans-Suspension (0,5 mg/ml; vgl. 2.4) in beide Bauchseiten unter die Haut injiziert.

Serumgewinnung: Für die Serumgewinnung wurden die Tiere anästhesiert (effektgesteuerte Inhalationsnarkose mit etwa 1.5 % Isofluran und 2 l Sauerstoff pro Minute) und eine finale Blutentnahme vorgenommen. Die Proben wurden anschließend über Nacht bei 4 °C aufbewahrt und am Folgetag bei 13.200 rpm für 90 s zentrifugiert. Das Serum wurde schließlich für 30 min bei 56 °C inaktiviert.

2.5.2. Immunisierungsversuche mit Hühnern

Alle Hühnerversuche wurden unter Leitung von Dr. Egbert Mundt am *Poultry Diagnostic and Research Center* der Universität von Georgia in Athens, USA durchgeführt. Die Hühner wurden in einem Raum in Isolatoren gehalten, der nur über eine Hygieneschleuse erreicht werden konnte. In den Isolatoren stand den Hühnern unbegrenzt Wasser und Futter zur Verfügung. Die Zuluft wurde gefiltert und wieder abgesaugt. Die Temperatur in den Isolatoren wurde täglich überprüft und mit zunehmendem Alter der Tiere herabreguliert. Die Vakzinierungsstudien erfolgten mit spezifisch pathogen-freien, weißen Leghorn-Hühnern, die vor Beginn der Immunisierung auf Abwesenheit von anti-IBDV-Antikörpern bzw. anti-H7-HA-Antikörpern untersucht wurden. Die Vakzinierungsversuche wurden am 14. Lebenstag der Hühner begonnen.

Orale Applikation: Einen Tag vor der ersten Hefefütterung wurde einigen Tieren das orale Adjuvans verabreicht. Dafür wurden 50 mg Saponin (von *Quillaja saponaria* Molina; Sigma Aldrich) in 1 ml PBS gelöst und mit 30 mg/ml Natriumhydrogencarbonat versetzt. 50 mg des Adjuvans wurde den Hühnern ösophagial intubiert.

Das Futter enthielt in den Immunisierungsphasen 5 % rekombinante Hefe und stand den Tieren unbegrenzt zur Verfügung. Da sich immer mindestens vier Hühner in einem Isolator befanden, wurde nicht ermittelt, wie viel Futter (Hefe) jedes einzelne Huhn zu sich genommen hat.

Subkutane Applikation: Die subkutane Verabreichung erfolgte pro Applikation mit 1 mg der getrockneten und inaktivierten Hefe. Dafür wurde 500 µl der Hefe/IFA-Suspension (vgl. 2.4) in den Nacken der Hühner subkutan injiziert. Der Kontrollgruppe wurde eine Suspension aus PBS mit IFA injiziert. Nach 14 und 28 Tagen erfolgte eine Boost-Impfung nach gleichem Protokoll.

Serumgewinnung: Für die Gewinnung der Seren wurde den Hühnern aus der *vena brachialis* ca. 0,5 bis 1 ml Blut entnommen. Die Blutproben wurden über Nacht bei 4 °C gelagert und am nächsten Tag zentrifugiert (1,5 min; 13.200 rpm; 4 °C). Das überständige Serum wurde anschließend 30 min bei 56 °C inaktiviert. Die Lagerung der Seren erfolgte bei -20 °C.

Challenge (IBDV): Beim Challenge-Versuch wurden 100 EID₅₀ des IBDV-Stammes Edgar (vgl. 2.5.7) oral mit einer Pipette verabreicht. Die Tiere wurden während des Versuchs mehrmals täglich kontrolliert und am siebten Tag mit Kohlendioxid euthanasiert. Die *Bursa fabricii* wurde zur weiteren Analyse entnommen, für 24 h in 10 % gepufferten Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Davon wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt, die zunächst entparaffiniert und schließlich mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt wurden. Die Bursa wurde durch Dr. Egbert Mundt mikroskopisch ausgewertet und ein Score der Bursaläsionen auf der Skala von 1 bis 4 ermittelt (1 = normal bis 10 % folliculäre Atrophie; 2 = 10-30 % folliculäre Atrophie; 3 = 30-70 % folliculäre Atrophie; 4 = > 70 % folliculäre Atrophie).

2.5.3. IBDV-ELISA

Die erhaltenen Seren wurden hinsichtlich IBDV-bindender Antikörper mit dem ELISA-Test *Infectious Bursal Disease Virus Antibody Test Kits* (IDEXX) untersucht. Für die Hühnerseren wurde der Assay nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Da dies für die Mäuseseren nicht möglich war, wurden die Seren in Abweichung vom Protokoll 1:50 verdünnt eingesetzt. Außerdem wurde als sekundärer Antikörper nicht das (Ziege) anti-chicken-HRP-Konjugat sondern ein (Ziege) anti-mouse-HRP-AK (Sigma Aldrich) 1:2.000/ELISA-Puffer (100 µl/well) verwendet.

2.5.4. Virusneutralisationsassay für IBDV (Serumneutralisationsassay)

Bestimmung der TCID₅₀: Die TCID₅₀ (Gewebekultur-infektiöse Dosis) gibt an, bei welchem Virustiter durchschnittlich 50 % der Gewebekultur infiziert wird. Für die Bestimmung des Titers wurde eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 10 (10^{-1} – 10^{-12}) der Virussuspension in einer 96-Mikrotiterplatte angelegt. Das Virus wurde dabei in 90 µl ZB9-Medium ohne Serum verdünnt. Zu der

Verdünnungsreihe wurden 100 µl DF1-Zellen gegeben und die Zellen wurden anschließend für fünf Tage bei 37 °C kultiviert. Am fünften Tag wurden die Zellen unter dem Mikroskop hinsichtlich eines cytopathischen Effektes (CPE) untersucht.

Die Berechnung der TCID₅₀ erfolgte nach der von Spearman und Kärber (1931) entwickelten Gleichung:

$$\log_{10} \text{TCID}_{50}\text{-Endpunkt-Verdünnungsverfahren} = x_0 - \frac{d}{2} + d \sum \frac{r}{n}$$

- x₀** log₁₀ mit der geringsten Verdünnungsstufe, bei der alle Kammern einen CPE aufwiesen
- d** Logarithmus des Verdünnungsintervalls (z.B. d = 0,3 bei einer Verdünnung von 1:2; d = 0,7 bei einer Verdünnung von 1:5; d = 1,0 bei einer Verdünnung von 1:10)
- n** Anzahl der Kammern pro Verdünnungsstufe
- r** Anzahl der Kammern pro Verdünnungsstufe, die einen CPE aufwiesen

Serumneutralisationsassay: Für den Nachweis von Virus-neutralisierenden Antikörpern wurde sich an der Arbeit von Skeeles *et al.* orientiert [133]. In einer 96-Mikrotiterplatte mit flachem Boden wurde zunächst eine serielle Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2 (2⁻³ bis 2⁻¹⁴; 50 µl) des Serums in ZB9-Medium vorbereitet. Zu der Serumverdünnung wurden 50 µl einer Virussuspension mit 100 TCID₅₀/100 µl pipettiert. Als Negativkontrolle wurde ein SPF-Serum verwendet; als Positivkontrolle ein Serum von einem gegen IBDV-vakzinierten Huhn und zur Überprüfung der Virusverdünnung wurde eine Rücktitration von 10⁻¹ bis 10⁻⁶ durchgeführt. Bei einer anschließenden Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C sollte nun das Virus durch die im Serum enthaltenen Antikörper neutralisiert werden. Danach wurden 100 µl DF1-Zellen dazugegeben und für fünf Tage bei 37 °C kultiviert. Am fünften Tag wurden die Zellen unter dem Mikroskop untersucht und hinsichtlich des Auftretens eines CPE beurteilt. Den Endpunkt der Neutralisation bestimmte der reziproke Wert der höchsten Serumverdünnung, bei der kein CPE beobachtet werden konnte.

2.5.5. Influenza-HA-ELISA

Beim ELISA mit H7-HA-Antigen kam rekombinantes Protein aus Baculovirus-infizierten Sf9-Zellen zum Einsatz, das mittels Affinitätschromatographie gereinigt wurde. Dies wurde durch Dr. Egbert Mundt zur Verfügung gestellt. Das Antigen wurde in *coating buffer* (10x *Coating Solution Concentrate* Kit; KPL) verdünnt und mit 50 µl/well auf eine 96-Mikrotiterplatte mit flachem Boden (Fisherbrand) gegeben. Die Platte wurde abgedeckt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde ungebundenes Hämagglutinin in drei Waschschrritten mit je 100 µl/well Waschpuffer (*Wash Solution Concentrate* Kit; KPL) entfernt und ungesättigte Bindestellen für 45 min mit 100 µl/well 1x BSA/*Blocking solution* (10 % BSA *Diluent/Blocking Solution*; KPL) bei 37 °C blockiert. Nachdem erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen wurde, erfolgte die Zugabe der Seren, die 1:50 in *sample dilution buffer* (Synbiotics) verdünnt wurden. Die Platte wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert und

anschließend dreimal gewaschen. Als sekundärer Antikörper wurde ein HRP-Konjugat (Anti-*chicken* IgG (H+L) Antikörper, Peroxidase markiert; KPL) 1:1.000 in *sample dilution buffer* verdünnt und davon 50 µl pro *well* eingesetzt. Nachdem erneut für 1 h bei 37 °C inkubiert wurde, erfolgten nochmals drei Waschschritte mit Waschpuffer. Die Zugabe des Substrats (*ABTS 2-Component Microwell Peroxidase Substrate Kit*; KPL) erfolgte mit 50 µl pro *well*. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei RT wurde die Reaktion mit 50 µl/*well stop solution* (*ABTS Peroxidase Stop Solution Kit*; KPL) abgestoppt und die Platten bei einer OD von 405 nm ausgelesen.

2.5.6. Virusneutralisationsassay für Influenzaviren (Plaque-Reduktionstest)

Der Test auf Influenza-Virus-neutralisierende Antikörper basierte auf dem Protokoll von Matrosovich *et al.* [134]. Für die Durchführung wurden Influenza-Viren von H7N3 (zur Verfügung gestellt von Dr. Egbert Mundt) bzw. PR8/H1N1 (zur Verfügung gestellt von PD. Dr. Thorsten Wolff, Robert-Koch-Institut, Berlin) und MDCK II-Zellen verwendet. Das Prinzip des Assays beruht auf dem CPE von nicht-neutralisierten Viren, wodurch Löcher im Zellrasen entstehen (Plaques). Die Neutralisation erfolgt zuvor durch Inkubation der Viruslösung mit den Seren. Dieser Ansatz wird anschließend auf MDCK II-Zellen gegeben und bei erfolgreicher Neutralisation ist eine Reduktion der Plaques im Vergleich zur Kontrollinfektion zu beobachten.

Bestimmung der *Plaque forming units* (PFU): Für den Neutralisationsassay sollte eine Virusverdünnung eingesetzt werden, bei der ca. 100 Plaques pro *well* zu erwarten waren. Dazu musste zunächst die richtige Verdünnung der Virusstocklösung bestimmt werden. Dafür wurden MDCK II-Zellen einen Tag vor der Infektion in Sechs-*well*-Platten ausgesät, dass sie am nächsten Tag konfluent gewachsen waren. Am Tag der Infektion wurde das Medium von den Zellen abgenommen und die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 1 ml MEM-Medium sowie 100 µl einer seriell 1:10 verdünnten Virusstocklösung/MEM darauf gegeben. Die Infektion erfolgte bei 37 °C im Brutschrank für 1 h. Danach wurde die Virusverdünnung wieder abgenommen und die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen. Zum Schluss wurden die Zellen mit Overlay-Medium überschichtet und für zwei Tage bei 37 °C kultiviert. Zum Färben der lebenden Zellen wurde schließlich das Overlay-Medium abgenommen und die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml eines eiskalten Aceton-Methanol-Gemisches (60:40) überschichtet und für 10 min bei RT fixiert. Danach wurde das Gemisch wieder abgenommen und die Zellen luftgetrocknet. Die Färbung erfolgte mit 2x Kristallviolett, das 1:1 mit PBS versetzt wurde. Nach weiteren 10 min bei RT wurde die Färbelösung entfernt, die Zellen zweimal mit Wasser gewaschen und luftgetrocknet. Die Plaques konnten schließlich ausgezählt und die *Plaque forming units* bestimmt werden.

Plaque-Reduktionstest: Der Versuchsablauf erfolgte wie für die Bestimmung der PFU, wobei vor der Infektion Virus und Serum zusammen inkubiert wurden (Neutralisation). Dabei wurde die Viruskonzentration so gewählt, dass 100 PFU eingesetzt wurden. Für die Neutralisation wurden 90 µl Virusverdünnung und 30 µl Serum für 1 h bei 37 °C in Reaktionsgefäßen inkubiert. Anschließend wurden 100 µl des Virus/Serum-Lösung auf die Zellen gegeben und für eine weitere Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Der weitere Verlauf erfolgte wie oben beschrieben.

2.5.7. Bestimmung der EID₅₀ für IBDV

Die EID₅₀ (Ei-infektiöse Dosis 50), die angibt bei welchem Virustiter durchschnittlich 50 % der Eier infiziert werden, wurde mittels der Chorioallantoismembran-Methode (CAM-Methode) bestimmt [135]. Dazu wurden neun Tage alte, embryonierte SPF-Hühnereier durchleuchtet und an einer Gefäß-freien Stelle markiert. Mit einer Nadel wurde die Schale auf der Spitze der Luftkammer und der markierten Gefäß-freien Stelle angestochen. Das Ei wurde anschließend so platziert, dass die markierte Stelle nach oben zeigte. Nun wurde an dieser Stelle eine künstliche Luftkammer erzeugt, indem mit einem Gummiballon die Luft aus der Luftkammer gesaugt wurde. In die künstliche Luftkammer wurde mit einer Spritze 100 µl einer 10-fach IBDV-Verdünnungsreihe, welche in Virustransportmedium angelegt wurde, auf die Chorioallantoismembran injiziert. Die Eier wurden für weitere sieben Tage bei 38 °C bebrütet und täglich auf Vitalität überprüft. Embryos, die in den ersten 24 Stunden abgestorben waren, wurden in die Berechnung nicht mit einbezogen. Am siebten Tag wurden alle Eier geöffnet und pathologisch untersucht. Als positiv, hinsichtlich einer IBDV-Infektion, wurden Embryos bewertet, die abgestorben waren oder IBDV-typische Merkmale aufwiesen (Läsionen, Veränderungen der Milz oder Leber, verzögerte Entwicklung).

Die Berechnung der EID₅₀ erfolgte nach der von Spearman und Kärber (1931) entwickelten Gleichung:

$$\log_{10} \text{EID}_{50}\text{-Endpunkt-Verdünnungsverfahren} = x_0 - \frac{d}{2} + d \sum \frac{r}{n}$$

- x₀** log₁₀ mit der geringsten Verdünnungsstufe, bei der alle Eier positiv bewertet wurden
- d** Logarithmus des Verdünnungsintervalls (z.B. d = 0,3 bei einer Verdünnung von 1:2; d = 0,7 bei einer Verdünnung von 1:5; d = 1,0 bei einer Verdünnung von 1:10)
- n** Anzahl der Eier pro Verdünnungsstufe
- r** Anzahl der Eier pro Verdünnungsstufe, die positiv bewertet wurden

3. Ergebnisse

3.1. Virus der Infektiösen Bursitis

3.1.1. Generierung eines VP2-exprimierenden *Kluyveromyces lactis*-Hefestammes

Für die Entwicklung eines *Kluyveromyces lactis*-basierenden Impfstoffes gegen die Infektiöse Bursitis sollte zunächst ein Hefestamm konstruiert werden, der das VP2-Gen von IBDV exprimiert. VP2 ist das Hauptkapsidprotein des Virions und auf der Virusoberfläche lokalisiert. Es ist das einzige IBDV-Protein, gegen das Virus-neutralisierende Antikörper generiert werden [38].

Da für VP2 die Ausbildung von subviralen Partikeln beschrieben sind und neutralisierende Antikörper konformationsabhängig induziert werden, sollte die Expression von VP2 in *K. lactis* ebenfalls zu immunogenen VP2-Kapsiden führen. Saugar *et al.* konnten nach der Expression der ersten 456 AS von VP2 in H5-Insektenzellen Kapside isolieren, die eine T=1 Struktur besitzen [136]. Aufgrund dessen wurde das gleiche Konstrukt vom Stamm D78 zur Expression in *K. lactis*-Zellen gewählt.

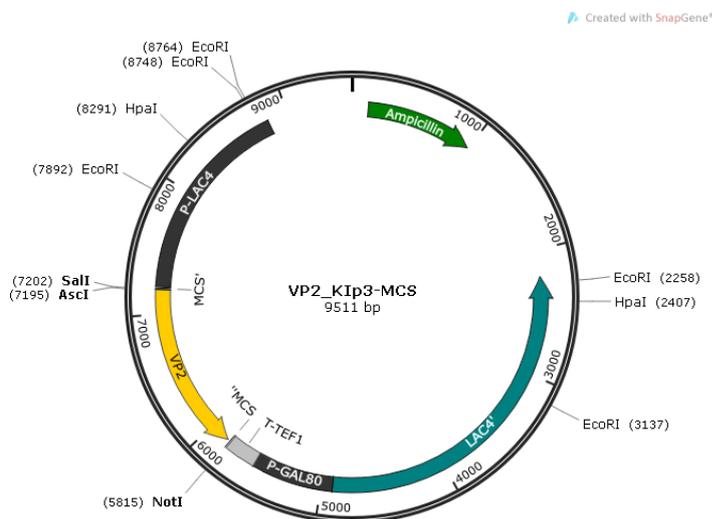


Abbildung 4: Plasmidkarte von VP2_KIp3-MCS. Das Plasmid enthält einen Teil des LAC4-Promoters, VP2, TEF1-Terminator, GAL80-Promoter sowie das in VAK556 fehlende 5' Ende von LAC4. Das VP2-Gen wurde über AscI und NotI in den KIp3-MCS-Vektor inseriert. Für die Generierung des Stammes VAK887 (VP2) wurde das Plasmid VP2_KIp3-MCS mit den Restriktionsenzymen EcoRI geschnitten und in den Stamm VAK556 transformiert.

Die Generierung erfolgte mit dem Ausgangsstamm VAK556 und dem EcoRI-geschnittenen Plasmid KIp3-MCS_VP2 (vgl. Abbildung 4). Positive Rekombinanten wurden auf Laktoseverwertung und Uracil-Auxotrophie selektiert (vgl. 2.2.4) und der resultierende *K. lactis*-Stamm wurde als VAK887 (VP2) bezeichnet. Anschließend erfolgte eine Überprüfung des Stammes auf VP2-Expression. Dafür wurden die Hefezellen VAK367 (Kontrollstamm) und VAK887 (VP2) zunächst in Glukose-haltigen Vollmedium über Nacht und anschließend in 2 % Laktose Vollmedium induziert angezogen. Aus den geernteten Zellproben wurden Proteinextrakte gewonnen (vgl. 2.3.1), die schließlich mit einem rabbit anti-IBDV Antiserum (zur Verfügung gestellt von Dr. Egbert Mundt) im Western Blot untersucht wurden [121]. Die Antikörper aus dem Serum sind gegen die IBDV-Proteine VP2, VP3 und VP4 gerichtet, da die Immunisierung mit gereinigtem IBDV-Virus erfolgte. Als Kontrollen wurden Zelllysatsproben von nicht-IBDV-infizierten und IBDV-infizierten DF1-Zellen aufgetragen (positives und negatives Zelllysats). In der Western Analyse wurde für VAK887 (VP2) eine Bande bei ca. 39 kDa

detektiert, die nicht im Kontrollstamm VAK367 auftrat. Da die Bande in der IBDV-infizierten Zelllysatsprobe der VP2-Bande entspricht, ist davon auszugehen, dass die Expression von VP2 in dem *K. lactis*-Stamm erfolgte (Abbildung 5A). Neben der VP2-Bande wurde eine weitere Bande bei ca. 40 kDa detektiert, die jedoch ebenfalls in der Negativprobe VAK367 zu finden ist. Deshalb wurde angenommen, dass es sich hierbei um eine unspezifische Bindung der Antikörper an ein *K. lactis*-Protein handelte. Ein weiteres Signal wurde bei ca. 120 kDa detektiert, das auch in der IBDV Kontrolle erkennbar war. Bei dieser Bande könnte es sich um VP2-Trimere handeln, die trotz denaturierender Bedingungen während der SDS-PAGE nicht dissoziierten. Das diffuse Signal oberhalb von 80 kDa wurde in allen anti-IBDV Western Analysen detektiert und deutet ebenfalls auf VP2-Oligomerstrukturen hin, die durch Denaturierung der Proben in 5fach Probenpuffer bei 95 °C nicht vollständig gelöst wurden.

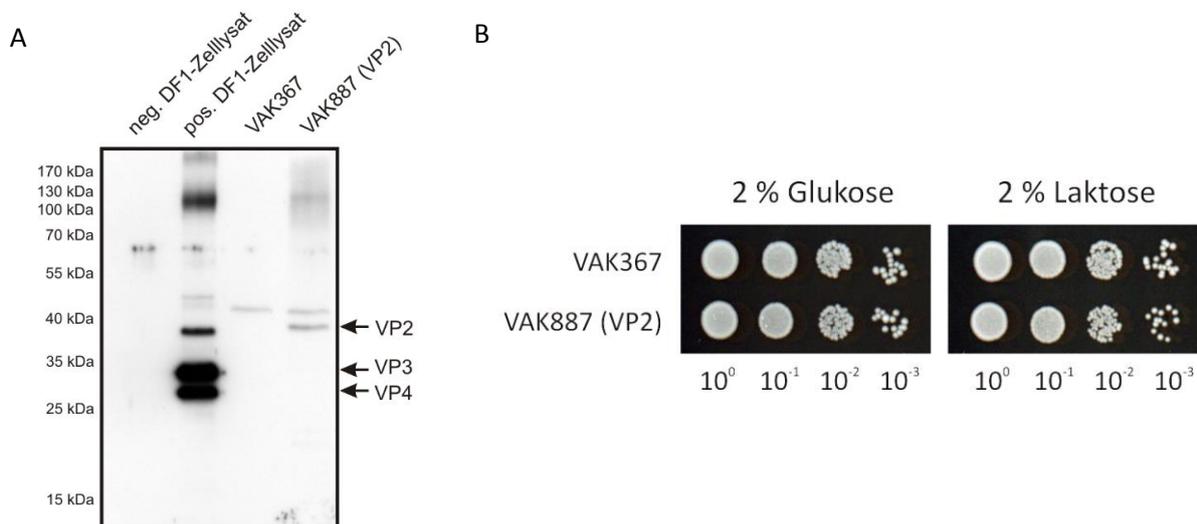


Abbildung 5: Nachweis des VP2-Proteins im WB und Wachstumstest von VAK887 (VP2). **A:** Die *K. lactis*-Stämme VAK367 (Kontrollstamm) und VAK887 (VP2) wurden für sechs Stunden in 2 % Laktose-YEP-Medium angezogen. Jeweils 20 µg Proteinextrakt wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht. Als weitere Kontrollen dienten Lysate von DF1-Zellen, die mit IBDV (D78) infiziert waren (pos. DF1-Zelllysate), sowie eine nicht-infizierte Kontrolle (neg. DF1-Zelllysate). Der Nachweis der IBDV-Proteine VP2, VP3 und VP4 erfolgte mit einem anti-IBDV Antiserum und anti-mouse-HRP Antikörper. **B:** Die beiden Stämme VAK367 (Kontrollstamm) und VAK887 (VP2) wurden in 2 % Glukose-YEP-Medium über Nacht angezogen und auf eine OD₆₀₀ von 0,4 verdünnt. Davon ausgehend wurden serielle 1:10 Verdünnungen auf YEP-Medium mit 2 % Glukose bzw. Laktose getropft und die Platten für zwei Tage bei 30 °C kultiviert.

Nachdem die Synthese vom VP2-Protein nachgewiesen werden konnte, wurde untersucht, ob die Fremdgenexpression einen negativen Einfluss auf das Wachstum von *K. lactis* hat. Zur Untersuchung sollten die Stämme VAK367 und VAK887 (VP2) vergleichend auf Vollmediumplatten mit 2 % Glukose (*LAC4*-Promoter ist reprimiert; keine Expression von VP2) bzw. Laktose (*LAC4*-Promoter ist induziert; Expression von VP2 findet statt) getropft werden. Dafür wurden Vorkulturen beider Stämme in Vollmedium mit Glukose angezogen und die optische Dichte auf 0,4 eingestellt. Anschließend wurden serielle Verdünnungsreihen (1:10) der Zellsuspension auf die beiden Medien getropft und die Platten für zwei Tage bei 30 °C kultiviert (Abbildung 5B). Anschließend konnte zwischen den

Stämmen VAK367 (Kontrollstamm) und VAK887 (VP2) kein Unterschied im Wachstum auf Glukose- oder Laktose-haltigen Medium festgestellt werden. Somit konnte kein Wachstumsnachteil durch die Expression von VP2 beobachtet werden.

3.1.2. Optimierung der VP2-Expression

3.1.2.1. Austausch der zweiten Aminosäure von VP2 nach der *N-end rule*

Nachdem die Expression von VP2 nachgewiesen werden konnte, sollte die Proteinmenge pro Hefezelle gesteigert werden. Nach der *N-end rule* wird die Halbwertszeit eines Proteins *in vivo* durch die Aminosäuren am N-Terminus bestimmt [137]. Die Aminosäuren Histidin, Leucin, Phenylalanin, Asparagin, Lysin, Tryptophan, Isoleucin, Tyrosin und Arginin wirken in *S. cerevisiae* destabilisierend und sind Teil des N-Degrans. Sie werden vom Ubiquitin-System erkannt und ubiquitiniert, was dazu führt, dass das Protein vom 26S-Proteasom abgebaut wird. Dagegen wirken die Aminosäuren Methionin, Glycin, Alanin, Serin, Threonin, Valin und Cystein stabilisierend [137];[138]. Hamilton *et al.* Bestimmen außerdem, dass 28 % aller Proteine in *S. cerevisiae* an zweiter Position die Aminosäure Serin tragen und 10 % Threonin [139]. In der VP2-Sequenz vom Stamm D78 ist die zweite Aminosäure ein Threonin. Der Austausch von Threonin nach Serin führte in *S. cerevisiae* zu einer erhöhten VP2-Menge [140]. Für eine Steigerung der VP2-Proteinausbeute in *K. lactis* wurde deshalb das zweite Codon (ACA, codiert Threonin) durch TCT (Serin) ersetzt und in den KIp3-MCS-Vektor kloniert (KIp3-MCS_VP2_{T2S}). Das *EcoRI*-Spaltprodukt wurde anschließend in den Stamm VAK556 integriert und positive Kandidaten wurden erneut auf Laktoseverwertung und Uracil-Auxotrophie selektiert (VAK888 (VP2_{T2S})). Ob der Austausch der zweiten Aminosäure einen Einfluss auf die VP2-Proteinmenge hat, wurde mittels Immunblot untersucht (Abbildung 6A).

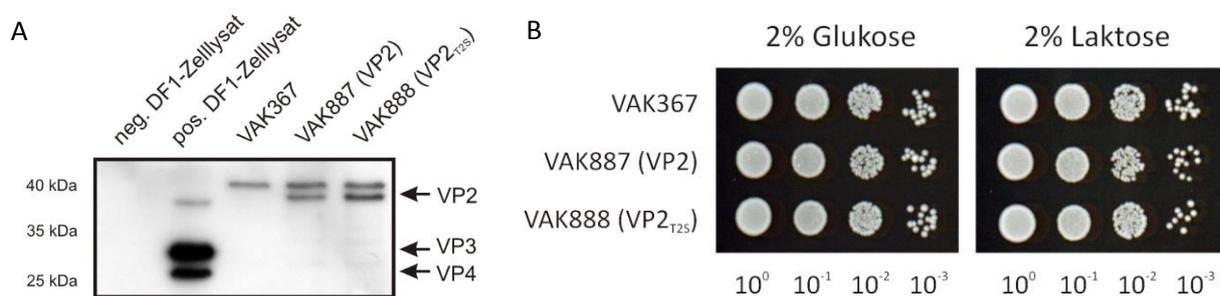


Abbildung 6: Charakterisierung des Stammes VAK888 (VP2_{T2S}). **A:** Die *K. lactis*-Stämme VAK367 (Kontrollstamm), VAK887 (VP2) und VAK888 (VP2_{T2S}) wurden für sechs Stunden in 2 % Laktose-YEP-Medium angezogen. 20 µg Proteinextrakt der drei Stämme wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht. Als weitere Kontrollen dienten Lysate von DF1-Zellen, die mit IBDV (D78) infiziert waren (pos. DF1-Zellysate), sowie eine nicht-infizierte Kontrolle (neg. DF1-Zellysate). Der Nachweis der IBDV-Proteine VP2, VP3 und VP4 erfolgte mit einem anti-IBDV Antiserum und anti-*mouse*-HRP Antikörper. **B:** Die Stämme VAK367 (Kontrollstamm), VAK887 (VP2) und VAK888 (VP2_{T2S}) wurden in 2 % Glukose-YEP-Medium über Nacht angezogen und anschließend auf eine OD₆₀₀ von 0,4 verdünnt. Davon ausgehend wurden serielle 1:10 Verdünnungen auf YEP-Medium mit 2 % Glukose bzw. Laktose getropft und die Platten für zwei Tage bei 30 °C inkubiert.

Die Hefestämme VAK367, VAK887 (VP2) und VAK888 (VP2_{T2S}) wurden hierfür in Vollmedium mit 2 % Laktose angezogen und aus den Zellproben wurden Proteinextrakte hergestellt. Im Western Blot

konnte schließlich für VAK888 (VP2_{T25}) eine leicht erhöhte VP2-Proteinmenge im Vergleich zu VAK887 (VP2) detektiert werden. Das zeigt, dass sich die Beobachtung von Jagadish *et al.* auf *K. lactis* übertragen lässt und so die VP2-Proteinmenge gegenüber dem Stamm VAK887 (VP2) erhöht werden konnte [140].

Mit einem anschließenden Wachstumsvergleich der Hefestämme auf Glukose- bzw. Laktose-haltigen Platten konnte kein Unterschied festgestellt werden (Abbildung 6B). Die erhöhte VP2-Synthese scheint somit keinen erkennbaren Einfluss auf die Vitalität des *K. lactis*-Stammes zu haben.

3.1.2.2. **Knock out des KIGal4-Inhibitors KIGAL80 und Überexpression des Transkriptionsaktivators KIGal4**

Der *LAC4*-Promoter ist ein divergenter Promoter, der in *K. lactis*-Zellen die Expression der β -Galaktosidase *LAC4* und der Laktose-Permease *LAC12* regelt. Im induzierten Zustand, wenn Laktose oder Galaktose als Kohlenstoffquelle vorliegen, ist der Transkriptionsaktivator KIGal4 an AUS_G-Elemente im Promoterbereich gebunden und eine Transkription der *LAC*-Gene kann erfolgen. Wenn Glukose im Medium vorhanden ist (reprimierter Zustand), bindet der Inhibitor KIGal80 an die Aktivierungsdomäne von KIGal4, wodurch eine Transkription der *LAC*-Gene nicht mehr stattfinden kann. Um die VP2-Menge pro Zelle weiter zu erhöhen wurde untersucht, ob durch einen *knock out* des *KIGAL80*-Gens die Expression von *VP2* gesteigert werden kann bzw. welchen Einfluss eine *KIGAL4*-Überexpression hat.

Ein *knock out* des Inhibitors *KIGAL80* sollte dazu führen, dass die Hefezellen auch im Glukose-haltigen Medium *VP2* exprimieren, da eine Repression von KIGal4 nicht mehr möglich ist [107]. Für den *knock out* wurde das Plasmid pD802, welches das Markergen *ScURA3* enthält, mit dem Restriktionsenzym *XhoI* hydrolysiert und in den Stamm VAK888 (VP2_{T25}) transformiert. Rekombinanten wurden auf Uracil-Prototrophie selektiert und das *gene replacement* wurde mit analytischen PCRs an genomischer DNA überprüft. Anschließend wurde im generierten Stamm, bezeichnet als VAK889 (VP2_{T25};*gal80Δ*), die Expression der *LAC*-Gene unter nicht-induzierenden Bedingungen auf X-Gal Glukose-haltigen Platten getestet. X-Gal dient als Indikator für die Expression der Laktose- bzw. Galaktose-induzierten Gene. Da das Glykosid von der Laktose-Permease Lac12 in die Zelle transportiert und durch die β -Galaktosidase Lac4 in Galaktose und einen blauen Indigofarbstoff hydrolysiert wird. Serielle Verdünnungen der beiden Hefestämme VAK888 (VP2_{T25}) und VAK889 (VP2_{T25};*gal80Δ*) wurden auf eine X-Gal Glukose-haltige Platte getropft und anschließend bei 30 °C kultiviert. Nach drei Tagen war eine deutliche Blaufärbung bei VAK889 (VP2_{T25};*gal80Δ*) zu beobachten, die zeigte, dass unter Glukose-Bedingungen eine Expression der *LAC*-Gene stattfindet (Abbildung 7). Die *LAC4*-Expression wird zwar in beiden Stämmen durch den *KIGAL80*-Promoter reguliert, jedoch ist dieser ähnlich über KIGal4 und KIGal80 reguliert wie der *LAC4*-Promoter [107].

Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass *KIGal4* konstitutiv aktiv ist und dass eine Expression des *LAC4*-Promoter-abhängigen Gens *VP2* unter reprimierten Bedingungen (Glukose) stattfindet.

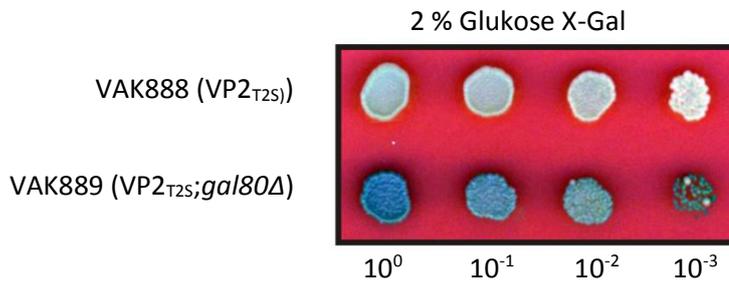


Abbildung 7: Wachstumstest von VAK889 ($VP2_{T2S};gal80\Delta$) auf X-Gal-Platten. Die Stämme VAK888 ($VP2_{T2S}$) und VAK889 ($VP2_{T2S};gal80\Delta$) wurden über Nacht in 2 % Glukose-YEP-Medium angezogen und anschließend auf eine OD_{600} von 0,4 verdünnt. Serielle 1:10 Verdünnungen wurden auf eine 2 % Glukose X-Gal-Platte getropft und für drei Tage bei 30 °C kultiviert. X-Gal diente dabei als Farbindikator für eine Expression der *LAC*-Gene.

Auffällig ist, dass in der 10^{-3} -Verdünnung neben blauen zusätzliche weiße Kolonien zu sehen waren. Dieser Phänotyp wurde ebenfalls für einen *gal80Δ*-Stamm beobachtet, der das Glykoprotein E2 des BVD-Virus exprimiert. Hierbei wurde vermutet, dass die Bildung von Subpopulationen auf eine genetische Instabilität der *LAC*-Gene hindeutet [104];[141].

Eine weitere Möglichkeit in den Regulationsmechanismus des *LAC4*-Promoters einzugreifen, stellt der Transkriptionsaktivator *KIGal4* dar. So zeigten Zachariae *et al.*, dass bereits ein zweifach erhöhtes *KIGAL4*-Expressionslevel zu einem deutlichen Anstieg der *KIGal4*-abhängigen Expression von *LAC4* und *KIGAL1* führte [106]. Auch Krijger *et al.* beobachteten im gleichen Stammhintergrund nach der Erhöhung der *KIGAL4*-Gendosis eine erhöhte *BVDV-E2*-Expression [104]. Die erhöhte *KIGal4*-Menge wurde durch genomische Integrationen von *KIGAL4*-Genkopien mittels des Plasmids pLI1 erzielt. Es stellte sich die Frage, ob mit dieser Methode ebenfalls die *VP2*-Expression erhöht werden kann. Dafür wurde das Plasmid mit dem Restriktionsenzym *BstEII* linearisiert und in kompetente VAK888 ($VP2_{T2S}$)-Zellen transformiert. Das Plasmid trägt eine *KIGAL4*-Genkopie sowie flankierende Bereiche des Gens und sollte dadurch in den *KIGAL4*-Lokus inserieren. Die Selektion positiver Kandidaten wurde auf Uracil-Mangelmedium durchgeführt, da das Plasmid ein *ScURA3*-Markergen trägt. Es resultierte der Stamm VAK890 ($VP2_{T2S};GAL4$). Da bereits bekannt war, dass es zur Integration mehrerer Plasmidkopien kommen kann, sollte anschließend die *KIGAL4*-Genkopienzahl im Stamm VAK890 ($VP2_{T2S};GAL4$) quantifiziert werden [141]. Dafür wurde genomische DNA von den Stämmen VAK556 und VAK890 ($VP2_{T2S};GAL4$) isoliert und mittels quantitativer PCR untersucht. Als Kontrollen wurden die Stämme VAK367, der eine *KIGAL4*-Kopie besitzt, und VAK1005 ($2xGAL4$), bei dem zwei *KIGAL4*-Gene an unterschiedlichen Bereichen im Genom integriert vorliegen (Wieczorek & Breunig, persönl. Mitteilung), mit untersucht. Dabei wurden ca. 130 bp große Fragmente der Gene *KIGAL4* und des Referenzgens *ALG9* direkt an der genomischen DNA amplifiziert. Für die Auswertung wurden

die bestimmten *KIGAL4*-Quantitäten auf die ebenfalls ermittelten *ALG9*-Quantitäten normiert. Als Referenzstamm diente VAK556, der nur eine *KIGAL4*-Kopie trägt (vgl. 2.2.9).

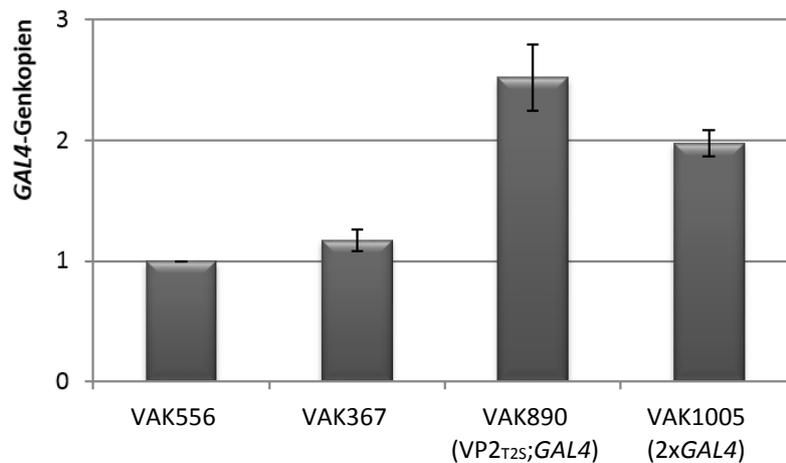


Abbildung 8: Ergebnisse der qPCR an genomischer DNA zur Bestimmung der *KIGAL4*-Genloci-Anzahl. Von den Stämmen VAK556, VAK367, VAK890 (VP2_{T2S};GAL4) und VAK1005 (2xGAL4) wurde genomische DNA isoliert und eine qPCR mit den Primerpaaren GAL4qRT-3_fwd und GAL4qRT-3_rev zur Amplifikation von einem *KIGAL4*-Fragment (119 bp) bzw. ALG9-F und ALG9-R zur Amplifikation von einem *ALG9*-Fragment (145 bp) durchgeführt. Anschließend wurden die Δ Ct-Werte von VAK556 und den einzelnen Stämmen für *KIGAL4* und *ALG9* ermittelt und schließlich ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung.

Für die Stämme VAK367 wurde so ein Wert von 1,17 und für VAK1005 (2xGAL4) von 1,98 ermittelt (Abbildung 8). In dem konstruierten Stamm VAK890 (VP2_{T2S};GAL4) ergab sich ein Ergebnis von 2,52 *KIGAL4*-Kopien mit einer Standardabweichung von 0,275. Aufgrund der relativ hohen Standardabweichung und weil der Wert deutlich über dem vom Stamm VAK1005 mit zwei Genkopien liegt, wurde angenommen, dass der Stamm VAK890 (VP2_{T2S};GAL4) vermutlich drei *KIGAL4*-Kopien trägt.

Für den Vergleich, welcher der beiden Stämme VAK889 (VP2_{T2S};gal80 Δ) und VAK890 (VP2_{T2S};GAL4) besser als VP2-Expressionsstamm geeignet ist, wurde eine *fed-batch* Fermentation in Kooperation mit Dipl. Ing. Katja Schulze (AG Molekulargenetik, MLU Halle-Wittenberg) durchgeführt. Dabei wurden die Stämme VAK888 (VP2_{T2S}) und VAK890 (VP2_{T2S};GAL4) in Laktose-haltigen Vollmedium und der Stamm VAK889 (VP2_{T2S};gal80 Δ) in Vollmedium mit Glukose kultiviert. Es wurde ein lineares Fütterungsprofil mit 2,5-fach konzentriertem YEP und 200 g/l Laktose bzw. Glukose gewählt, das von Beginn an des Prozesses zugeführt wurde. Für die Analyse wurden bei Prozessstunde 0, 3, 6, 9, 24 und 26 Proben entnommen und die Fermentation nach 26 Stunden beendet (Abbildung 9A). Anhand der Biotrockenmasse ist zu erkennen, dass der Stamm VAK889 (VP2_{T2S};gal80 Δ) in den ersten Stunden zwar schneller wächst, jedoch haben die beiden Stämme auf Laktose nach 24 bzw. 26 Stunden eine höhere Biomasse. Der *gal80-knock out*-Stamm scheint im Gegensatz zu den Stämmen VAK880 (VP2_{T2S}) und VAK890 (VP2_{T2S};GAL4) zum Ende des Prozesses nicht mehr zu wachsen. Eine durchgeführte Western Analyse zur Überprüfung der VP2-Expression zeigte außerdem, dass in den

Proben VAK890 (VP2_{T2S};GAL4) am Ende mehr VP2 vorhanden war, als in den Proben von VAK889 (VP2_{T2S};gal80Δ) (Abbildung 9B). Aufgrund der höheren VP2- und Biomasseausbeute sowie der heterogene Phänotyp von VAK889 (VP2_{T2S};gal80Δ), wurde für die weiteren Experimente mit Stämmen gearbeitet, die zusätzliche Genkopien von *K1GAL4* enthalten.

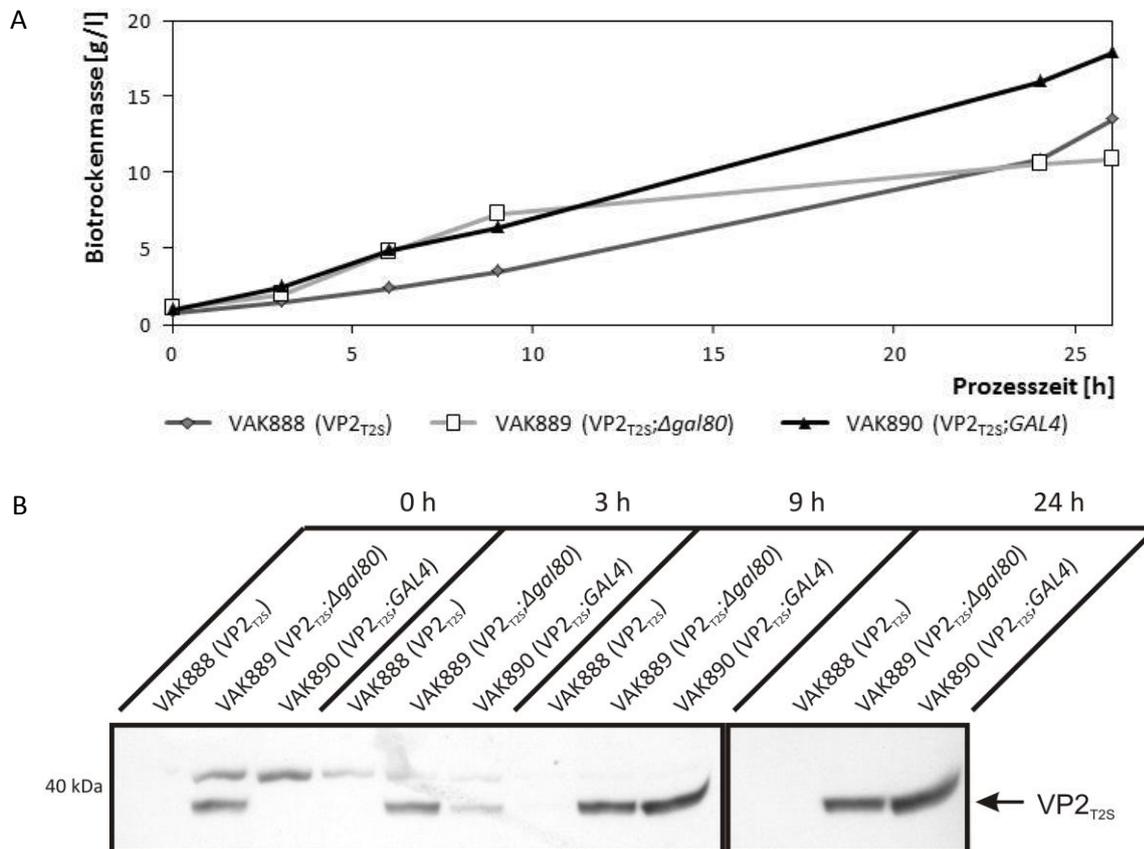


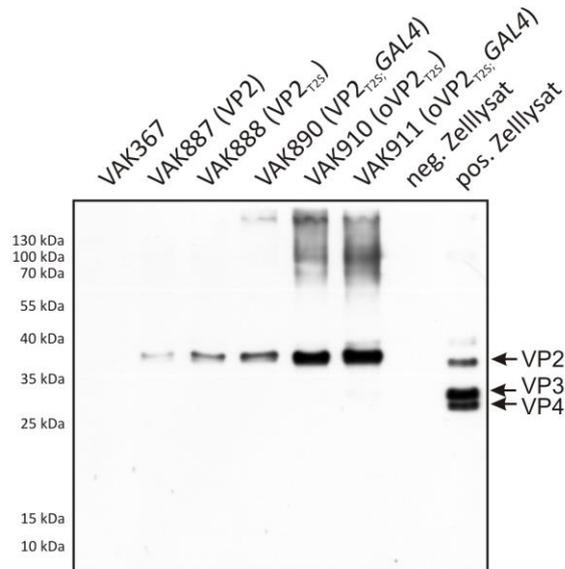
Abbildung 9: Vergleich der VP2_{T2S}-Proteinexpression von VAK889 (VP2_{T2S};Δgal80) und VAK890 (VP2_{T2S};GAL4). **A:** Die Stämme VAK888 (VP2_{T2S}), VAK889 (VP2_{T2S};Δgal80) und VAK890 (VP2_{T2S};GAL4) wurden parallel in einem *fed-batch* Fermentationsprozess über 26 Stunden mit Laktose- bzw. Glukose-haltigem YEP-Medium angezogen. Zu den Prozessstunden 0 h, 3 h, 9 h, 24 h und 26 h wurden Proben zur Bestimmung der Biotrockenmasse genommen. **B:** Von Proben der Prozessstunden 0 h, 3 h, 9 h und 24 h wurden Proteinextrakte gewonnen und mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht. Der Nachweis von VP2_{T2S} erfolgte mit mit einem anti-IBDV Antiserum und anti-mouse-HRP Antikörper.

3.1.2.3. Sequenzoptimierung des VP2_{T2S}-Gens

Eine weitere Möglichkeit zur Optimierung der Proteinsynthese stellen Veränderungen in der codierenden Sequenz dar, ohne dass dabei die Aminosäuresequenz verändert wird. Dabei können verschiedene Faktoren beeinflusst werden, wie zum Beispiel der Guanin- und Cytosin-Gehalt, Vermeidung von Sequenzwiederholungen und anderen DNA-Motiven (*internal ribosomal entry sites*), Vermeidung von mRNA-Sekundärstrukturen und die Anpassung des Codon-Adaptation-Index (CAI) an den Expressionsorganismus. Der CAI beschreibt die Decodierungseffizienz unterschiedlicher Codons für dieselbe Aminosäure. Sie ist abhängig von der spezifischen tRNA-Verteilung und unterscheidet

sich von Organismus zu Organismus [142]. Hierbei liegen die Werte zwischen 0 und 1, wobei der Wert 1 als ideal angenommen wird. Es konnte vielfach gezeigt werden, dass nach einer Genoptimierung von Fremd-DNA an den CAI von *E. coli* die Ausbeute des rekombinanten Proteins stark gesteigert werden konnte [143][144];[145]. Auch die Expression eines sequenzoptimierten *BVDV-E2*-Gens, das an den CAI von *S. cerevisiae* angepasst wurde, führte zu einer erhöhten E2-Proteinmenge in *K. lactis* [104]. Dies ist auf eine ähnliche Codon-Verteilung in beiden Hefen zurückzuführen [98]. Aufgrund der positiven Ergebnisse mit BVDV-E2 wurde auch die Sequenz von *VP2_{T2S}* für die Expression in Hefezellen optimiert. Die Gensequenzoptimierung erfolgte ebenfalls nach *S. cerevisiae* und wurde mit dem Algorithmus von Raab *et al.* anhand der Software von mr.gene.com durchgeführt [144]. Anhand dessen konnte der CAI für das gesamte *VP2_{T2S}*-Gen von 0,59 auf 0,81 verbessert werden, was einer guten Expressionseffizienz entsprechen sollte. Des Weiteren wurde der GC-Gehalt von 52,53 % auf 43,74 % reduziert und die Verteilung der Basen Guanin und Cytosin im Verhältnis zu Adenin und Thymin verbessert, was in einer Stabilisierung der mRNA resultieren sollte (Abbildung 40). Das Gen mit den flankierenden Restriktionsschnittstellen für *Ascl* und *NotI* wurde anschließend synthetisiert (MrGene) und in einen Vektor kloniert (*oVP2T2S_pMA-T*). Die Umklonierung in den *Klp3-MCS*-Vektor (*Klp3-MCS_oVP2_{T2S}*) und die genomische Integration in den Stamm VAK556 erfolgte wie unter 2.2.4 beschrieben. Der resultierende Stamm erhielt die Kennzeichnung VAK910 (*oVP2_{T2S}*). Ausgehend von diesem Stamm wurde durch genomische Integration des Plasmids *pLI1* der *KIGAL4*-Stamm VAK911 (*oVP2_{T2S};GAL4*) konstruiert. Mittels qPCR, die wie für den Stamm VAK890 (*VP2_{T2S};GAL4*) durchgeführt wurde (3.1.2.2.), konnten zwei *KIGAL4*-Genkopien ermittelt werden (Abbildung 10A). Dies weist auf eine einfache Insertion des Plasmids hin. Um den Einfluss der Sequenzoptimierung auf die *VP2_{T2S}*-Proteinmenge zu untersuchen, wurden Kulturen in induzierendem Laktose-Vollmedium angezogen. Anschließend wurden die löslichen Proteine isoliert und mittels Western Blot und dem anti-IBDV Antiserum analysiert. Dabei konnte ein deutlich stärkeres Signal nach der Optimierung im Vergleich zu den nicht optimierten Expressionskonstrukten detektiert werden (Abbildung 10B). Die Expression im Stamm VAK911 (*oVP2_{T2S};GAL4*) ist dabei noch höher als im Stamm VAK910 (*oVP2_{T2S}*). Somit gelang es durch die Kombination von drei Modifikationen (Austausch der zweiten Aminosäure von Threonin nach Serin, Erhöhung der *KIGAL4*-Genkopienzahl und Sequenzoptimierung von *VP2_{T2S}* in dem Stamm VAK911 (*oVP2_{T2S};GAL4*)) die *VP2_{T2S}*-Proteinmenge deutlich zu erhöhen.

A



B

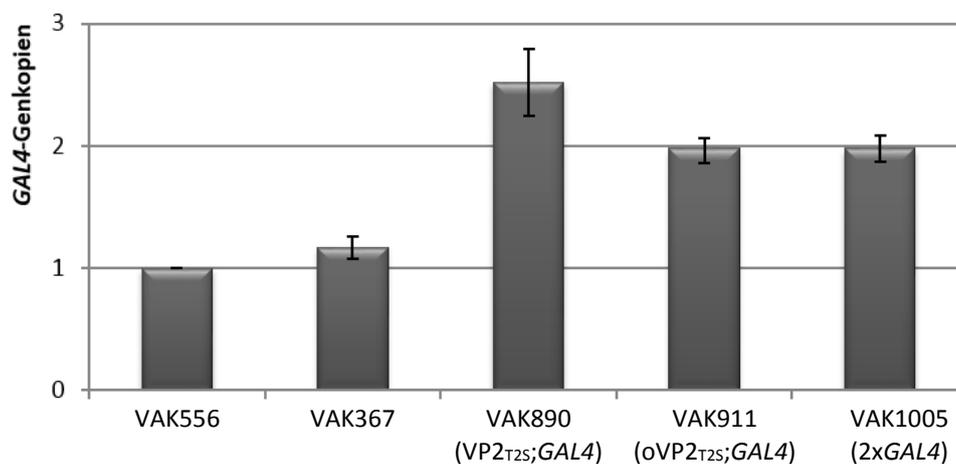


Abbildung 10: Charakterisierung der Sequenz-optimierten Stämme VAK910 und VAK911. A: Die Sequenz-optimierten *K. lactis*-Stämme VAK910 (oVP2_{T2S}) und VAK911 (oVP2_{T2S};GAL4) wurden zusammen mit den nicht-optimierten Stämmen VAK887 (VP2), VAK888 (VP2_{T2S}) und VAK890 (VP2_{T2S};GAL4) sowie dem Kontrollstamm VAK367 für 6 Stunden in 2 % Laktose-YEP-Medium angezogen. Proteinrohextrakte wurden hergestellt und 20 µg des Extraktes mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Der Nachweis der IBDV-Proteine erfolgte mit dem anti-IBDV Antiserum und anti-mouse-HRP Antikörper. Als zusätzliche Kontrollen dienten Lysate von DF1-Zellen, die mit IBDV (D78) infiziert waren (pos. DF1-Zellysate), sowie eine nicht-infizierte Kontrolle (neg. DF1-Zellysate). B: Für den Stamm VAK911 (oVP2_{T2S};GAL4) wurde die *KIGAL4*-Kopienzahl nach der Integration des pLI1-Plasmids bestimmt. Dazu wurde von den Stämmen VAK556, VAK367, VAK890 (VP2_{T2S};GAL4), VAK911 (oVP2_{T2S};GAL4) und VAK1005 (2xGAL4) genomische DNA isoliert und eine qPCR mit den Primerpaaren GAL4qRT-3_fwd und GAL4qRT-3_rev zur Amplifikation von einem *KIGAL4*-Fragment (119 bp) bzw. ALG9-F und ALG9-R zur Amplifikation von einem *ALG9*-Fragment (145 bp) durchgeführt. Anschließend wurden die Δ Ct-Werte von VAK556 und den einzelnen Stämmen für *KIGAL4* und *ALG9* ermittelt und schließlich ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung.

3.1.3. Charakterisierung der VP2-Expression

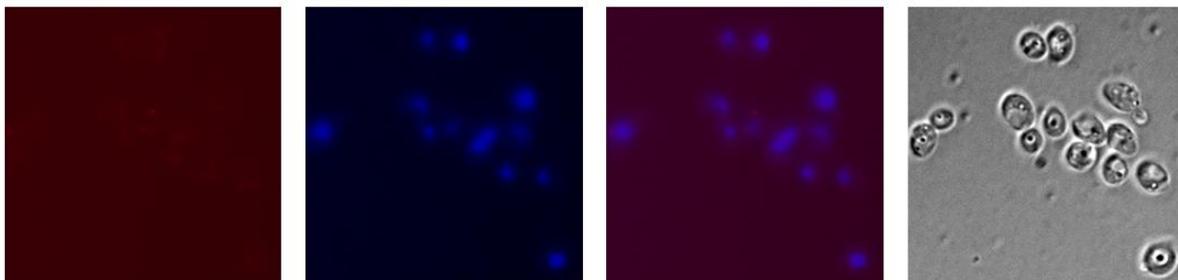
3.1.3.1. Lokalisierung von VP2 in der Hefezelle

Das IBD-Virus repliziert und assembliert im Cytoplasma von infizierten Zellen, wodurch die Proteine VP2, VP3, VP4 und VP1 auch hauptsächlich im Cytoplasma zu finden sind [146]. Für die Immunisierung war eine intrazelluläre Lokalisierung des Antigens von Interesse, um das Protein vor einer frühzeitigen Proteolyse zu schützen und somit möglicherweise den Vakzinierungserfolg durch eine Verkapselung zu steigern.

Um die Verteilung von VP2 in der Zelle zu untersuchen, wurde die Methode der indirekten Immunfluoreszenz (IF) gewählt. Dabei wurde nach einer Formaldehydfixierung das VP2-Protein über einen primären Antikörper gegen VP2 und einen Fluorochrom-konjugierten sekundären Antikörper detektiert. Zusätzlich wurden die Hefezellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) gefärbt, der sich an die DNA anlagert und somit die Zellkerne markiert.

Zunächst durchgeführte IF-Untersuchungen mit dem anti-IBDV Antiserum und einem Alexa Fluor® 555-markierten anti-*rabbit*-Antikörper in VP2-Expressionsstämmen wiesen ebenfalls im Kontrollstamm VAK367 eine starke unspezifische Antikörperfärbung auf (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde für die IF-Untersuchungen ein Stamm konstruiert, der ein VP2_{T2S}-Konstrukt exprimiert, welches am C-Terminus mit einem 1xHA-Epitop markiert wurde: VAK894 (VP2_{T2S}-HA-Tag). Als primärer Antikörper wurde ein anti-HA Antikörper (*mouse*) eingesetzt und als sekundärer ein Alexa Fluor® 555-markierter anti-*mouse* Antikörper. Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einem Zeiss Axioskop Fluoreszenzmikroskop über eine CCD-Kamera (Photometrix), mittels Differentialinterferenzkontrast im Durchlicht (DIK), sowie für die Fluorophore mit den entsprechenden Anregungsfiltern für DAPI und Cy3 betrachtet.

VAK367



VAK894 (VP2_{T2S}-HA-Tag)

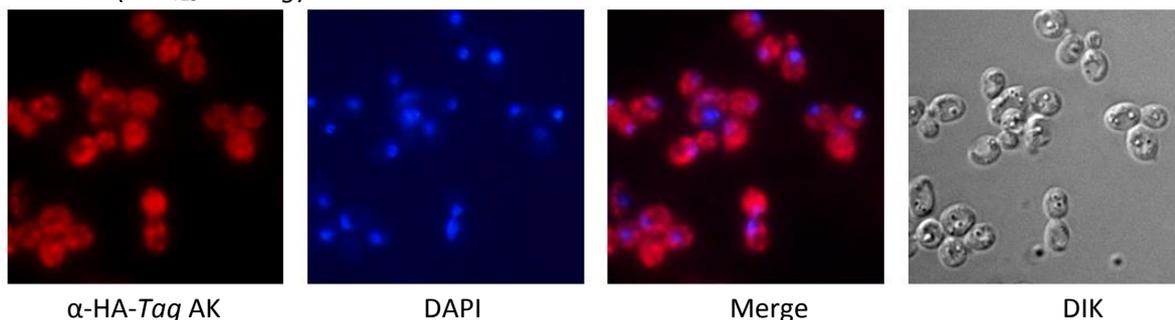


Abbildung 11: Immunfluoreszenz der Stämme VAK367 und VAK894 (VP2_{T2S}-HA-Tag). Für die IF wurden Zellen von VAK894 (VP2_{T2S}-HA-Tag) und dem Kontrollstamm VAK367 in 2 % Laktose YEP-Medium für 6 h kultiviert und mit Formaldehyd fixiert. Die Zellwand wurde mit Zymolyase gelöst und zur Markierung vom HA-Epitop-markierten VP2_{T2S} wurden die Hefen mit den Antikörpern anti-HA-Tag AK und anti-*mouse*-Alexa555 AK hybridisiert. Zum Anfärben der DNA wurde außerdem DAPI verwendet. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Zeiss Axioskop und den entsprechenden Anregungsfiltern für Alexa555 (VP2_{T2S}-HA-Tag; rot) und DAPI (blau) sowie mit Differentialinterferenzkontrast im Durchlicht (DIK).

Als Kontrollstamm wurde VAK367 mitgeführt, in dem nur eine schwache Immunfluoreszenz detektiert werden konnte, die als Hintergrundfärbung angenommen wurde (Abbildung 11). In dem

Stamm VAK894 (VP2_{T2S}-HA-Tag) wurde eine Immunfärbung im Bereich der gesamten Zelle nachgewiesen, wobei eine Überlagerung der Fluoreszenzsignale von DAPI und dem Antikörper (Merge) eine Aussparung im Zellkern zeigte. Außerdem wurde weniger Cy3-Signal in dem Bereich gemessen, wo in der DIK-Aufnahme die Vakuole zu sehen ist. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass VP2_{T2S}-HA-Tag hauptsächlich cytoplasmatisch lokalisiert ist.

3.1.3.2. Untersuchungen zur VP2-Kapsidassemblierung in den rekombinanten *K. lactis*-Stämmen

Bei der viralen Genexpression wird VP2 als Polyprotein translatiert, das anschließend durch VP4 autoproteolytisch in pVP2, VP4 und VP3 gespalten wird. Während der Kapsidassemblierung wird ein Großteil von pVP2 weiter prozessiert, indem vier Peptide vom C-Terminus abgespalten werden.

Nach der Expression von IBDV-Proteinen wurde die Ausbildung von vielfältigen Partikeln mit unterschiedlicher Proteinzusammensetzung beobachtet. So wurde für die pVP2-Expression in Insektenzellen tubuläre Strukturen mit einer Dichte von 1,142 bis 2,212 g/cm³ und mit einem Durchmesser von 16 bis 30 nm beschrieben. Im Gegensatz dazu führte die Expression von VP2 zur Ausbildung von unterschiedlich großen subviralen Partikeln (SVP) mit einer Triangulationszahl von T=1 oder T=13, die bei einer Dichte von 1,091 g/cm³ sedimentieren. Die Triangulationszahl beschreibt das Mengenverhältnis von Pentameren und Hexameren in der Kapsidstruktur und ist ein Maß für die Größe und Komplexität des Kapsids. VP2-SVPs setzen sich aus VP2-Trimeren zusammen, die sich wiederum zu Pentamere und Hexamere anordnen. T=1 Kapside beinhalten 20 Pentamere, wohingegen T=13 Partikel wie im Virion aus 12 Pentameren und 120 Hexameren gebildet werden. T=13 SVPs haben einen Durchmesser von 60-68 nm und die kleineren T=1 Kapside sind ca. 23 nm groß. In beiden SVPs ist VP2 wie in IBDV-Virionen als Trimer so exponiert, dass eine Immunogenität, die mit dem Virion vergleichbar ist, postuliert wurde [129]. Saugar *et al.* untersuchten verschiedene VP2-Konstrukte, bei denen die Länge des C-Terminus variierte, hinsichtlich der Ausbildung von Kapsiden [136]. Dabei stellten sie fest, dass die Expression der ersten 441 bzw. 456 Aminosäuren ausschließlich in VP2-Kapsiden und nicht in Tubuli resultiert. Konstrukte zwischen 443 und 452 Aminosäuren können sowohl T=1 als auch T=13 Strukturen ausbilden. Hingegen sind VP2-Konstrukte mit einer Aminosäurelänge von 456 ausschließlich in der Lage T=1 Kapside auszubilden.

Da für die VP2-Expression ein Konstrukt mit 456 Aminosäuren gewählt wurde, stellte sich die Frage, ob es in *K. lactis*-Zellen ebenfalls zur Ausbildung von Partikeln kommt. Für diese Untersuchung wurden zunächst aus 400 ml Kulturen von VAK890 (VP2_{T2S};GAL4) und VAK367 Proteinextrakte gewonnen und mit dem organischen Lösungsmittel Vertrel XF behandelt. Dabei handelt es sich um einen Freon-Ersatz, mit dem effektiv nicht-umhüllte Viren von Zelltrümmern getrennt werden können [131]; [147]. Anschließend wurde der Extrakt mittels Ultrazentrifugation über eine 18 %

Saccharose-Lösung gereinigt (Saccharose-Kissen) und in zwölf Fraktionen geerntet, wobei die letzte Fraktion das resuspendierte Pellet enthält. Diese Pellet-Fraktion wurde danach durch einen 18-54 % Saccharose-Gradienten zentrifugiert und anschließend in 18 Fraktionen geerntet (Abbildung 12A). Die Gradienten-Fractionen wurden schließlich hinsichtlich enthaltender VP2_{T2S}-Proteine im Immunblot (Abbildung 12C) untersucht und deren Dichte mittels Refraktometer bestimmt (Abbildung 12B).

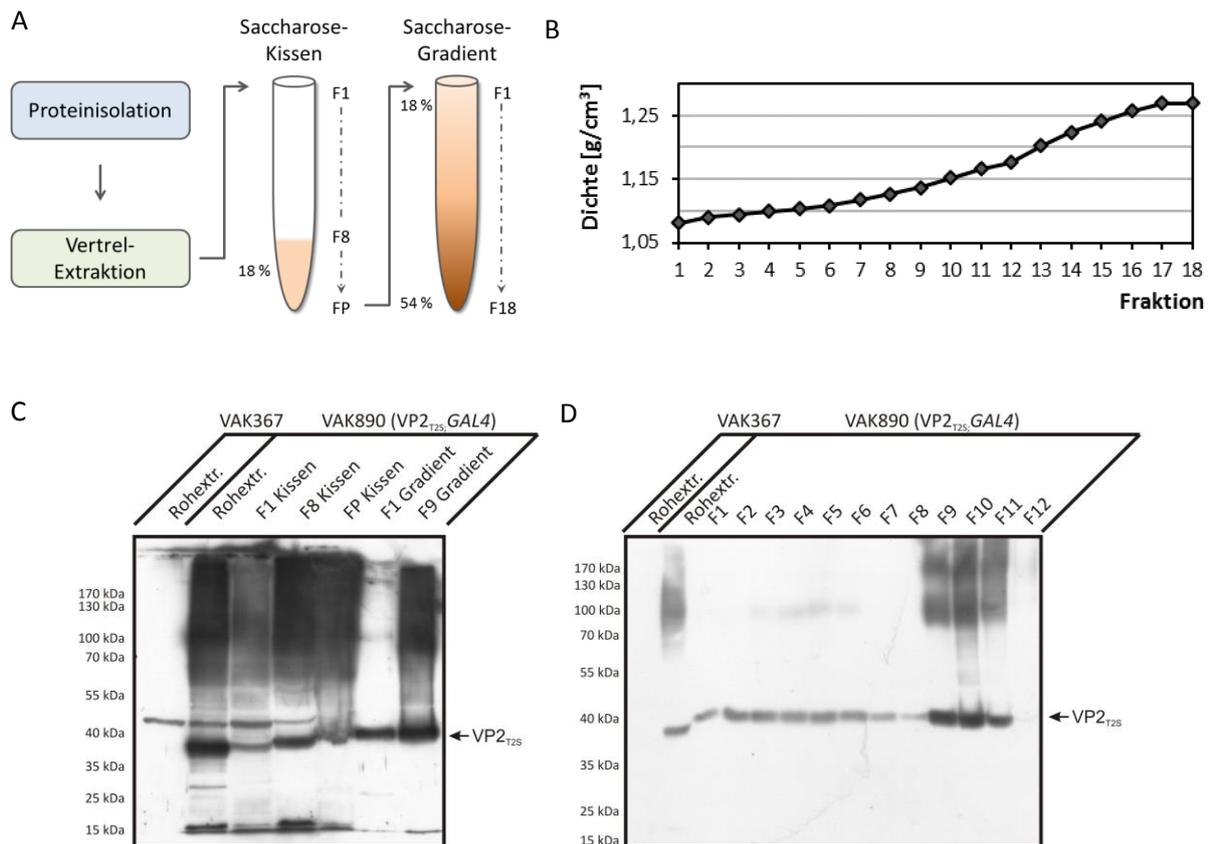


Abbildung 12: Versuch zur Aufreinigung von VP2_{T2S}-SVPs. **A:** Übersicht der Versuchsdurchführung. Von den Stämmen VAK367 (Kontrollstamm) und VAK890 (VP2_{T2S};GAL4) wurden Proteinextrakte aus 2.000 ODE mittels Glasperlen gewonnen und zweimal mit Vetrel XF extrahiert. Der Extrakt wurde anschließend durch ein 18 %iges Saccharose-Kissen zentrifugiert und die Pellet-Fraktion (FP) auf einen 18-54 %igen Saccharose-Gradienten geladen. **B:** Die Dichte der einzelnen Fraktionen (F) des Saccharose-Gradienten wurde mittels Refraktometer bestimmt. **C und D:** Proben der VP2_{T2S}-SVP-Reinigung und die Fraktionen des Gradienten wurden durch SDS-PAGE und Western Blot mittels anti-IBDV Antiserum und anti-mouse-HRP AK untersucht. Als Kontrolle wurde zusätzlich der Rohextrakt von VAK367 aufgetragen.

Während der Reinigung wurden Proben vom Proteinextrakt und Saccharose-Kissen genommen, die zusammen mit denen vom Saccharose-Gradienten durch einen Blot analysiert wurden (Abbildung 12C). Dabei wurde in F1 und F8 vom Saccharose-Kissen, die oberhalb des Saccharose-Kissens lagen, VP2_{T2S}-Protein nachgewiesen, was auf nicht assembliertes Protein hindeutet. Jedoch konnte VP2_{T2S} auch in den Fraktionen mit 18 % Saccharose und dem Pellet detektiert werden, wo die VP2-Kapside zu erwarten waren. Die anschließende Zentrifugation durch den Saccharose-Gradienten zeigte, dass VP2_{T2S} sich nicht ausschließlich bei einer Dichte sedimentierte, sondern in Fraktionen F1-F11 (1,08-1,16 g/cm³) nachweisbar war. Der Großteil wurde jedoch in den Fraktionen F9 bis F11 nachgewiesen.

Diese Fraktionen entsprechen mit einer Dichte von 1,14-1,16 g/cm³ dem Bereich, wo VP2-Tubuli zu erwarten wären, wohingegen VP2-SVPs bei ca. 1,091 g/cm³ sedimentieren.

Zur weiteren Analyse, ob die Fraktionen F1 und F9 Partikel enthielten, wurden die Proben an Dr. Dr. Gerd Hause (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) übergeben, der sie mittels Negativkontrastierung im Elektronenmikroskop untersuchte (Abbildung 13).

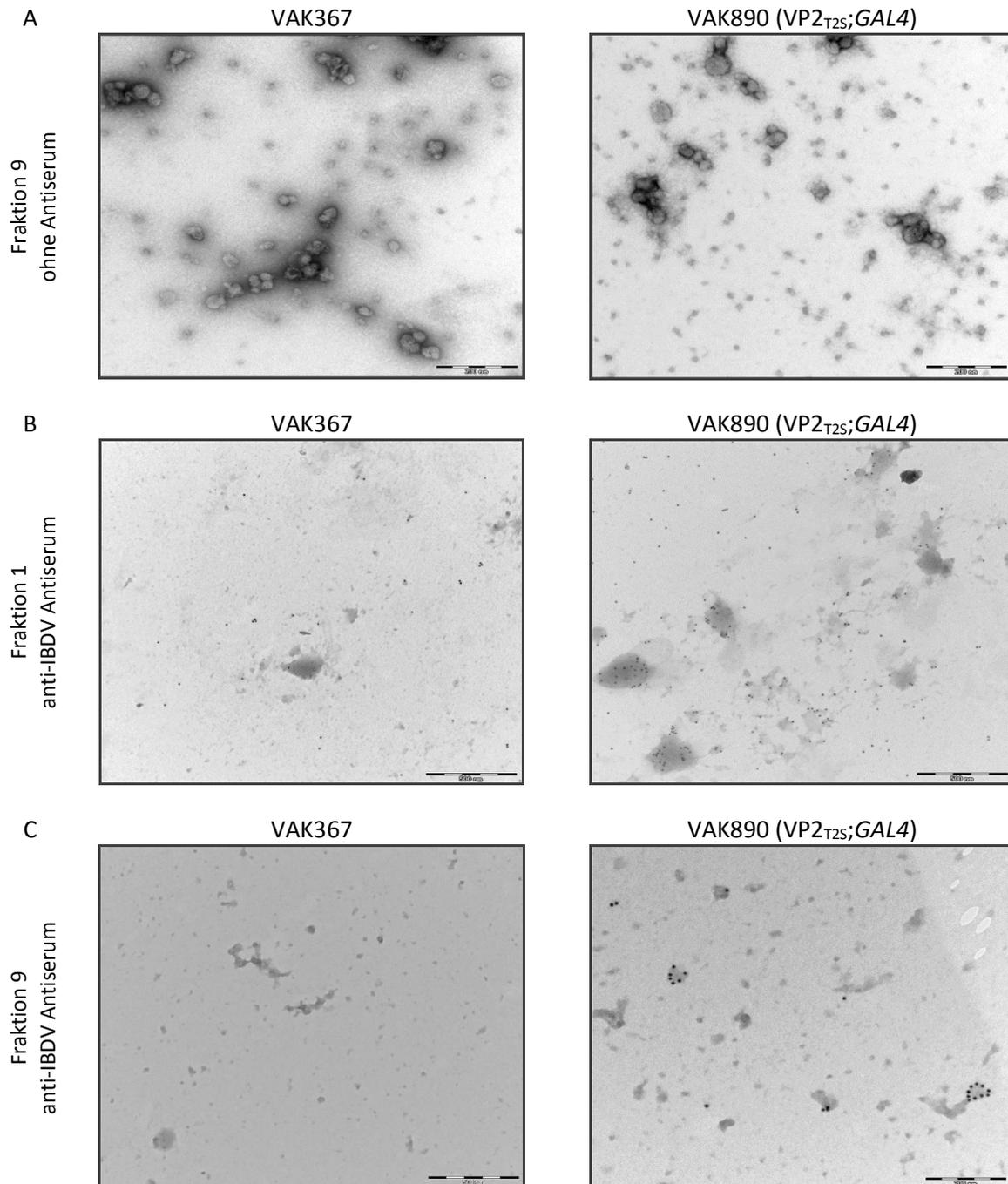


Abbildung 13: EM-Aufnahmen von VP2_{T2S} nach SVP-Reinigung. **A und B:** Die Fraktionen 1 und 9 des Saccharose-Gradienten der SVP-Reinigung, in denen VP2_{T2S} mittels Western Blot nachgewiesen werden konnte, wurden mittels Elektronenmikroskopie im Negativkontrast untersucht. **C:** Zusätzlich wurde die Fraktion 9 vor der Negativkontrastierung mit dem anti-IBDV Antiserum und anti-rabbit-10 nm Gold AK (Sigma Aldrich) markiert.

Die EM-Aufnahmen wiesen allerdings keine Strukturen auf, die im Kontrollstamm VAK367 nicht zu finden waren. Um die Strukturen im Negativkontrast näher zu untersuchen, wurde zusätzlich eine Immunogold-Markierung mit dem anti-IBDV Antiserum durchgeführt. Die Gold-gekoppelten Antikörper haben in der Fraktion 9 VAK890 (VP2_{T25};GAL4) zwar Strukturen markiert, jedoch konnten diese keinen regelmäßigen SVPs oder Tubuli zugeordnet werden.

Um auszuschließen, dass der Austausch der zweiten Aminosäure für die Kapsidassemblierung hinderlich war, erfolgten zusätzliche Untersuchungen mit dem Stamm VAK887 (VP2). Diese zeigten ebenfalls keine SVPs oder Tubuli (Daten nicht gezeigt). Da in *S. cerevisiae* für ein 452 Aminosäure-Konstrukt subvirale Partikel (T=1) beschrieben wurden, sollte eine Reinigung nach gleichem Protokoll aus *S. cerevisiae*-Zellen erfolgen [130]. Dafür wurde VP2_{T25} von einem Plasmid exprimiert (pPGK_VP2_{T25}). Dabei sedimentierte VP2_{T25} wie bei *K. lactis* mit einer Dichte von 1,13-1,17 g/cm³ und es konnten erneut keine definierten Partikel elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden. Aus den Ergebnissen wurde geschlussfolgert, dass entweder SVPs, die zuvor in der Zelle vorhanden waren, während der Reinigung disassemblieren oder dass die Partikelbildung aus nicht ermittelbaren Gründen mit den hier gewählten Konstrukten und Versuchsbedingungen nicht erfolgte.

3.1.3.3. Abschätzung der VP2_{T25}-Proteinmenge in der Zelle

Für anstehende Immunisierungsstudien war es von Interesse, die produzierte VP2_{T25}-Proteinmenge im Stamm VAK890 (VP2_{T25};GAL4) zu bestimmen. Die Fremdproteinexpression in *K. lactis*-Zellen ist anders als beispielsweise in *E. coli* nicht ausreichend hoch, um ein rekombinantes Protein im Coomassie-gefärbten SDS-Gel eindeutig zu identifizieren. Eine vorherige Reinigung, wie zum Beispiel über den Dichtegradienten, geht mit deutlichen Proteinverlusten einher und eignet sich daher ebenfalls nicht für eine Quantifizierung. Aus diesem Grund erfolgte eine Abschätzung mittels Western Blot und einem VP2_{T25}-Standard. Der VP2_{T25}-Standard wurde aus dem Stamm VAK367, welcher mit dem Plasmid pTS32x_ADH1-P_VP2_{T25} transformiert war, mittels Saccharose-Kissen und -Gradient gewonnen. Das *multicopy* Plasmid pTS32x basiert auf dem pKD1-Vektor und wurde mit dem konstitutiven Promoter des *ADH1*-Gens aus *S. cerevisiae* und dem VP2_{T25}-Gen kombiniert. Durch die episodale Expression war die Proteinausbeute im Vergleich zur integrativen Expression deutlich höher, wodurch das gereinigte VP2_{T25} im Coomassie-gefärbten Gel sichtbar war. Als Standard wurde gereinigtes VP2_{T25} vom Saccharose-Gradienten (Fraktion 9) genutzt (vgl. 3.1.3.2), bei dem zuvor ebenfalls die Konzentration an VP2_{T25} ermittelt werden musste. Hierfür wurde auf ein Coomassie-gefärbtes SDS-Gel definierte Mengen Bovines Serumalbumin (BSA) und 14 µl des gereinigten VP2_{T25} aufgetragen und anschließend densitometrisch ausgewertet (Abbildung 14). Als Negativkontrolle wurde der Kontrollstamm VAK367 Stamm aufgetragen, der außerdem als Hintergrundreferenz diente und vom VP2_{T25}-Signal subtrahiert wurde. Darauf folgend wurde ein Immunblot durchgeführt, bei

dem definierte $VP2_{T25}$ -Mengen mit Proben einer Fermentation des Stammes ($VP2_{T25};GAL4$) (durchgeführt von Katja Schulze) verglichen wurden. Bei den Proben 1 bis 3 handelte es sich um *fed-batch* Fermentationsprozesse mit unterschiedlichen Fütterungsprofilen (exponentiell [1], linear [2] und konstant [3]) von einer 2,5fach YEP + 200 g/L Laktose-Lösung. Für den Blot wurden 2 ODE untersucht, was ca. sechs Millionen Zellen entspricht (Katja Schulze, persönl. Mitteilung). Die Probe 1 war außerhalb der Standardreihe und konnte deshalb nicht ausgewertet werden. Für die Proben 2 und 3 konnte eine ungefähre $VP2_{T25}$ -Proteinmenge von 0,34 bzw. 0,7 fg pro Hefezelle ermittelt werden.

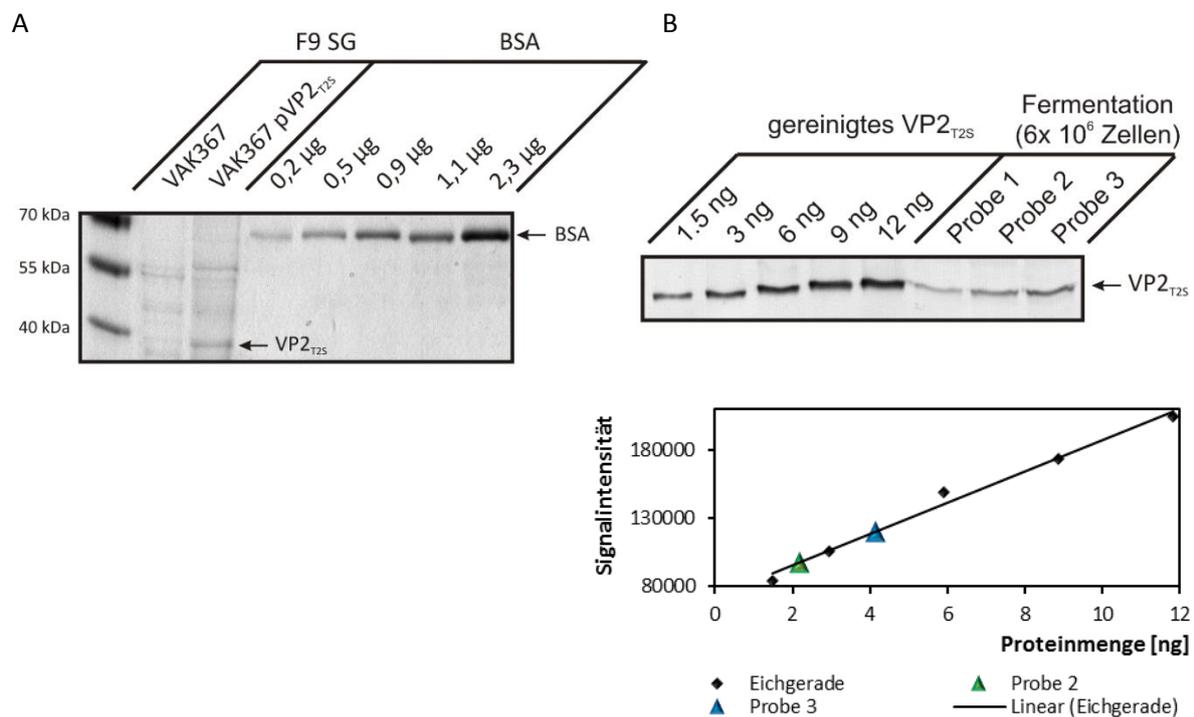


Abbildung 14: Quantifizierung der $VP2_{T25}$ -Menge in VAK890 ($VP2_{T25};GAL4$). **A:** Etablierung eines $VP2$ -Standards zur Quantifizierung mittels Western Blots. Gereinigtes $VP2_{T25}$ -Protein (Gradienten-Fraktion 9 der SVP-Reinigung) von VAK367-Hefen, die mit dem Plasmid pTS32x_ADH1-P_ $VP2_{T25}$ transformiert waren, wurde zusammen mit definierten Mengen BSA mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend Coomassie gefärbt. Zur Bestimmung der $VP2_{T25}$ -Konzentration in dieser Fraktion wurde das Gel densitometrisch ausgewertet. Als Negativkontrolle und Hintergrund wurde die gleiche Fraktion von nicht-transformierten VAK367-Hefezellen genutzt. **B:** Davon wurden schließlich definierte Mengen $VP2_{T25}$ zusammen mit Fermentationsproben des Stammes VAK890 ($VP2_{T25};GAL4$) im Western Blot untersucht. Die Proben stammen aus drei parallel laufenden *fed-batch* Versuchen mit exponentiellen (Probe 1), linearen (Probe 2) und konstanten (Probe 3) Fütterungsprofilen einer 2,5fachen YEP + 200 g/L Laktose-Lösung. Für die Analyse wurden 2 ODE (ca. 6×10^6 Zellen) aufgetragen. Die Markierung von $VP2_{T25}$ erfolgte mit anti-IBDV Antiserum und einem anti-*mouse*-HRP und entwickelt wurde der Western Blot mittels DAB-Färbung. Unten: Densitometrische Auswertung des $VP2_{T25}$ -Signals (Signalintensität) im DAB-gefärbten Western Blot erfolgte mit der Software Image Lap 3.0 (BioRad). Für die Probe 3 wurde eine Proteinmenge von 0,7 fg pro Hefezelle bestimmt.

3.1.3.4. Proteinstabilität nach Hitze-Inaktivierung der Hefen

Die orale Vakzinierung von Mäusen sollte mit Hefezellen erfolgen, die abgetötet, lyophilisiert und pulverisiert wurden. Da Hühner im Gegensatz zu Mäusen ihre Nahrung nicht in Pulverform aufnehmen können, wurde hier für die orale Immunisierung eine Pelletproduktion notwendig. Dafür

sollte das Hefepulver zusammen mit Futter zu Pellets gepresst werden. Für die subkutane Applikation wurde die abgetötete, lyophilisierte und pulverisierte Hefe vor der Injektion solubilisiert und ggf. mit Freund's Adjuvans versetzt (vgl. 2.4).

Der Einsatz von inaktivierten Hefen hat mehrere Vorteile; zum einen gelten die applizierten Hefen als sicher, da sie sich nicht mehr vermehren können. Zum anderen kann keine Proteinsynthese mehr stattfinden, wodurch die eingesetzte Antigenmenge definiert bleibt. Bei diesem Procedere war es allerdings wichtig, dass das VP2_{T25}-Protein nach der Inaktivierung und Lyophilisierung der Zellen nicht degradiert und möglichst in seiner nativen Form vorliegt. Erste Versuche, bei denen die Hefen nach der Fermentation geerntet und in einer Suspension für 20 min bei 80 °C behandelt wurden, zeigten, dass alle Zellen inaktiviert werden konnten. Allerdings konnte in Western Analysen mit Proteinrohextrakten kein lösliches VP2_{T25}-Protein detektiert werden, was vermutlich auf eine Denaturierung zurückzuführen war. Die subkutane Immunisierung von Mäusen und mit diesen Hefen führte zu keinen, im ELISA nachweisbaren, Antikörpern (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde das Zellpellet zuerst lyophilisiert und anschließend hitze-inaktiviert. Mit diesem Protokoll blieb VP2_{T25} löslich. Nach der Lyophilisierung waren bereits 99,9 % der Zellen inaktiv, jedoch war für die vollständige Inaktivierung noch eine anschließende zweistündige Hitzebehandlung bei 90 °C notwendig.

Für Immunisierungsversuche mit Hühnern wurden die Stämme VAK367 und VAK890 (VP2_{T25};GAL4) von der Firma ORGANOBALANCE GmbH (Berlin) im *fed-batch* Verfahren fermentiert. Anschließend wurden die Hefen getrocknet und für zwei Stunden im Hybridisierungssofen bei 90 °C inaktiviert. Die Inaktivierung wurde durch Ausplattieren überprüft, wobei von ca. 10¹⁰ Zellen im Fall von VAK367 eine Kolonie und beim Stamm VAK890 (VP2_{T25};GAL4) kein Wachstum beobachtet werden konnte. Schließlich wurden in Kooperation mit Dr. Michael Bulang (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, nutztierwissenschaftliches Zentrum Merbitz) die *K. lactis*-Hefen mit Hühnerfutter im Verhältnis 1:20 gemischt und pelletiert. Im Western Blot wurden die Hefezellen hinsichtlich der VP2_{T25}-Stabilität überprüft. Dafür wurden die getrockneten und hitze-inaktivierten Hefen sowie die Futterpellets in Wasser gelöst und ein Zellaufschluss wie für die Fermentationsproben durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass es zu keinem deutlichen Verlust der löslichen VP2_{T25}-Proteinmenge kam (Abbildung 15.)

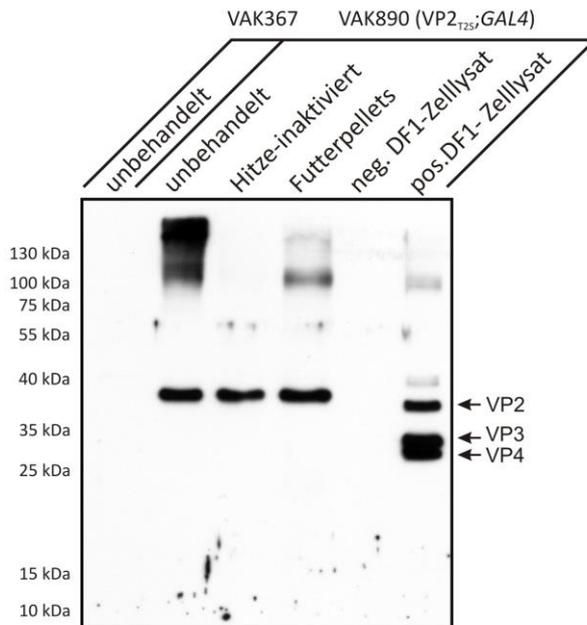


Abbildung 15: WB mit inaktivierten Zellen und Hefe-Futterpellets. Vergleichbare Proteinmengen von unbehandelten, hitze-inaktivierten und pelletierten Hefen (Futterpellets für Hühnerversuche) von VAK890 (VP2_{T2S};GAL4) wurden im Western Blot mit anti-IBDV Antiserum und anti-*mouse*-HRP Antikörper untersucht. Als Kontrolle wurden unbehandelte Hefeproben vom Kontrollstamm VAK367 und DF1-Lysate von IBDV-infizierten und nicht-infizierten Zellen (neg. und pos. DF1-Zelllysate) aufgetragen.

3.1.4. Vakzinierung mit rekombinanter Hefe gegen IBD

3.1.4.1. Orale und subkutane Immunisierung mit VP2-exprimierenden Hefen (Mäuse)

Ob eine Immunisierung mit den generierten und optimierten Hefen Erfolg versprechend ist, wurde zunächst im Mausmodell getestet. Die Versuche mit Mäusen erfolgten am Zentrum für Angewandte Medizinische und Humanbiologische Forschung der MLU Halle-Wittenberg durch Dr. Hendryk Aurich. Dafür wurde der Expressionsstamm VAK890 (VP2_{T2S};GAL4) verwendet, da die Sequenz-optimierten Stämme VAK910 (oVP2_{T2S}) und VAK911 (oVP2_{T2S};GAL4) zu diesem Zeitpunkt noch nicht generiert waren. Als Negativkontrolle wurde VAK367 eingesetzt. In diesem Versuch wurde die orale und subkutane Applikationsform getestet. Für die orale Vakzinierung wurden die Mäuse mit Futter in Pulverform gefüttert, welches 5 % rekombinante Hefe beinhaltete. Zum Vergleich welchen Einfluss die Hitze-Inaktivierung hat, kamen nur lyophilisierte (lebende) bzw. lyophilisierte und anschließend hitze-inaktivierte (inaktive) Hefe zum Einsatz. Die Hefe-Fütterung erfolgte nach einem Protokoll, das in ersten Versuchen für die Vakzinierung von Mäusen mit E2-BVDV-Hefen vielversprechend war (Daten des VAKZINOVA-Projekts). Dabei wurde für zwei Perioden je 14 Tage lang mit einer 14tägigen Pause gefüttert. 14 Tage nach der letzten Hefegabe wurde den Mäusen das Blut entnommen und daraus die Seren isoliert. Zur subkutanen Applikation wurde die getrocknete und hitze-inaktivierte Hefe in PBS gelöst und zusammen mit kompletten bzw. inkompletten Freund's Adjuvans (KFA bzw. IFA) in die Bauchseite injiziert. Dabei wurden dreimal im Abstand von 14 Tagen je 100 µg Hefetrockenmasse verabreicht (Abbildung 16A). 14 Tage nach der letzten Applikation wurde den Tieren Blut entnommen und Serum isoliert.

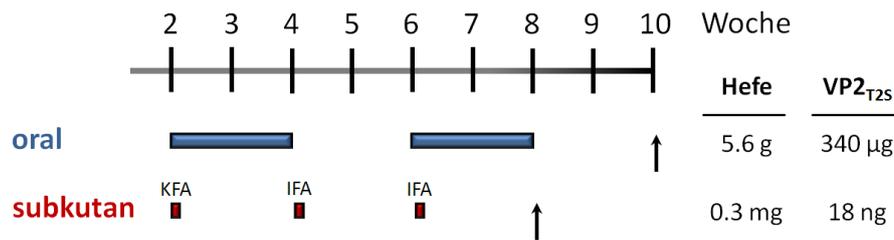


Abbildung 16: Schematische Übersicht der Immunisierungsversuche mit Mäusen und VP2_{T2S}-Hefe. Sechs Wochen alte Mäuse wurden mit VAK367 oder VAK890 (VP2_{T2S};GAL4) Hefen oral (blau) bzw. subkutan (rot) vakziniert. Die orale Vakzinierung erfolgte für zwei 14tägige Perioden mit 2 g pulverisierter Hefe pro Tag. Die subkutane Immunisierung mit 0,1 mg rekombinanter Hefe erfolgte zusammen mit kompletten bzw. inkompletten Freund's Adjuvans (KFA bzw. IFA) dreimal im Abstand von 14 Tagen. Die Gesamtmenge an applizierter Hefe und sich daraus ergebenden VP2_{T2S}-Menge ist rechts aufgelistet. 14 Tage nach der letzten Hefegabe wurden die Tiere euthanasiert und zur Untersuchung der Immunantwort Blut entnommen (Pfeil).

Die gewonnenen Seren wurden nach IBDV-spezifischen Antikörpern im ELISA und Serumneutralisationsassay (in Kooperation mit Dr. Egbert Mundt, Universität von Georgia) untersucht. Für den ELISA wurde ein für Hühnerseren entwickeltes, kommerzielles Kit der Firma IDEXX verwendet, mit dem Antikörper gegen alle viralen IBDV-Proteine erkannt werden sollten. Um das Kit für die Mäuseseren nutzen zu können, wurde das enthaltene (Ziege) anti-chicken-HRP-Konjugat gegen einen (Ziege) anti-mouse-HRP Antikörper ersetzt. Als Positivkontrolle wurde der monoklonale Antikörper R63, der gegen das IBDV-VP2 gerichtet ist, verwendet [122]. Die Negativkontrollen erfolgten mit Mäuseseren, die Hefen vom Stamm VAK367 verabreicht bekamen. Die Ergebnisse des ELISAs sind in Abbildung 17A zusammengefasst. Es zeigte sich, dass nach subkutaner Verabreichung von VP2_{T2S}-Hefe IBDV-bindende Antikörper detektiert werden konnten. Dabei ist die gemessene optische Dichte für zwei Seren aus der subkutanen Gruppe vergleichbar mit der des monoklonalen Antikörpers R63. Die Seren von oral vakzinierten Mäusen zeigten ein deutlich geringeres Antikörpersignal. Dennoch wurden mit zwei Seren Werte erzielt, die über denen der Kontrollgruppe (VAK367 lebend) lagen. Die orale Immunisierung mit naiven VP2_{T2S}-Hefen (lebend) schien nicht erfolgreich, da hier keine Antikörper detektiert werden konnten. Die ermittelten Werte im ELISA sind sowohl für die Seren als auch für den monoklonalen Antikörper relativ gering, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass in den Seren und im Antikörper R63 nur Antikörper gegen VP2 und nicht gegen andere IBDV-Proteine enthalten sein können. Außerdem könnte der ausgetauschte sekundäre Antikörper für die geringe Substratumsetzung (Blaufärbung) verantwortlich sein.

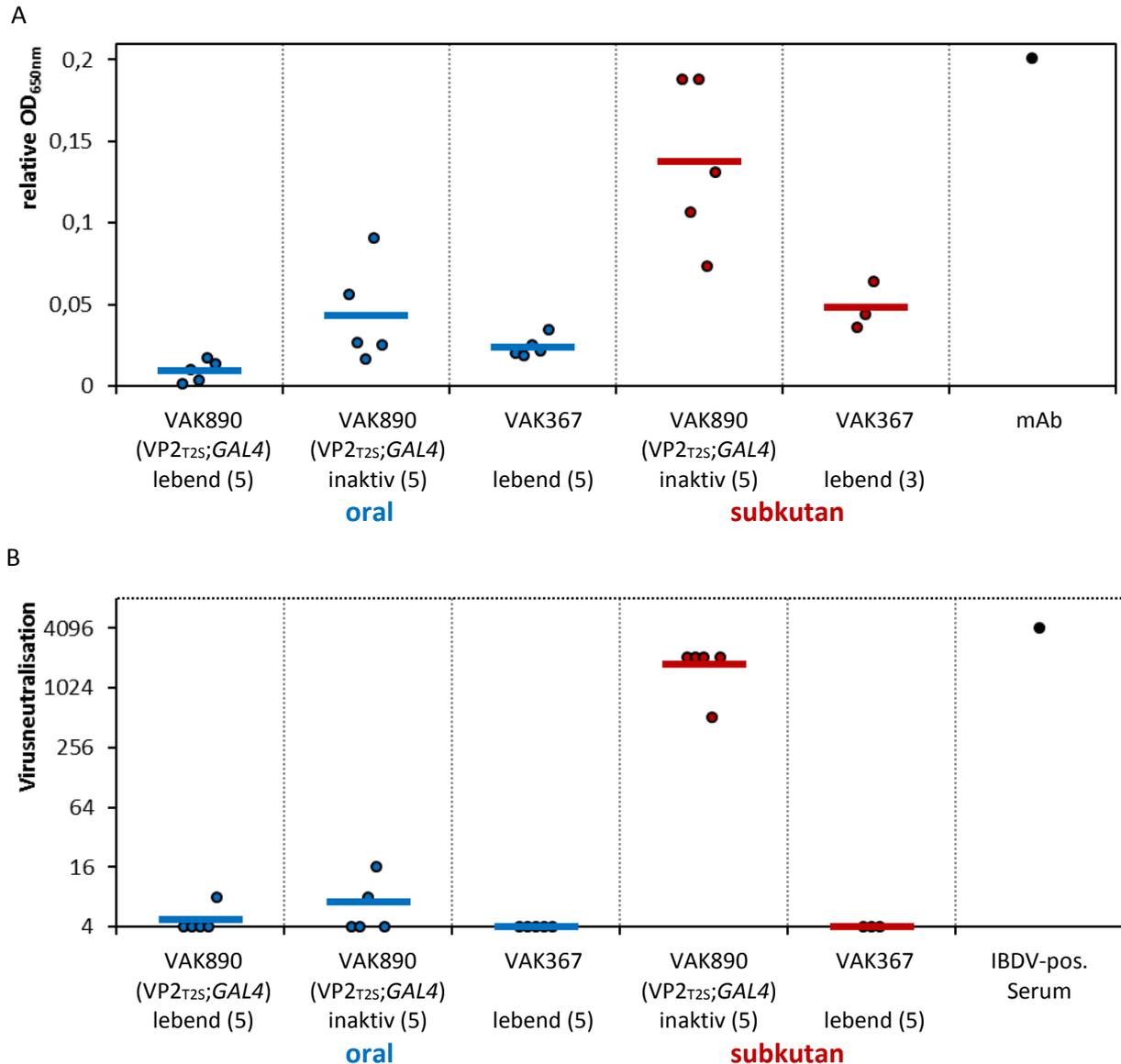


Abbildung 17: ELISA und Serumneutralisationsassay nach der Immunisierung von Mäusen mit VP2_{T2S}. **A:** Die ELISA-Ergebnisse wurden mit dem *Infectious Bursal Disease Virus Antibody Test Kit* (IDEXX) ermittelt. Dafür wurden die Seren 1:50 verdünnt eingesetzt und als sek. Antikörper wurde anti-mouse-HRP AK (Sigma Aldrich) verwendet. Als positive Kontrolle wurde der monoklonale anti-VP2 AK R63 mitgeführt (schwarz). Dargestellt sind die gemessenen OD₆₅₀-Werte der einzelnen Seren (Punkte) und der ermittelte Gruppendurchschnitt (Balken). Die Anzahl der Tiere pro Gruppe ist in Klammern angegeben. **B:** Der Virusneutralisationsassay wurde mit DF1-Zellen und dem Virus D78 durchgeführt. Dargestellt ist die Serum-Verdünnung, bei der noch eine Neutralisation des Virus beobachtet wurde. Als positive Kontrolle wurde ein Serum von einem IBDV-infizierten Huhn verwendet.

Der Serumneutralisationsassay erfolgte mit dem Laborstamm D78. Hierfür wurden die Seren seriell in einer 1:2 Verdünnung mit gleichbleibendem Virustiter inkubiert und anschließend auf DF1-Zellen gegeben. Nach sechs Tagen wurden die Fibroblasten mikroskopisch untersucht und beurteilt. Dabei ergab die höchste Serumverdünnung, bei der kein cytopathischer Effekt der DF1-Zellen zu beobachten war, den Antikörpertiter (Abbildung 17B). Als Positivkontrolle für den Assay wurde ein Serum verwendet, das von einem IBDV-infizierten Küken isoliert wurde. Die Testergebnisse bestätigten die ELISA-Daten. Nach subkutaner Immunisierung wurden hohe Neutralisationstiter bestimmt, die dem des Positivserums entsprachen. Nach oraler Vakzinierung konnten mit drei von

zehn Seren (lebend und inaktiv) eine Neutralisation des Virus beobachtet werden, die allerdings nahe des Grenzwertes (8) lag. Jedoch konnte aufgrund der kleinen Gruppengrößen und den schwachen Antikörpertitern kein Unterschied zwischen der inaktivierten und lebenden Hefe beobachtet werden. In den Kontrollgruppen (VAK367) konnte nach subkutaner und oraler Verabreichung keine Neutralisation festgestellt werden.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Immunisierung mit VP2_{T25}-Hefezellen eine Immunantwort in Mäusen induzierte, bei denen auch IBDV-neutralisierende Antikörper gebildet wurden. Die orale Immunisierung ist allerdings hierbei sehr viel ineffizienter als eine subkutane Vakzinierung.

3.1.4.2. Subkutane Immunisierung mit verschiedenen VP2_{T25}-Hefen (*S. cerevisiae* und *K. lactis*)

Im folgenden Immunisierungsversuch stellte sich die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen der applizierten VP2_{T25}-Menge und der Intensität der Antikörperantwort gibt. Dazu wurden gleiche Mengen der Stämme VAK890 (VP2_{T25};GAL4) und VAK911 (oVP2_{T25};GAL4) zusammen mit der Negativkontrolle VAK367 verabreicht. Außerdem wurden *K. lactis*-Hefen vom Stamm VAK367 eingesetzt, die mit dem *multicopy* Plasmid pTS32x_ADH1-P_VP2_{T25} transformiert waren (VAK367 pVP2_{T25}), das den Alkoholdehydrogenase-Promoter und VP2_{T25} trägt bzw. solche, die mit dem Leervektor pTS32x (VAK367 LV) transformiert worden waren. Außerdem sollten die beiden Hefespezies *S. cerevisiae* und *K. lactis* verglichen werden, um zu untersuchen, ob eine der beiden Hefen eine stärkere VP2_{T25}-Immunantwort induziert. Hierfür wurde der *S. cerevisiae*-Stamm W303-1a mit dem *multicopy* Plasmid pPGK_VP2_{T25} transformiert, welches das VP2_{T25} kodierte (*S. cerevisiae* pVP2_{T25}), und als Kontrolle wurde W303 mit dem Leervektor pPGK transformiert (*S. cerevisiae* LV). Für den Versuch erfolgte die Anzucht der Hefestämme VAK367, VAK890 (VP2_{T25};GAL4) und VAK911 (oVP2_{T25};GAL4) in 2 % Laktose-Vollmedium und der Hefen *S. cerevisiae* mit LV, *S. cerevisiae* mit pVP2_{T25}, VAK367 mit LV und VAK367 mit pVP2_{T25} unter Selektionsdruck in 2 % Glukose-Minimalmedium (vgl. 2.4). Anschließend wurden die geernteten Zellen lyophilisiert, hitze-inaktiviert und im Western Blot auf VP2_{T25} untersucht. Dabei zeigte sich, dass die *S. cerevisiae* pVP2_{T25}-Hefen in etwa gleiche VP2_{T25}-Mengen wie VAK367 pVP2_{T25} exprimierten. Außerdem war die VP2_{T25}-Menge vom *multicopy* Plasmid höher als in den Stämmen mit integriertem VP2_{T25}-Gen (Abbildung 18A). Für die Immunisierung erfolgte die Applikation subkutan mit kompletten bzw. inkompletten Freund's Adjuvans. Dabei wurden je fünf Mäuse pro Gruppe dreimal im Abstand von 14 Tagen mit 100 µg Hefen (Trockenmasse) immunisiert (Abbildung 18B). Weitere 14 Tage nach der letzten Applikation wurde den Tieren Blut entnommen und das Serum isoliert.

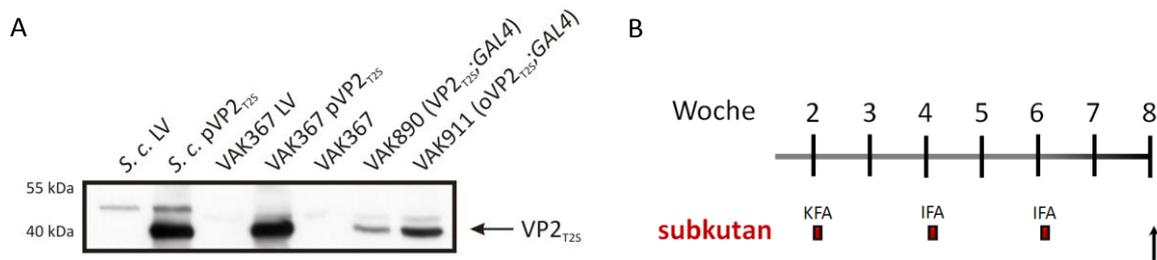


Abbildung 18: Übersicht des Immunisierungsversuchs mit Mäusen und verschiedenen VP_{2T25}-Hefen. **A:** Western Blot der *S. cerevisiae* und *K. lactis*-Hefen, die mit Leervektor (LV) bzw. pPGK_VP_{2T25} oder pTS32X_ADH1-P_VP_{2T25} (pVP_{2T25}) transformiert waren; sowie der *K. lactis*-Stämme VAK367, VAK890 (VP_{2T25};GAL4) und VAK911 (oVP_{2T25};GAL4). Die Plasmidtragenden Hefen wurden in 2 % Glukose YNB-Medium und die VP_{2T25}-Stämme in 2 % Laktose YEP-Medium angezogen. Die Zellen wurden anschließend lyophilisiert und hitze-inaktiviert. Zum Nachweis von VP_{2T25} wurden ca. 55 µg der getrockneten und inaktivierten Hefe aufgetragen und mit anti-IBDV Antiserum und anti-mouse-HRP Antikörper im WB markiert. **B:** Sechs Wochen alte Mäuse wurden mit *S. cerevisiae* LV bzw. pVP_{2T25}, oder *K. lactis* VAK367 LV bzw. pVP_{2T25}, VAK890 (VP_{2T25};GAL4) und VAK911 (oVP_{2T25};GAL4) Hefen subkutan (rot) vakziniert. Die Immunisierung erfolgte mit 0,1 mg rekombinanter Hefe zusammen mit kompletten bzw. inkompletten Freund's Adjuvans (KFA bzw. IFA) dreimal im Abstand von 14 Tagen. 14 Tage nach der letzten Hefegabe wurden die Tiere euthanasiert und zur Untersuchung der Immunantwort Blut entnommen (Pfeil).

Die gewonnenen Seren wurden erneut im ELISA (IDEXX) auf enthaltene anti-VP2-Antikörper untersucht, wobei als positive Kontrolle erneut der monoklonale VP2-Antikörper R63 (mAb) eingesetzt wurde (Abbildung 19). Zu beobachten war, dass die applizierte VP_{2T25}-Menge mit der Menge an detektierten anti-VP2-Antikörpern korrelierte. Außerdem konnte kein Unterschied in der Antikörperantwort zwischen den beiden verabreichten Hefespezies festgestellt werden.

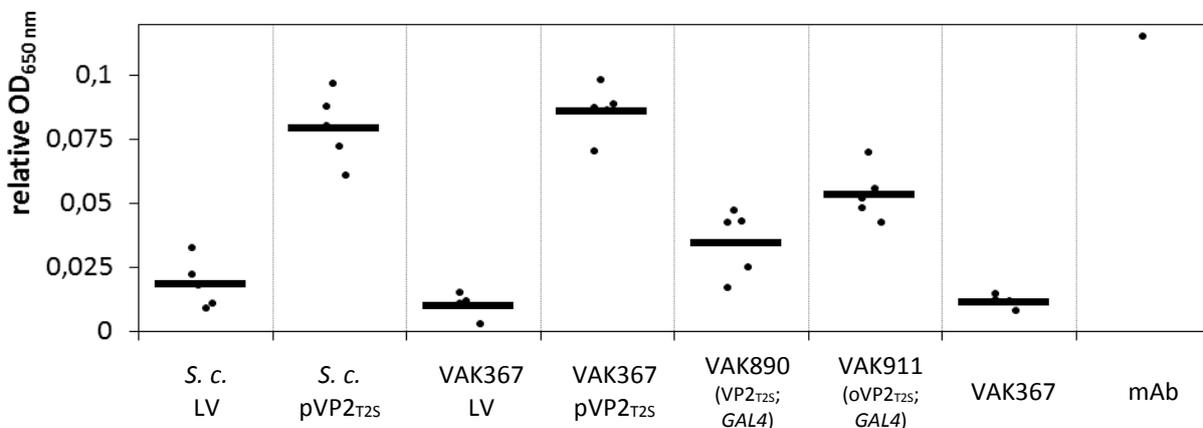


Abbildung 19: ELISA-Daten nach subkutaner Immunisierung von Mäusen mit verschiedenen VP_{2T25}-Hefen. Die ELISA-Ergebnisse wurden mit dem *Infectious Bursal Disease Virus Antibody Test Kit* (IDEXX) ermittelt. Dafür wurden die Seren 1:50 verdünnt eingesetzt und als sek. Antikörper wurde anti-mouse-HRP AK (Sigma Aldrich) verwendet. Als positive Kontrolle wurde der monoklonale anti-VP2 AK R63 mitgeführt. Dargestellt sind die gemessenen OD₆₅₀-Werte der einzelnen Seren (Punkte) und der ermittelte Gruppenschnitt (Balken).

3.1.4.3. Orale und subkutane Vakzinierung von Hühnern gegen IBD

Nach den vielversprechenden Vakzinierungsexperimenten mit Mäusen wurden die VP_{2T25}-Hefen in Hühnern getestet. Diese Versuche erfolgten am PDRC in Athens, Georgia unter Anleitung von Dr. Egbert Mundt mit 14 Tage alten Leghorn Hühnern. Entsprechend dem größeren Gewicht von Hühnern im Vergleich zu Mäusen wurde die subkutane Hefemenge verzehnfacht und bei der

Fütterung wurde dem Alter der Tiere entsprechend die Menge angepasst, wobei das Futter stets 5 % Hefe enthielt. Für die subkutane Vakzinierung wurde die getrocknete und hitze-inaktivierte Hefe (vgl. 2.5.2) mit inkompletten Freund's Adjuvans verabreicht. Ein Teil der Gruppen, die oral immunisiert wurden, erhielt einen Tag vor den beiden Fütterungsperioden das orale Adjuvans Saponin von dem Seifenrindenbaum *Quillaja saponaria* (oral + Sap.). Hierfür ist beschrieben, dass es die Permeabilität der intestinalen Mukosa erhöht und damit eine Antigenaufnahme nach oraler Vakzinierung verstärken soll [148]. Als Kontrollgruppen wurden Hühner die Kontrollhefe VAK367 oder nur Futter ohne Hefeanteil, jedoch das entsprechende Adjuvans verabreicht (mock). Als VP2_{T2S}-Stamm wurde der Stamm VAK890 (VP2_{T2S};GAL4) verwendet, da die Codon-optimierten Stammvarianten zu diesem Zeitpunkt noch nicht vorlagen. Einen Tag vor jeder neuen Immunisierungsperiode wurde den Hühnern Blut entnommen und das Serum auf enthaltene Antikörper untersucht. 14 Tage nach der letzten Applikation erfolgte ein Challenge, wobei die Tiere mit dem klassischen IBDV-Stamm Edgar oral infiziert wurden. Nach der Infektion wurden die Hühner sieben Tage lang beobachtet (Mortalität). Anschließend wurde den Tieren die *Bursa fabricii* für histologische Untersuchungen entnommen und auf Läsionen untersucht. Das Immunisierungsschema und die verabreichten Hefe- bzw. VP2_{T2S}-Mengen sind in der Abbildung 20 zusammengefasst.

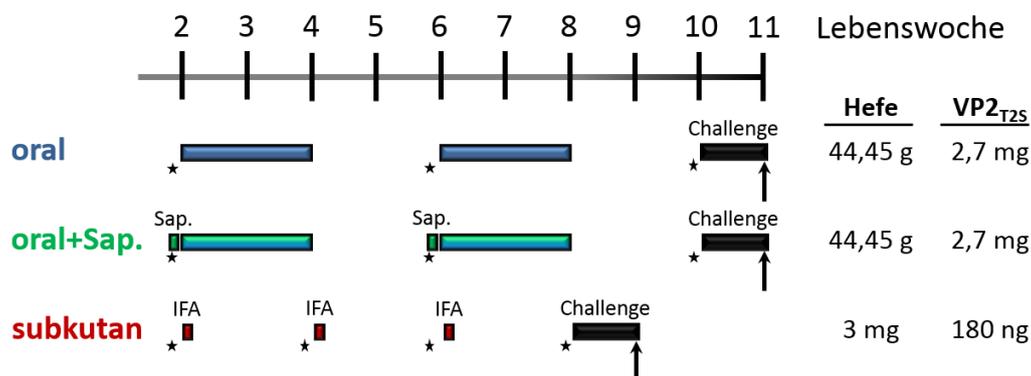


Abbildung 20: Schematische Übersicht der Immunisierungsversuche mit Hühnern und VP2_{T2S}-Hefen. 14 Tage alte Hühner wurden mit VAK367 oder VAK890 (VP2_{T2S};GAL4) Hefen oral (blau) bzw. subkutan (rot) vakzinisiert. Die orale Verabreichung erfolgte für zwei 14tägige Perioden mit Futterpellets, die 5 % rekombinante Hefe enthielten. Bei einer Versuchsreihe wurde einen Tag vor der Fütterungsperiode das orale Adjuvans Saponin verabreicht (grün). Die subkutane Immunisierung erfolgte mit 1 mg rekombinanter Hefe/IFA dreimal im Abstand von 14 Tagen. Die Gesamtmenge an applizierter Hefe und die sich daraus ergebenden VP2_{T2S}-Mengen sind rechts aufgelistet. 14 Tage nach der letzten Hefegabe erfolgte ein Challenge-Versuch mit dem klassischen IBDV-Stamm Edgar (schwarzer Balken). Jeweils einen Tag vor jeder Applikation und dem Challenge wurde den Tieren Blut entnommen (Stern). Sieben Tage nach der Infektion wurden die Hühner euthanasiert und die Bursa für histologische Untersuchungen entnommen (Pfeil).

Die Seren wurden im ELISA und Serumneutralisationsassay untersucht. Im Gegensatz zu den Mäuseversuchen konnten hier die ELISA-Titer nach Herstellerangaben mit dem Kit der Firma IDEXX bestimmt werden. Als Kontrollen für beide Assays wurde das Serum von einem spezifisch pathogenfreien Huhn (SPF) und von einem mit IBDV-infizierten Tier (pos. Serum) verwendet.

Nach oraler Immunisierung wurden in beiden Assays deutlich geringere IBDV-Antikörperkonzentrationen als nach subkutaner Applikation nachgewiesen, die meistens nur

geringfügig über den Werten der Kontrollgruppen VAK367 lagen (Abbildung 21). Generell zeigten die VAK367-Kontrollgruppen der oralen Immunisierung Signale, die höher als die der subkutanen Kontrollgruppen und vom SPF-Serum waren. Dies könnte auf einen immunstimulierenden Effekt der Hefe hindeuten, der durch eine generell erhöhte Antikörperkonzentration zu unspezifischen Interaktionen mit dem Antigen führte. Ein zusätzlich adjuvierender Effekt des Saponins konnte nicht beobachtet werden. In beiden Assays wurden nach subkutaner Applikation hohe Antikörpertiter beobachtet, die noch höher als vom pos. Serum waren. Dies deutete auf eine erfolgreiche Immunisierung hin. Ähnliche Werte wurden bereits vor der dritten Injektion erreicht (Abbildung 22).

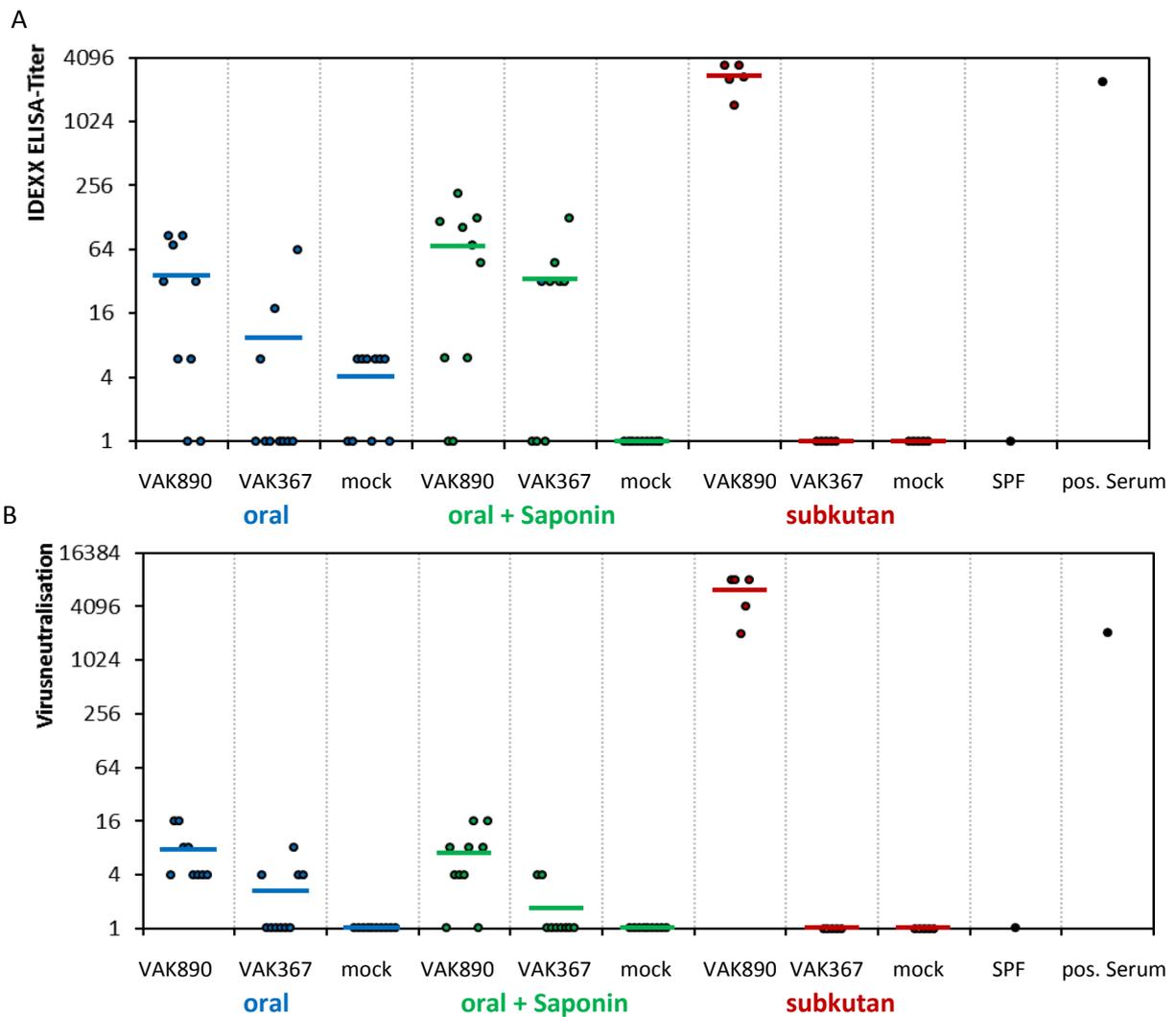


Abbildung 21: ELISA und Serumneutralisationsassay nach der Immunisierung von Hühnern mit VP2_{T25}. **A:** Die ELISA-Titer wurden mit dem *Infectious Bursal Disease Virus Antibody Test Kit* (IDEXX) nach Herstellerangaben ermittelt. Als Negativ- und Positivkontrolle wurde ein Serum von einem spezifisch pathogen-freien (SPF) und einem mit IBDV-infizierten Huhn verwendet. Dargestellt sind die Titer der einzelnen Seren (Punkte) und der ermittelte Gruppendurchschnitt (Balken) 14 Tage nach der letzten Applikation. **B:** Der Virusneutralisationsassay wurde mit DF1-Zellen und D78 durchgeführt. Dargestellt ist die höchste Serum-Verdünnung, bei der eine Neutralisation des Virus beobachtet wurde. Als negative und positive Kontrolle wurde ein Serum von einem spezifisch pathogen-freien (SPF) und einem mit IBDV-infizierten Huhn verwendet.

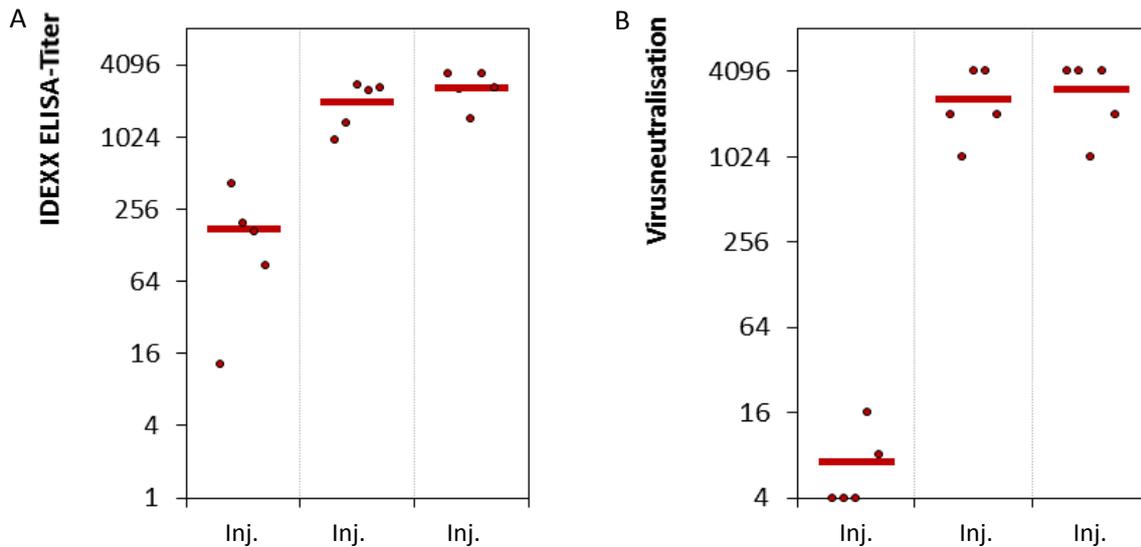


Abbildung 22: ELISA und Serumneutralisationsassay nach subkutaner Immunisierung von Hühnern mit VP2_{T2S}. Dargestellt sind die Ergebnisse 14 Tage nach jeder Applikation (Inj.) **A:** Die ELISA-Titer wurden mit dem *Infectious Bursal Disease Virus Antibody Test Kit* (IDEXX) nach Herstellerangaben ermittelt. Dargestellt sind die Titer der einzelnen Seren (Punkte) und der ermittelte Gruppennschnitt (Balken) 14 Tage nach der letzten Applikation. **B:** Der Virusneutralisationsassay wurde mit DF1-Zellen und D78 durchgeführt. Dargestellt ist die höchste Serum-Verdünnung, bei der eine Neutralisation des Virus beobachtet wurde.

Der anschließende Challenge wurde mit 100-facher EID₅₀ (50 % Embryo-Infektionsdosis) des Edgar-Virusstammes durchgeführt. Es wurde ein klassischer Virusstamm gewählt, da vermutet wurde, dass die AK-Antwort nach oraler Vakzinierung für einen hoch-virulenten Stamm nicht ausreichend war. Als Kontrolle für den Challenge wurde eine nicht immunisierte Gruppe nicht infiziert (Tabelle 17).

Tabelle 17: Ergebnisse des Challenge-Versuchs mit dem klassischen IBDV-Stamm Edgar nach Immunisierung von Hühnern. Dargestellt sind die Gruppen, die Mortalität während des siebentägigen Challenges und der Score der Bursaläsionen, der am siebten Tag nach dem Challenge ermittelt wurde. Der Score 1 entspricht dabei einer normalen bis 10 % folliculäre Atrophie; 2 = 10-30 % folliculäre Atrophie; 3 = 30-70 % folliculäre Atrophie; 4 = > 70 % folliculäre Atrophie.

Gruppe (Anzahl der Hühner)	Mortalität	Score der Bursaläsionen	
VAK890 (VP2 _{T2S} ;GAL4) (9)	0	1/4/4/4/4/4/4/4/4	
VAK367 (10)	1	4/4/4/4/4/4/4/4/4/4	oral
Mock (10)	0	4/4/4/4/4/4/4/4/4/4	
VAK890 (VP2 _{T2S} ;GAL4) (10)	0	2/4/4/4/4/4/4/4/4/4	oral+Sap.
VAK367 (9)	1	4/4/4/4/4/4/4/4/4/4	
Mock (9)	0	4/4/4/4/4/4/4/4/4/4	
VAK890 (VP2 _{T2S} ;GAL4) (5)	0	1/1/1/1/3	subkutan
VAK367 (5)	1	4/4/4/4/4	
Mock (5)	1	4/4/4/4/4	
Challenge-Kontrolle (5)	0	1/1/1/1/1	

Während des Challenge wurde nur in den Kontrollgruppen Mortalität beobachtet. Sieben Tage nach der Infektion wurden die Tiere euthanasiert und für weitere histologische Untersuchungen die *Bursa fabricii* entnommen. Eine Beurteilung hinsichtlich eines Immunschutzes wurde durch die Läsionenanzahl vorgenommen. Dafür wurde ein Score der Bursaläsionen auf der Skala von 1 bis 4 ermittelt; wobei der Score 1 normal bzw. bis zu 10 % folliculäre Atrophie, der Score 2 10-30 % folliculäre Atrophie, Score 3 30-70 % folliculäre Atrophie und Score 4 mehr als 70 % folliculäre Atrophie entsprach. Somit waren Tiere mit einem Score 1 geschützt und der Score 4 deutete auf ein nicht IBDV-geschütztes Huhn hin. In den Kontrollgruppen (VAK367 und mock) waren alle *Bursa fabricii* durch die Infektion komplett zerstört und im Gegensatz dazu waren die Organe der Challenge-Kontrolle unauffällig. Nach subkutaner Immunisierung wiesen vier von fünf Organe keine Läsionen auf und ein Organ erhielt einen Score von 3. Dies ließ auf einen vollständigen bzw. partiellen Immunschutz schließen. Nach oraler Vakzinierung wurde jeweils ein Organ aus den beiden VP2_{T2S}-Gruppen mit 1 bzw. 2 bewertet, was einen vollständigen bzw. partiellen Schutz der beiden Tiere zeigte. Die *Bursa fabricii* der anderen Hühner waren ebenfalls vollständig depletiert und somit nicht geschützt.

Somit konnte nach oraler Vakzinierung mit VP2_{T2S}-Hefen in 10 % der Fälle ein Immunschutz festgestellt werden, wohingegen die subkutane Immunisierung bei vier von fünf (80 %) Tieren protektiv war und bei einem von fünf Hühnern einen partiellen Schutz erzielte.

3.2. Influenza Hämagglutinin

Ein weiteres Virus, das für große wirtschaftliche Schäden in der Geflügelzucht verantwortlich ist, ist das Influenzavirus. Eine Impfung gegen das Virus ist in Deutschland nur in Ausnahmefällen erlaubt, obwohl Impfstoffe zur Verfügung stehen. Der hauptsächliche Grund dafür ist, dass die meisten Vakzine lebende oder abgetötete Viren enthalten, wodurch eine Unterscheidung zwischen infizierten und geimpften Tieren erschwert wird. Deshalb ist die Entwicklung eines hoch-wirksamen *subunit* Vakzins gegen aviäre Influenzaviren mit Möglichkeit zu *DIVA* von großer Bedeutung.

Für dieses Vorhaben des VAKZINOVA-Projekts wurde bereits im Vorfeld dieser Arbeit das Hämagglutinin (HA) als Antigen gewählt, da dieses hoch immunogen ist und die höchste Moleküldichte auf der Virusoberfläche besitzt. Anders als VP2 ist HA ein Glykoprotein, was in Metazoen komplex prozessiert und in die Zellmembran integriert wird. Für die Expression von HA in *K. lactis* sollte das *HA*-Gen genomisch integriert werden und das rekombinante Protein charakterisiert werden. Aufgrund von Signalpeptid, Membrananker und potentiellen Glykosylierungsstellen wurden für das Protein im Vergleich zu VP2 Unterschiede in der Lokalisation (Kompartimentierung des Proteins in der Hefezelle) und posttranslationale Modifikationen vermutet, wodurch der Vakzinierungserfolg beeinflusst werden könnte.

Für die Charakterisierung der Expression und Vakzinierungsstudien mit Mäusen und Hühnern wurde das *HA*-Gen vom Influenza-A-Stamm A/Turkey/Oregon/1971 (H7N3) (Abk.: H7-HA) verwendet. Der Stamm gehört zu den niedrig-pathogenen, aviären Influenzaviren. Verschiedene *K. lactis*-Stämme, die durch Erhöhung der *KIGAL4*-Gendosis, Sequenzoptimierung und Erhöhung der *HA*-Gendosis in ihrer Expression optimiert wurden, wurden von Dr. Osita Onuma (AG Molekulargenetik) generiert und charakterisiert. Dabei konnte durch die Optimierung, die Proteinausbeute deutlich gesteigert werden (Abbildung 23).

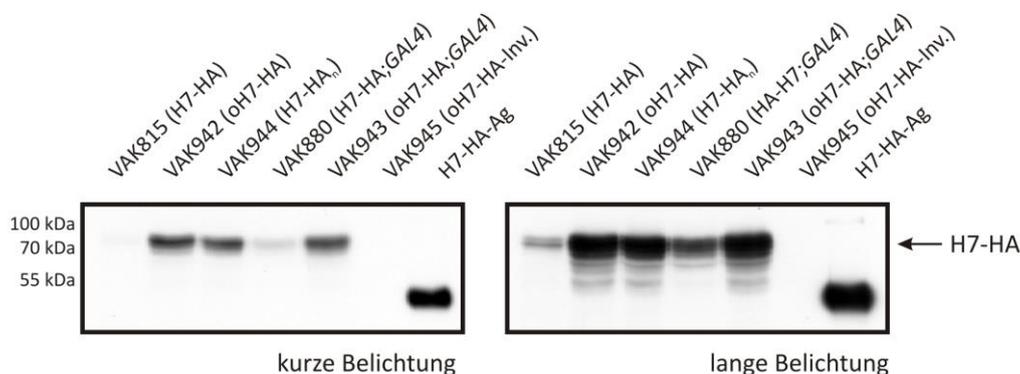


Abbildung 23: Charakterisierung der H7-HA-Stämme. A: Die Sequenz-optimierten *K. lactis*-Stämme VAK942 (oH7-HA) und VAK943 (oH7-HA;GAL4) wurden zusammen mit den nicht-optimierten Stämmen VAK815 (H7-HA), VAK944 (H7-HA_n) und VAK880 (H7-HA;GAL4) sowie dem Kontrollstamm VAK945 für 6 Stunden in 2 % Laktose-YEP-Medium angezogen. 0,09 ODE wurden in 5fach Ladepuffer für 10 min bei 95 °C denaturiert und mittels SDS-PAGE und Western Analyse untersucht. Der Nachweis des H7-HA-Proteins erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper mAb33 (zur Verfügung gestellt von Dr. Egbert Mundt) und einem anti-*mouse*-HRP Antikörper. Als positive Kontrolle diente, aus Baculovirus-infizierten Sf9-Zellen gereinigtes, H7-HA₁-Antigen (H7-HA-Ag; zur Verfügung gestellt von Dr. Egbert Mundt).

Wie bereits für VP2 beobachtet wurde, war die Sequenzoptimierung am effektivsten, um die Proteinmenge pro Zelle zu erhöhen (VAK942 (oH7-HA) und VAK943 (oH7-HA;GAL4)). Zusätzlich wurde ein Stamm generiert, der eine höhere H7-HA-Genkopie trug und ebenfalls eine deutlich erhöhte H7-HA-Proteinausbeute im Vergleich zur einfachen Integration (VAK815) aufwies. Die höhere Genkopienzahl erfolgte bei der homologen Rekombination des Klip3-H7-HA-Fragments. Dabei kam es wahrscheinlich zu einer Tandemintegration vom vollständigen Plasmid, wodurch der Stamm im Gegensatz zu VAK815 (H7-HA) außerdem uracil-prototroph ist.

Erste orale Vakzinierungsstudien an Mäusen hatten gezeigt, dass es zur Induktion von Virus-neutralisierenden Antikörpern kommt. Diese wurden im Plaque-Reduktionsassay nachgewiesen, jedoch konnte nur ein schwacher Titer erreicht werden. Eine subkutane Immunisierung von Mäusen hatte ebenfalls zu einer schwachen Antikörperantwort geführt (VAKZINOVA-Projekt, Daten nicht gezeigt). Da Mäuse in der Regel kein natürlicher Wirt aviärer Influenzaviren sind, wurde die Hefe anschließend mit Hühnern in Vakzinierungsstudien getestet, wodurch der Vakzinierungserfolg besser bestimmbar war.

3.2.1. Orale und subkutane Immunisierung von Hühnern mit H7-HA-Hefen

Analog zu den VP2_{T2S}-Immunisierungsversuchen mit Hühnern wurden 14 Tage alte Leghorn Hühner mit dem Stamm VAK880 (H7-HA;GAL4) vakziniert. Der Stamm wurde gewählt, da die H7-HA-Expression höher war als ohne zusätzliche *KI*GAL4-Integration, jedoch lag ein sequenzoptimierter Stamm zu dem Zeitpunkt nicht vor. Die Hefe wurde von der Firma ORGANOBALANCE (Berlin) produziert und anschließend getrocknet und hitze-inaktiviert. Für die orale Applikation wurden die Hefen wie bei den IBDV-Versuchen zusammen mit Futter pelletiert. Dabei blieb das H7-HA-Protein im Western Blot nachweisbar, denn es konnte nach der Inaktivierung im Hefepulver, sowie im pelletierten Futter nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Vakzinierung erfolgte unter Anleitung von Dr. Egbert Mundt am PDRC in Athens, Georgia. Die Applikationsformen und das Immunisierungsschema entsprachen dem des IBDV-Versuchs. Lediglich der Challenge-Versuch konnte nicht angeschlossen werden, da die Sicherheitsbestimmungen am PDRC in Athens, GA den Einsatz des aviären Influenzavirus nicht zuließen (Abbildung 24).

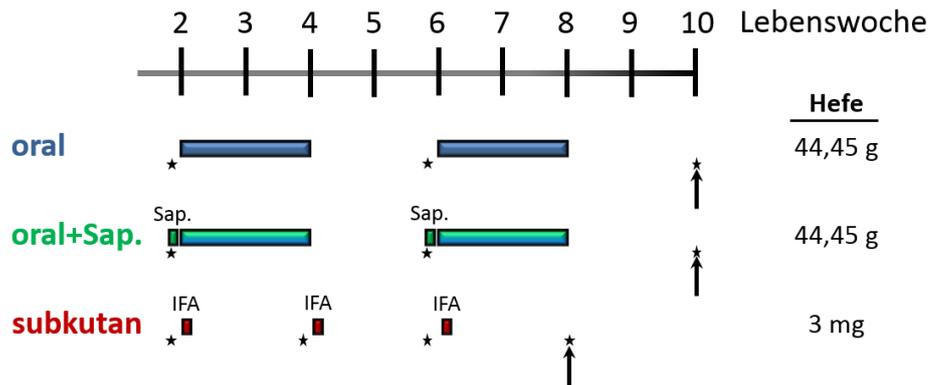


Abbildung 24: Immunisierungsschema der Hühnerexperimente mit H7-HA-Hefe. 14 Tage alte Hühner wurden mit VAK367 oder VAK880 (H7-HA;GAL4) Hefen oral (blau) bzw. subkutan (rot) vakziniert. Die orale Verabreichung erfolgte für zwei 14tägige Perioden mit Futterpellets, die 5 % rekombinante Hefe enthielten. Bei den Gruppen mit Saponin wurde einen Tag vor der Fütterungsperiode das orale Adjuvans verabreicht (grün). Die subkutane Immunisierung erfolgte mit 1 mg rekombinanter Hefe/IFA dreimal im Abstand von 14 Tagen. Die Gesamtmenge an applizierter Hefe ist rechts aufgelistet. Jeweils einen Tag vor jeder Applikation wurde den Tieren Blut entnommen (Stern). 14 Tage nach der letzten Applikation wurde nochmals Blut entnommen und die Hühner wurden euthanasiert (Pfeil).

Jeweils 14 Tage nach der Hefegabe erfolgte eine Blutentnahme und die gewonnenen Seren wurden mittels ELISA und Plaque-Assay auf vorhandene anti-H7-HA-Antikörper untersucht. Für den ELISA wurde gereinigtes H7-HA-Protein aus Baculovirus-infizierten Sf9-Zellen immobilisiert und anschließend mit den Seren inkubiert. Der verwendete sekundäre Antikörper war Alkalische Phosphatase-markiert und sollte an H7-HA-gebundene Serumantikörper binden. Anschließend wurden die Platten bei einer optischen Dichte von 405 nm ausgelesen (Abbildung 25).

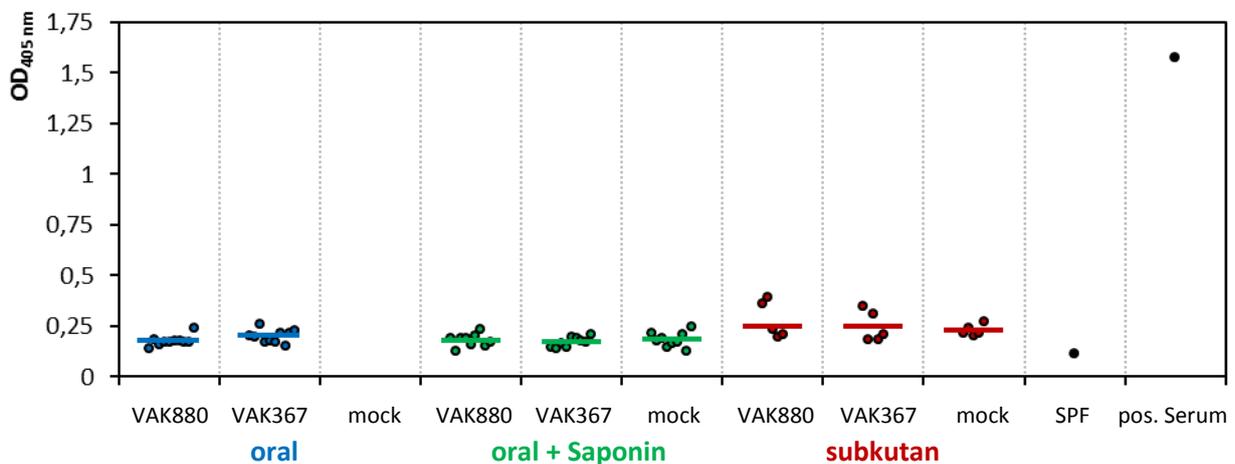


Abbildung 25: ELISA-Ergebnisse mit Seren nach der Immunisierung von Hühnern mit H7-HA-Hefen. Die ELISA-Werte wurden mit rekombinantem H7-HA-Protein aus Baculovirus-infizierten Sf9-Zellen und einem ELISA Kit (KPL) ermittelt. Als negative und positive Kontrollen wurden Seren von einem spezifisch pathogen-freien Huhn (SPF) und einem gegen H7N3-vakzinierten Huhn verwendet. Dargestellt sind die OD₄₀₅-Werte der einzelnen Seren (Punkte) und der ermittelte Gruppenschnitt (Balken) 14 Tage nach der letzten Applikation.

Im ELISA konnte zu keinem Zeitpunkt des Immunisierungsexperiments für die H7-HA-Seren ein Signal detektiert werden, dass von den Kontrollseren (VAK367 und mock) abwich. H7-HA-bindende Antikörper konnten ausschließlich im positiven Kontrollserum, das von einem mit Influenza Viren-infizierten Huhn stammte, nachgewiesen werden.

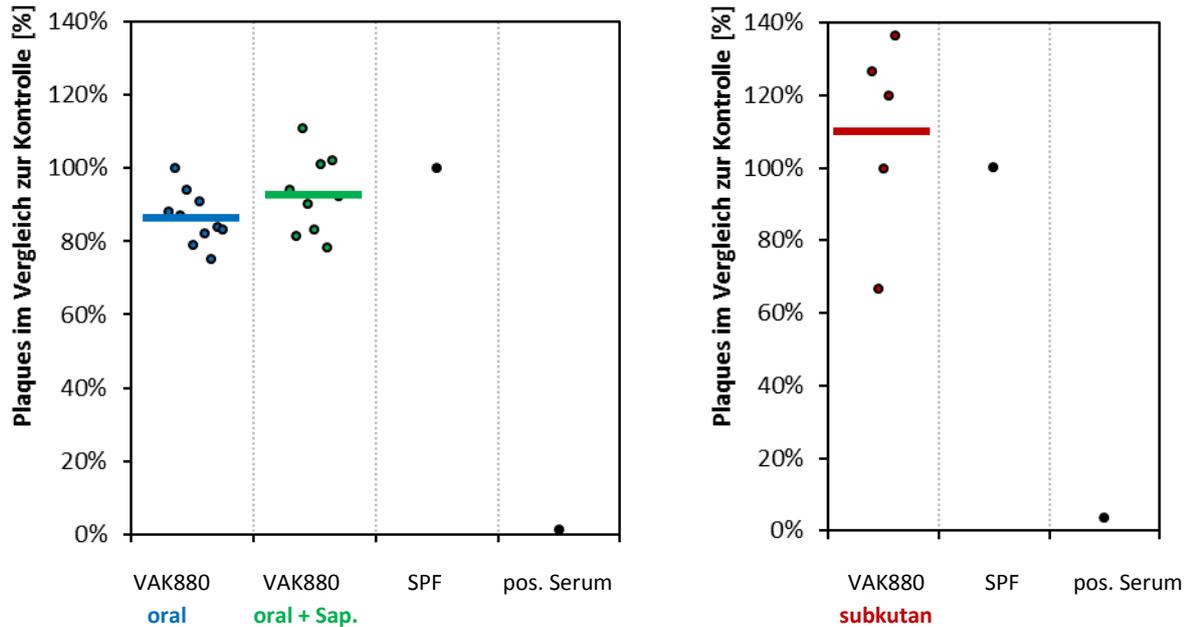


Abbildung 26: Virusneutralisationsassay mit A/Turkey/Oregon/1971 (H7N3) nach der Immunisierung von Hühnern mit H7-HA-Hefen. Der Virusneutralisationsassay erfolgte mittels Plaque Assay mit H7N3-Viren und MDCK-Zellen. Ermittelt wurden die relativen Plaques im Vergleich zur SPF-Kontrolle (entspricht 100 % Plaques). Als weitere Kontrolle für eine Neutralisation wurde ein Serum von einem H7N3-vakzinierten Huhn verwendet (pos. Serum). Dargestellt ist die relative Plaque-Anzahl der einzelnen Seren (Punkt) und der ermittelte Durchschnittswert für die Gruppen (Balken) 14 Tage nach der letzten Applikation.

Eine weitere Untersuchung der Seren erfolgte mit einem Plaque-Reduktionsassay. Dabei wurden Serum und Virus zunächst zusammen inkubiert, damit Virus-neutralisierende Antikörper aus dem Serum an das Virus binden und es neutralisieren können. 100 PFU (*Plaque forming units*) vom Virusstamm H7N3 wurden dafür mit den Seren für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend auf eine mit MDCK-Zellen konfluent bewachsene Platte gegeben. Nicht-neutralisierte Viren sollten dabei Zellen infizieren und lysieren, wodurch sich ein Lysishof (Plaque) bildet. Nach zwei Tagen wurden die noch lebenden Zellen angefärbt, wobei die Plaques sichtbar wurden und ausgezählt werden konnten. Anschließend wurde das Verhältnis der Plaques nach Inkubation mit Hühnerseren und der Negativkontrolle (SPF, 100 % Plaques) bestimmt. Wie in Abbildung 26 ersichtlich, bestätigten die so erzielten Ergebnisse die ELISA-Daten, da auch hier keine Virus-Neutralisation im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden konnte. Die Anzahl der Plaques entsprach in etwa denen der Negativkontrolle (SPF). Ein weiteres Kontrollserum von einem mit Influenza Viren-infizierten Tier konnte nahezu alle Viren neutralisieren. Somit konnte keine erfolgreiche Immunisierung von Hühnern gegen H7N3-Viren mit dem Stamm VAK880 (H7-HA;GAL4) beobachtet werden.

3.2.2. Generierung und Optimierung von H1-Hämagglutinin-exprimierenden *K. lactis*-Stämmen

Da die Experimente mit Hühnern sehr aufwendig sind und Mäuse kein natürlicher Wirt des aviären Influenzastammes H7N3 sind, wurde für weitere Untersuchungen mit einem Maus-adaptierten

Influenza-Hämagglutinin vom Subtyp H1N1 gearbeitet. Der Laborstamm A/Puerto Rico/8/34(Cambridge) (H1N1) (Abk.: PR8) ist gut charakterisiert und wird für die „Re-Assortierung“ neuer Vakzinaviren verwendet. Das Virus verursacht hohe Morbiditäts- und Mortalitätsraten in Mäusen und ist deshalb für das Mausmodell sehr gut geeignet. Außerdem ist das Virus human apathogen, wodurch Challenge-Versuche geringere Sicherheitsbestimmungen erfordern. Ein weiterer Vorteil ist, dass für Mäuse-Immunisierungsversuche ca. 90 % weniger Hefe benötigt wird.

Zusätzlich wurde das *HA*-Gen vom pandemischen Stamm A/California/04/2009(H1N1) (Abk.: CA) kloniert und charakterisiert. Der Stamm wurde gewählt, da eine Infektion oder auch eine Vakzinierung mit dem CA-Stamm in einigen Patienten zur Ausbildung von Antikörpern geführt hatte, die gegen die Stammdomäne des Hämagglutinins gerichtet sind und Viren von mehreren Subtypen (H1, H5 und H3) neutralisieren konnten. Somit könnte eine Vakzinierung mit dem CA-HA für eine heterosubtypische Immunität gegen Influzaviren geeignet sein [149];[150].

3.2.2.1. Expression von *PR8-HA* in *K. lactis*-Hefen

Die Integration des Hämagglutinins vom Stamm A/Puerto Rico/8/34(Cambridge) (H1N1) (*PR8-HA*) in das *K. lactis*-Genom erfolgte mit Hilfe des *Klp3*-Vektors. Aufgrund der positiven Expressions-Ergebnisse mit dem sequenz-optimierten *VP2_{T25}*-Gen wurde für das *PR8-HA*-Gen ebenfalls eine Optimierung durchgeführt und das synthetische Gen kloniert (Abbildung 41). Die Stämme VAK952 (*PR8-HA*), mit der genomischen Integration des optimierten *PR8-HA*, und VAK953 (*PR8-HA;GAL4*), mit zusätzlicher Integration von *KIGAL4*-Genkopien lagen zu Beginn dieser Arbeit bereits vor (Dr. Osita Onuma), jedoch waren diese Stämme nicht charakterisiert und ein Expressionsnachweis fehlte.

Aus diesem Grund erfolgte zunächst der Nachweis des rekombinant exprimierten Proteins über Western Analysen. Hierfür wurden die unter induzierten Bedingungen kultivierten Hefezellen mittels Glasperlen aufgeschlossen und das gesamte Lysat ohne eine Abtrennung von Zelltrümmer mit Ladepuffer denaturiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Der Immunblot, zum Nachweis von *PR8-HA*-Protein, erfolgte mit monoklonalen Antikörpern der Hybridomazelllinie CM1-1, die mit dem synthetischen Peptid SFERFEIFPKE generiert wurde und dessen Antikörper nur denaturiertes *HA*-Protein markieren können. Das Molekulargewicht von nicht-glykosyliertem und nicht-gespaltenem *HA₀* liegt bei ca. 63 kDa. Glykosyliertes und nicht-gespaltenes *PR8-HA₀* wird im SDS-Gel jedoch bei ca. 79 kDa detektiert [151]. Im Western Blot mit den Stämmen VAK952 (*PR8-HA*) und VAK953 (*PR8-HA;GAL4*) wurde ein deutliches Signal bei ca. 80 kDa sichtbar, das im Kontrollstamm VAK367 nicht auftrat (Abbildung 27A). Dieses Ergebnis zeigt, dass *PR8-HA* exprimiert und das Protein auch modifiziert wird, jedoch wahrscheinlich nicht in die Untereinheiten *HA₁* und *HA₂* prozessiert wird. Außerdem konnten in anderen Western Analysen ebenfalls Signale zwischen 60 und 80 kDa nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 30), die auf geringer modifiziertes *PR8-HA* hindeuten.

Wie für VP2_{T2S} konnte auch im Zellextrakt vom Stamm VAK953 (PR8-HA;GAL4) mehr Fremdprotein nachgewiesen werden als im Stamm VAK952 (PR8-HA) ohne zusätzliche *KIGAL4*-Kopien. Dies bestätigt die Beobachtung, dass eine Steigerung der *KIGAL4*-Menge zu einer höheren Produktausbeute in diesen Stämmen führt. Die Ermittlung der *KIGAL4*-Kopienzahl war für VAK953 (PR8-HA;GAL4) nicht eindeutig, da ein Wert von ca. 1,5 Kopien bestimmt wurde (Abbildung 27C). Da der Stamm auf Uracil-Prototrophie selektiert wurde und die Integration des pLI-1 Plasmids mittels PCR überprüft wurde, wurde angenommen, dass der Stamm zwei *KIGAL4*-Kopien trägt. Die erhöhte PR8-HA-Expression und Wachstumsrate unterstützen diese Annahme.

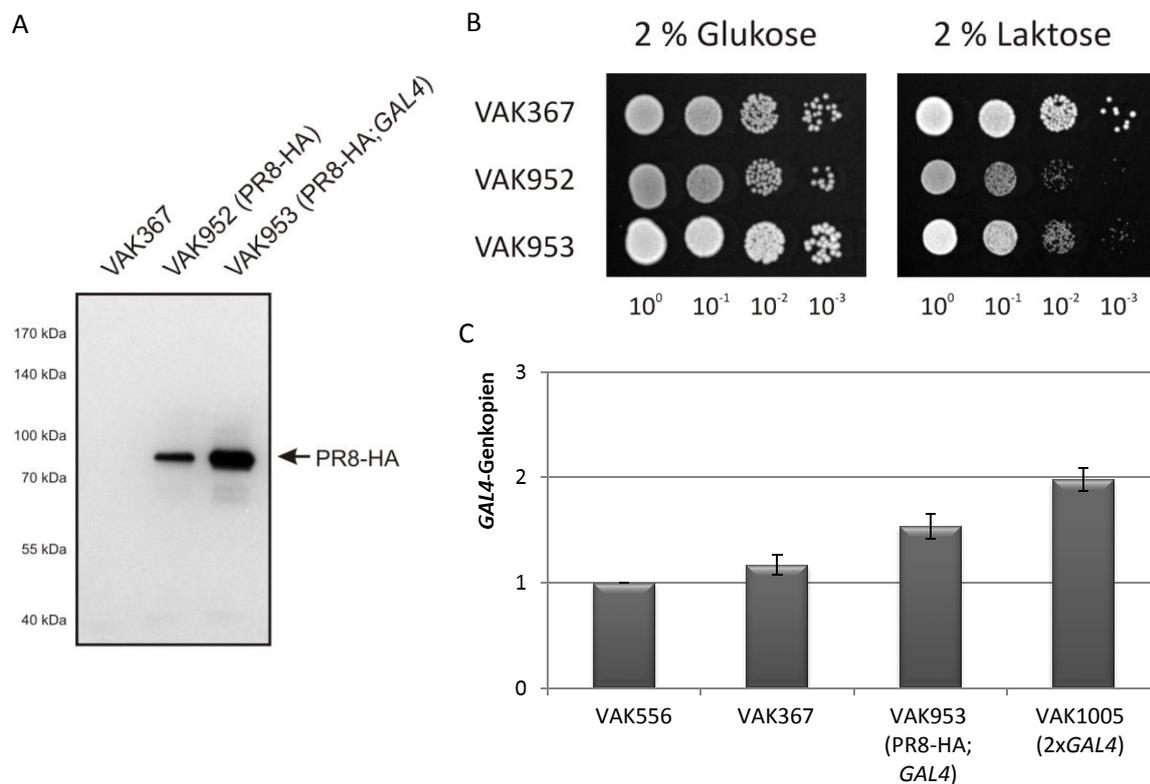


Abbildung 27: Charakterisierung der PR8-HA-Stämme. **A:** Die *K. lactis*-Stämme VAK367 (Kontrollstamm), VAK952 (PR8-HA) und VAK953 (PR8-HA;GAL4) wurden für sechs Stunden in 2 % Laktose-YEP-Medium angezogen. 50 µg Proteinextrakt der Stämme wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht. Der Nachweis von PR8-HA erfolgte mit CM1-1-AK (Wistar Institute Collection, Camden, NJ) und einem anti-*mouse*-HRP Antikörper. **B:** Die beiden Stämme VAK367 (Kontrollstamm), VAK952 (PR8-HA) und VAK953 (PR8-HA;GAL4) wurden in 2 % Glukose-YEP-Medium über Nacht angezogen und auf eine OD₆₀₀ von 0,4 verdünnt. Davon ausgehend wurden serielle 1:10 Verdünnungen auf YEP-Medium mit 2 % Glukose bzw. Laktose getropft und die Platten für zwei Tage bei 30 °C kultiviert. **C:** Für VAK953 (PR8-HA;GAL4) wurde die *KIGAL4*-Kopienzahl nach der Integration des pLI1-Plasmids bestimmt. Dazu wurde von den Stämmen VAK556, VAK367, VAK953 (PR8-HA;GAL4) und VAK1005 (2xGAL4) genomische DNA isoliert und eine qPCR mit den Primerpaaren GAL4qRT-3_fwd und GAL4qRT-3_rev zur Amplifikation von einem *KIGAL4*-Fragment (119 bp) bzw. ALG9-F und ALG9-R zur Amplifikation von einem *ALG9*-Fragment (145 bp) durchgeführt. Anschließend wurden die ΔCt-Werte von VAK556 und der einzelnen Stämme für *KIGAL4* und *ALG9* ermittelt und schließlich ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung.

Während der Anzucht des Stammes VAK952 (PR8-HA) in Laktose-haltigem Vollmedium wurde im Vergleich zum Kontrollstamm VAK367 eine geringere Wachstumsrate beobachtet. Die optische Dichte lag für diesen Stamm bei durchschnittlich 1, wohingegen der Stamm VAK367 meist eine optische Dichte von 4-5 erreicht hat. Das reduzierte Wachstum konnte mittels eines Tüpfeltests

bestätigt werden (Abbildung 27B). Zwar war der Phänotyp auch unter nicht induzierten Bedingungen (Glukose) erkennbar, jedoch scheint die Induktion der HA-Expression den negativen Einfluss zu verstärken. Nach der genomischen Insertion des pLI1-Plasmids (VAK953) wuchsen die PR8-HA-Hefen wie bereits die VP2_{T2S}-Hefen besser.

Um auszuschließen, dass der Wachstumsdefekt der Hefen VAK952 (PR8-HA) auf eine sekundäre Mutation im Stamm zurückzuführen ist und nicht durch das Fremdgen verursacht wird, wurden neue PR8-HA-Stämme generiert. Die Integration erfolgte wie zuvor für den Stamm VAK952 (PR8-HA) mit einem Klp3_PR8-HA-Fragment. Anschließend wurde die optische Dichte von induzierten Übernachtskulturen von positiv selektierten Rekombinanten verglichen (Abbildung 28A). Außerdem wurde im Western Blot die synthetisierte PR8-HA-Proteinmenge verglichen (Abbildung 28B).

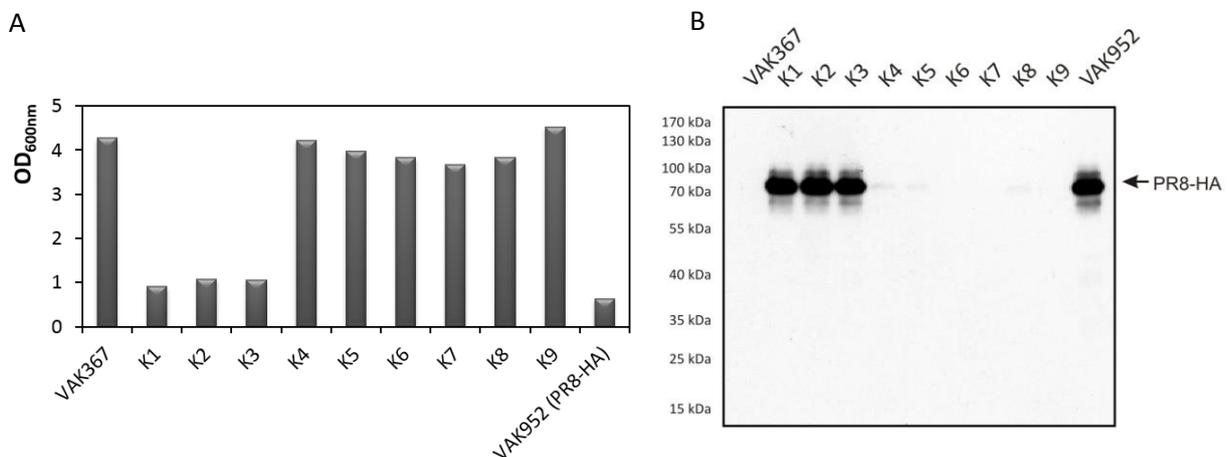


Abbildung 28: Einfluss der PR8-HA-Expression auf das Wachstum. **A:** Neun unabhängig, selektierte PR8-HA-Rekombinanten (K1-K9) wurden hinsichtlich des Wachstums in 2 % Laktose YEP-Medium und auf PR8-HA-Synthese untersucht. Die Stämme wurden über Nacht angezogen und die OD₆₀₀ wurde bestimmt. **B:** 0,2 ODE wurden in 5fach Ladepuffer für 10 min bei 95 °C aufgeschlossen und mittels SDS-PAGE und Western Analyse untersucht. Der PR8-HA-Nachweis erfolgte mittels CM1-1 (Wistar Institute Collection, Camden, NJ) und einem anti-*mouse*-HRP Antikörper. Als Kontrollstämme wurden VAK367 und VAK952 (PR8-HA) mitgeführt.

Dabei zeigte sich, dass alle Rekombinanten, die wie bei Stamm VAK952 (PR8-HA) im Western Blot eine erhöhte PR8-HA-Proteinmenge zeigten, in ihrem Wachstum beeinträchtigt waren. Rekombinanten, die jedoch eine ähnliche OD wie der Stamm VAK367 erzielten, enthielten weniger Fremdprotein. Aufgrund dieser Ergebnisse, wurde davon ausgegangen, dass die Expression von PR8-HA einen negativen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Hefen hat.

Die Überexpression von Glykoproteinen kann die Proteinfaltungskapazität überschreiten, da bspw. Enzyme wie Chaperone und Oxidoreduktasen im ER limitiert sind. Außerdem ist die richtige Faltung von HA u. a. von der Glykosylierung abhängig, die jedoch in *K. lactis* von der höherer Eukaryoten abweicht. Diese Faktoren ließen vermuten, dass die Faltung von PR8-HA in *K. lactis* nicht effizient erfolgt. In *S. cerevisiae* können ungefaltete oder falsch-gefaltete Proteine zwei Reaktionswege aktivieren. Neben der ER-abhängigen Degradation (ERAD), bei dem fehlerhafte Proteine im Cytosol abgebaut werden, gibt es die *unfolded protein response* (UPR). Dabei führt die Akkumulation von

ungefalteten Proteinen zur Aktivierung von der Transmembrankinase/-nuklease Ire1p, die wiederum das unkonventionelle Spleißen von *HAC1*-mRNA bewirkt. Die gespleißte mRNA führt zur Synthese des Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktors Hac1p und zur Expression von URP-Zielgenen [152];[153]. Die URP ermöglicht der Zelle, die Synthese zusätzlicher ER-Chaperone zu aktivieren, wodurch die Akkumulation falsch-gefalteter Proteine reduziert werden soll. Dies könnte das langsamere Wachstum der PR8-HA-Hefen erklären. Für das BVDV-E2-Protein konnte nach der Expression in *K. lactis* gespleißte *HAC1*-mRNA durch RT-PCR beobachtet werden, dass darauf hindeutet, dass in *K. lactis* die URP ebenfalls über die Prozessierung der *HAC1*-mRNA erfolgt (Daten von Melanie Wagner, AG Molekulargenetik). Überraschenderweise wurde neben den Fragmenten für ungespleißte mRNA (689 bp) und gespleißte mRNA (ca. 369 bp) ein zusätzliches Fragment (ca. 533 bp) amplifiziert. Für *S. cerevisiae* und *P. pastoris* ist dagegen nur eine Form von gespleißter *HAC1*-mRNA beschrieben [154];[155]. Allerdings stimmten die Sequenzierungsergebnisse des zusätzlichen Fragmentes mit denen des gespleißten Fragmentes überein (persönliche Mitteilung M. Wagner). Ob die Überexpression des PR8-HA-Glykoproteins ebenfalls zur Auslösung der UPR in *K. lactis* führte, wurde aufgrund des Wachstumsverhaltens untersucht. Dafür wurden die Stämme VAK367, VAK952 (PR8-HA) und VAK953 (PR8-HA;*GAL4*) sowohl in Glukose-haltigem als auch in Laktose-haltigem Medium angezogen. Als zusätzliche Kontrolle wurde die UPR für den Stamm VAK367 mit Tunicamycin induziert. Tunicamycin inhibiert die N-Glykosylierung von Proteinen im ER, was zu einer fehlerhaften Faltung vieler Glykoproteine führt [152]. Von den unterschiedlichen Ansätzen wurde die Gesamt-RNA isoliert und mittels Reverser Transkriptase in cDNA übersetzt. An der cDNA erfolgte schließlich die PCR mit den Primern für *HAC1* (KL-HAC1-fwd2 und KL-HAC1_rev2) und als Kontroll-mRNA wurde *ACT1* (KL-ACT1-Int-fwd und KL-ACT1-Int-rev) amplifiziert. Die PCR wurde auf ein Agarose-Gel aufgetragen und die DNA-Banden mittels der Software Image Lap 3.0 (BioRad) densitometrisch ausgewertet. Dafür wurden die ermittelten Signalintensitäten der drei amplifizierten Fragmente für jeden Stamm als 100 % angenommen und die einzelnen Fragmente des Stammes dazu in Relation gesetzt (Abbildung 29).

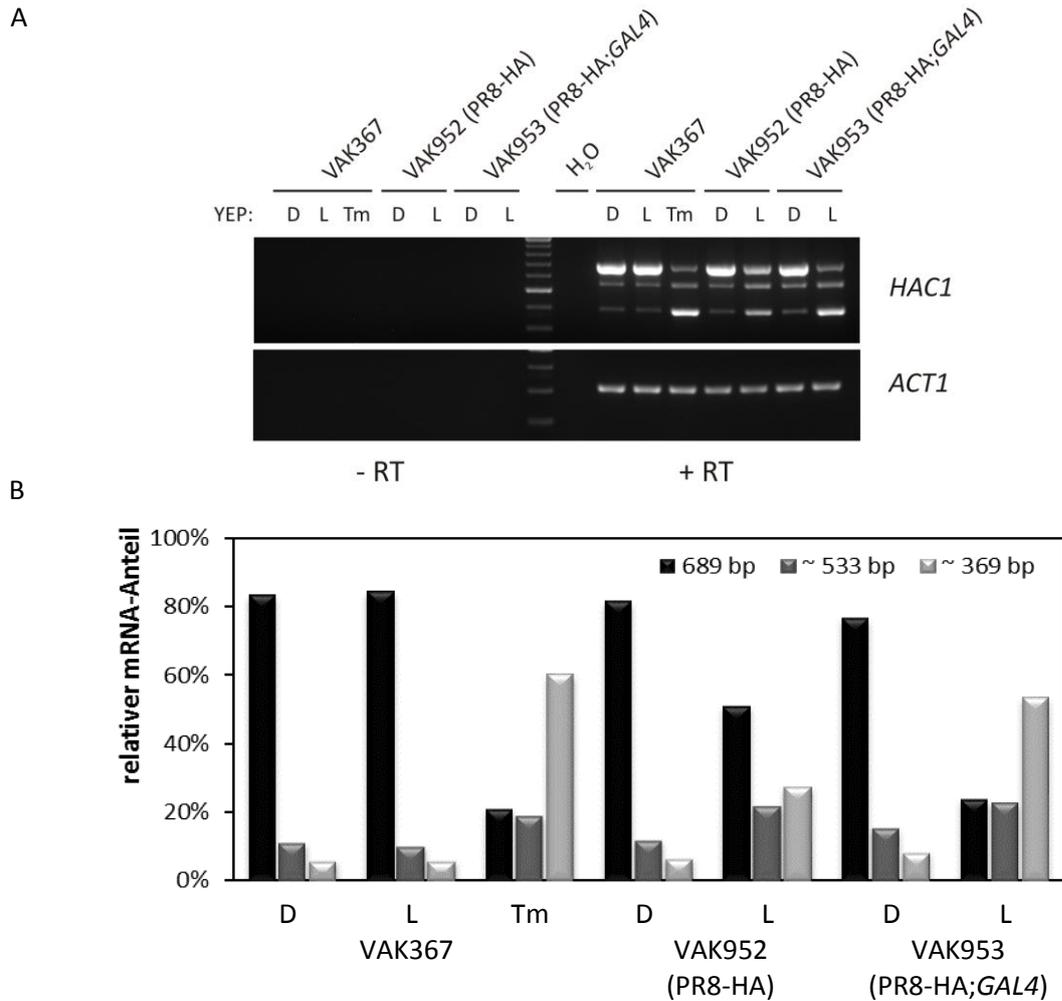


Abbildung 29: Untersuchung der UPR in PR8-HA-Expressionsstämmen. Die Stämme VAK367, VAK952 (PR8-HA) und VAK953 (PR8-HA;GAL4) wurden für sechs Stunden in 2 % Glukose (D) oder 2 % Laktose (L) YEP-Medium angezogen. Zur Kontrolle der UPR wurde außerdem VAK367 mit Tunicamycin behandelt (Tm). Die *HAC1*-mRNA wurde mittels der Primer KL-HAC1-fwd2 und KL-HAC1_rev2 amplifiziert. Als Kontrolle wurde die *ACT1*-mRNA mit dem Primerpaar KL-ACT1-Int-fwd und KL-ACT1-Int-rev nachgewiesen. Um DNA-Verunreinigungen auszuschließen, erfolgte die RT-PCR ebenfalls an einem Ansatz, dem zuvor keine Reverse Transkriptase zugesetzt wurde (-RT). Die RT-PCRs wurden auf einem 2 % Agarose-Gel aufgetrennt (**A**) und mit Software Image Lap 3.0 (BioRad) densitometrisch ausgewertet (**B**). Dabei wurden die Werte der drei amplifizierten Fragmente eines Stammes 100 % gesetzt und die relative Menge der einzelnen Fragmente des Stammes ermittelt.

Die Induktion der UPR mittels Tunicamycin war im Stamm VAK367 erfolgreich, wie anhand der unterschiedlichen Fragmente von *HAC1* im Vergleich zu den Kontrollen VAK367 auf Glukose oder Laktose zu erkennen ist. Für den Kontrollstamm VAK367 wurde eine geringe Menge an gespleißter *HAC1*-mRNA detektiert, die bei unter 20 % lag. Für die Stämme VAK952 (PR8-HA) und VAK953 (PR8-HA;GAL4) wurden unter reprimierten Bedingungen (Glukose) ebenfalls nur wenige *HAC1*-mRNA-Spaltprodukte (20 % - 25 %) beobachtet. Bei dem Stamm VAK953 (PR8-HA;GAL4) war für das Wachstum auf Glukose etwas mehr prozessierte mRNA zu beobachten als beim Stamm VAK952 (PR8-HA). Die Hefezellen, die unter induzierenden Bedingungen (Laktose) kultiviert wurden und somit *PR8-HA* exprimierten, zeigten eine deutlich erhöhte Menge an Spleißprodukten. Somit scheint die Synthese von PR8-HA die UPR in den Expressionsstämmen zu aktivieren. Da die UPR im Stamm

VAK953 (PR8-HA;*GAL4*) (24 % ungespleißte mRNA) noch stärker zu beobachten ist als bei VAK952 (PR8-HA) (51 % ungespleißte mRNA) korrelierte die URP mit der synthetisierten PR8-HA-Proteinmenge.

3.2.2.2. Optimierung der CA-HA-Expression

Wie der Stamm A/Puerto Rico/8/34 (PR8) gehört auch A/California/04/2009 (CA) dem Subtyp H1N1 an. Ein Sequenzvergleich der beiden Hämagglutinin-Aminosäuresequenzen zeigt, dass sie sich hauptsächlich in den Antikörperbindestellen (*antigenic sites*) und nur geringfügig in der HA₂-Domäne unterscheiden (vgl. 7.3).

Ein Hefestamm, bei dem ein Sequenz-optimiertes CA-HA-Gen in das *K. lactis*-Genom integriert ist (VAK955 (CA-HA)), lag zu Beginn dieser Arbeit ebenfalls vor (Dr. Osita Onuma), jedoch konnte im Immunblot mit keinem der verfügbaren Antikörper (H37-66 und CM1-1; Anti-HA-(A/California/04/2009); vgl. 2.1.9) HA-Protein detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Deshalb erfolgten zunächst RT-PCRs um eine Transkription des Gens in diesem Stamm nachzuweisen. Dabei gelang es mit spezifischen Primern eine CA-HA-mRNA nachzuweisen (Daten nicht gezeigt), was darauf hindeutet, dass der Stamm das CA-HA-Gen transkribiert. Jedoch konnten Mutationen (bspw. Leserasterverschiebungen) damit nicht ausgeschlossen werden. Eine Sequenzierung des Insertionsortes wies jedoch keine Fehler auf. Auch eine erneute Konstruktion des Stammes mit dem Plasmid pKlp3_CA-HA, um sekundäre Mutationen auszuschließen, brachte keinen CA-HA-Nachweis im Western Blot. Somit wurde davon ausgegangen, dass die Markierung von CA-HA im Immunblot mit den vorhandenen Antikörpern nicht möglich war. Das Erkennungspeptid des monoklonalen Antikörpers der Zelllinie CM1-1, der für das PR8-HA-Protein erfolgreich verwendet wurde, ist ¹²⁷s f e r f e i f p k e¹³⁷. Im CA-HA-Protein unterscheidet sich dieses Peptid nur in der letzten Aminosäure, bei der Glutaminsäure durch Threonin ersetzt ist. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Arbeiten mit dem CA-HA-Protein ein Stamm generiert der eine Aminosäuresubstitution an Position 137 von Threonin nach Glutaminsäure enthält (VAK1042 (CA_{T137E}-HA)).

In diesem Stamm konnte schließlich das CA_{T137E}-HA über Western Blot nachgewiesen werden (Abbildung 30A). Jedoch schien die Proteinmenge im Vergleich zum Stamm VAK952 (PR8-HA) deutlich geringer zu sein. Eine Erhöhung der K*GAL4*-Menge durch die Integration einer zusätzlichen K*GAL4*-Genkopie (VAK1043 (CA_{T137E}-HA;*GAL4*)) führte nur zu einer geringfügigen Steigerung der HA-Proteinmenge (Abbildung 30A).

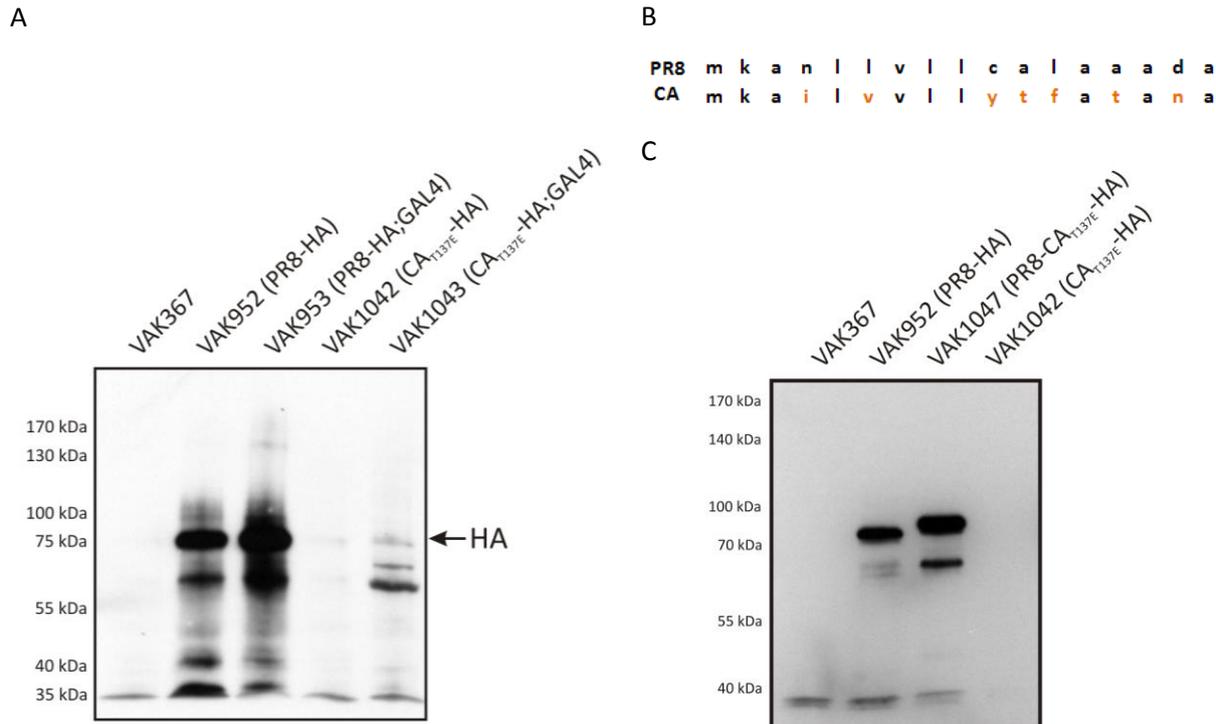


Abbildung 30: Expression von CA_{T137E} -HA nach Austausch des Signalpeptids. A: Die Stämme VAK367, VAK952 (PR8-HA), VAK953 (PR8-HA;GAL4); VAK1042 (CA_{T137E} -HA) und VAK1043 (CA_{T137E} -HA;GAL4) wurden über Nacht in 2 % Laktose YEP-Medium angezogen. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot mit CM1-1 (Wistar Institute Collection, Camden, NJ) und einem anti-*mouse*-HRP Antikörper untersucht. **B:** Vergleich der Aminosäuresequenzen des Signalpeptids von PR8-HA und CA-HA. **C:** Vergleich der CA_{T137E} -HA-Expression nach Austausch des Signalpeptids im Stamm VAK1047 (PR8- CA_{T137E} -HA). Der Versuch erfolgte analog zu dem in Abbildung A.

Der Sequenzvergleich zwischen PR8-HA und CA-HA zeigte, dass das Signalpeptid (die ersten 17 AS) beider HA-Proteine sich in sieben AS unterscheidet. Dies entspricht einer Identität von 41 %, wohingegen die Gesamtsequenz beider Proteine 81 % identische AS aufweist (siehe 7.3). Um zu prüfen, ob das Signalpeptid für die geringere Proteinausbeute verantwortlich ist, wurde die Nukleotidsequenz dieses Bereichs von CA_{T137E} -HA gegen PR8-HA ausgetauscht (VAK1047 (PR8- CA_{T137E} -HA)). Dieser Austausch sollte keinen Einfluss auf die Immunogenität des Proteins haben, da das Signalpeptid bei Durchtritt durch die ER-Membran abgespalten wird. Der Stamm VAK1047 (PR8- CA_{T137E} -HA) und die Kontrollstämme wurden unter induzierenden Bedingungen angezogen und die Zellen mittels Glasperlen aufgeschlossen. Das Lysat wurde ohne einen Zentrifugationsschritt in Ladepuffer aufgenommen und bei 95 °C denaturiert. Die damit durchgeführten Western Analysen ergaben ein vergleichbar starkes HA-Signal wie im Stamm VAK952 (PR8-HA) (Abbildung 30C). Somit bestätigte sich die Vermutung, dass das Signalpeptid die Ursache für die unterschiedliche HA-Proteinmenge ist. Auffällig war jedoch, dass die Laufgeschwindigkeit vom PR8- CA_{T137E} -HA-Konstrukt im SDS-Gel langsamer war als von PR8-HA. Beide Proteine unterscheiden sich nicht in ihrem kalkulierten Molekulargewicht, welches für PR8-HA bei 63,38 kDa und 63,14 kDa für PR8- CA_{T137E} -HA lag (ermittelt mit ExPASy Bioinformatics Resource Portal). Somit könnte das unterschiedliche

Laufverhalten auf einen anderen Glykosylierungsstatus, zusätzliche posttranslationale Modifikationen oder Prozessierung im CA_{T137E}-HA-Konstrukt hindeuten.

3.2.3. Charakterisierung der Hämagglutinin-Expression

3.2.3.1. Glykosylierung von Hämagglutinin

Hämagglutinin ist ein Membranprotein und wird während des Transportes durch das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat glykosyliert. Die Modifikation trägt zur richtigen Faltung, der Interaktion des Virus mit den Rezeptoren und einer effizienten Virusfreisetzung bei [67]. N-glykosyliert werden Asparagine (Asn) mit dem konservierten Motiv Asn-X-Ser/Thr, das in der Aminosäuresequenz von PR8-HA achtmal und in PR8-CA_{T137E}-HA siebenmal zu finden ist. Da das Laufverhalten im SDS-Gel der in Hefe synthetisierten PR8-HA und CA_{T137E}-HA-Proteine nicht der kalkulierten Größe der unmodifizierten Proteine entspricht, wurde vermutet, dass die Proteine auch in *K. lactis* glykosyliert werden. Um dies zu bestätigen, wurden denaturierte Hefelysate mit dem Enzym PNGase F behandelt, das nahezu alle N-Glykane vom Asparagin abspaltet [156]. Zum Vergleich des Laufverhaltens im SDS-Gel wurden außerdem Proteinextrakte von *E. coli*-Zellen aufgetragen, die das PR8-HA-Gen von einem Plasmid exprimieren (pET21_PR8-HA; rPR8-HA). *E. coli* ist nicht in der Lage, HA zu glykosylieren, weshalb das Protein rPR8-HA als Kontrolle für eine vollständige Deglykosylierung diente. Nach PNGase F-Hydrolyse wurden die Proteinextrakte der HA-Stämme VAK952 (PR8-HA) und VAK1047 (PR8-CA_{T137E}-HA) sowie der Kontrollen VAK367 und rPR8-HA im Western Blot analysiert (Abbildung 31)

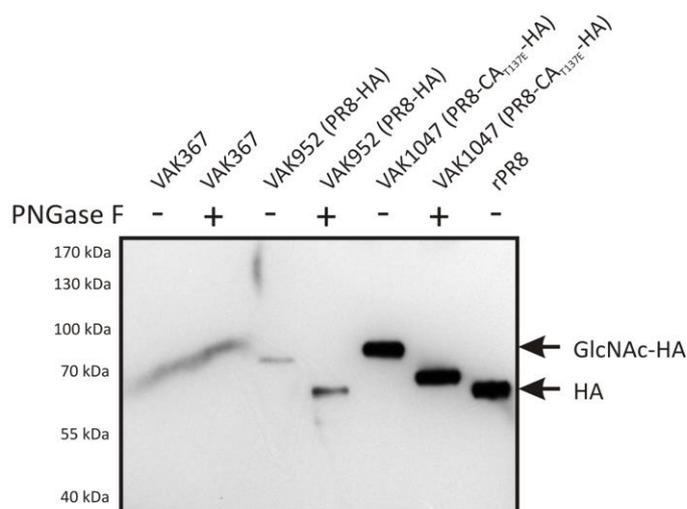


Abbildung 31: Untersuchungen zur Glykosylierung von PR8-HA und CA-HA. A: Zellen der Stämme VAK367, VAK952 (PR8-HA), und VAK1047 (PR8-CA_{T137E}-HA) wurden für sechs Stunden in 2 % Laktose YEP-Medium angezogen. Die Hefen wurden denaturiert und die Proteine mit PNGase F (NEB) über Nacht bei 4 °C deglykosyliert. Zur Analyse wurden schließlich 0,08 ODE mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht. Als zusätzliche Kontrolle diente rekombinantes PR8-HA-Protein aus *E. coli* (rPR8-HA).

Dabei waren die Laufgeschwindigkeit der HA-Proteine vom Stamm VAK952 (PR8-HA) und VAK1047 (PR8-CA_{T137E}-HA) nach der Deglykosylierung im SDS-Gel höher als ohne PNGase F-Behandlung, wodurch nachgewiesen werden konnte, dass HA in *K. lactis* glykosyliert wird. Da das Laufverhalten von PR8-HA dem von *E. coli*-exprimierten Protein (rPR8-HA) entspricht, deutet dies auf eine

vollständige Hydrolyse der N-Glykane hin. Außerdem reagierte der verwendete Antikörper mit dem glykosylierten Protein schlechter als mit dem nicht-glykosylierten. Dies deutet darauf hin, dass die Glykane für die Bindung des verwendeten Antikörpers an HA hinderlich sind. Für das PR8-CA_{T137E}-HA-Konstrukt konnte der Effekt der reduzierten Antikörperbindung nicht beobachtet werden. Dies liegt vermutlich an einem fehlenden putativen Glykosylierungsmotiv beim Asn144, welches sich in räumlicher Nähe zum AK-Bindepeptid befindet (127-137 AS). Des Weiteren entsprach das Molekulargewicht des deglykosylierten PR8-CA_{T137E}-HA nicht dem des deglykosylierten PR8-HA. Damit kann ausgeschlossen werden, dass die Glykosylierung die Ursache für den Laufunterschied der beiden Varianten ist.

Welchen Einfluss die Wachstumstemperatur während eines Fermentationsprozesses auf den Glykosylierungsstatus hat, wurde exemplarisch mit dem Stamm VAK880 (H7-HA;GAL4) untersucht (vgl. 3.2). Dazu wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben von vier parallel laufenden Batch-Prozessen genommen, bei denen sich nur die geregelte Temperatur unterschied (25 °C, 28 °C, 30 °C bzw. 33 °C) (durchgeführt von K. Schulze). Anschließend wurden die Proben im Western Blot analysiert, wobei wieder anhand des Laufverhaltens im SDS-Gel auf den Glykosylierungsstatus geschlossen wurde (Abbildung 32).

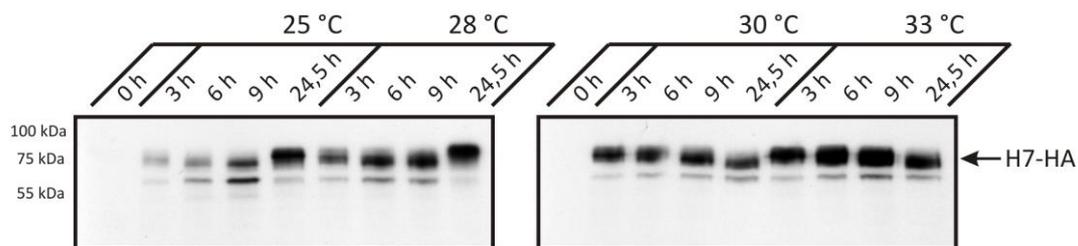


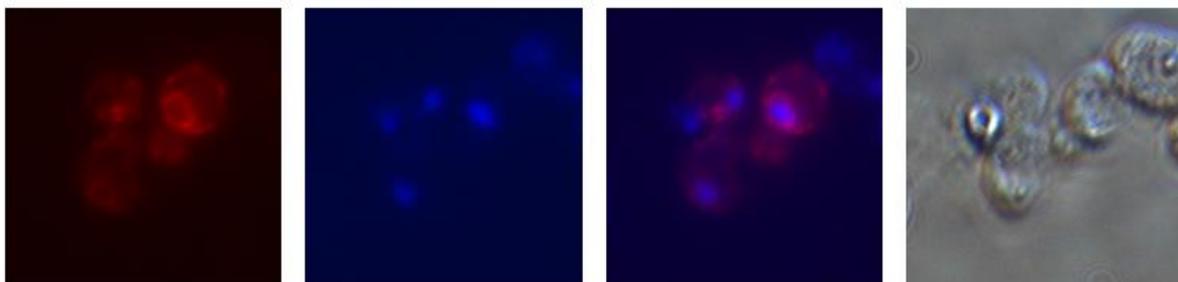
Abbildung 32: Einfluss von Temperatur und Prozessdauer auf die Glykosylierung. Der H7-HA-Stamm VAK880 (H7-HA;GAL4) wurde in einem *fed batch*-Fermentationsprozess bei 25 °C, 28 °C, 30 °C und 33 °C für 24,5 h kultiviert. Von der Vorkultur, die unter nicht induzierenden Bedingungen (2% Glukose; 0 h) angezogen wurde und zu den Prozessstunden 3 h, 6 h, 9 h und 24,5 h wurden Proben entnommen und im Western Blot untersucht. Der Nachweis von H7-HA erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper mAb33 und anti-*mouse*-HRP AK.

Es zeigt sich, dass die Modifizierung von der Prozessdauer und der Wachstumstemperatur abhängig war. Bei einer Wachstumstemperatur von 30 °C bzw. 33 °C wurde mit zunehmender Prozessdauer die Laufgeschwindigkeit des HA-Proteins im SDS-Gel größer, was darauf hindeutet, dass die Anzahl der Zuckerreste abnahm. Bei 25 °C und 28 °C wurde zunächst das gleiche beobachtet, jedoch wurde am Ende der Fermentation (24,5 h) das höchste apparente Molekulargewicht von HA festgestellt. Somit scheint die Form der Glykosylierung stark von der Wachstumstemperatur und der Fermentationsdauer beeinflusst zu werden.

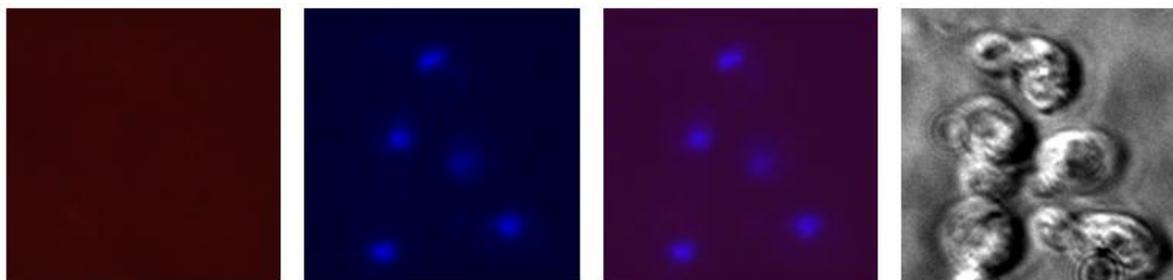
3.2.3.2. Lokalisierung/Kompartimentierung von HA in der Hefezelle

In der HA₂-Domäne des Hämagglutinins befinden sich im C-terminalen Bereich viele ungeladene Aminosäuren, die als Membrananker dienen [157]. Aufgrund der vorhandenen Glykosylierung wurde bereits davon ausgegangen, dass HA in *K. lactis* ebenfalls Membran-assoziiert vorliegen könnte. Für eine genauere Bestimmung der Lokalisation in der Zelle wurden Immunfluoreszenz-Untersuchungen (IF) mit dem Stamm VAK952 (PR8-HA) durchgeführt (Abbildung 33). Die Markierung von PR8-HA erfolgte mit den Antikörpern CM1-1 und anti-*mouse*-Alexa555 Antikörper. Zur Lokalisierung der Zellkerne wurde außerdem eine DAPI-Färbung durchgeführt. Um eine unspezifische Reaktion der Antikörper auszuschließen, wurde der Stamm VAK367 als Kontrolle mitgeführt.

VAK952 (PR8-HA)



VAK367



CM1-1

DAPI

Merge

DIK

Abbildung 33: Immunfluoreszenz von Zellen der Stämme VAK367 und VAK952 (PR8-HA). Für die IF wurde VAK952 (PR8-HA) und der Kontrollstamm VAK367 6 h in 2 % Laktose YEP-Medium angezogen und die Zellen mit Formaldehyd fixiert. Die Zellwand wurde mit Zymolyase entfernt. Zur Markierung von PR8-HA wurden die Hefen mit dem monoklonalen Antikörper CM1-1 (Wistar Institute Collection, Camden, NJ) und dem anti-*mouse*-Alexa555 Antikörper (Invitrogen) hybridisiert. Zum Anfärben der DNA wurde außerdem DAPI verwendet. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Zeiss Axioskop mit den entsprechenden Anregungsfiltern für PR8-HA-Alexa555 (rot) und DAPI (blau) und mittels Differentialinterferenzkontrast im Durchlicht (DIK).

Da in den Zellen vom Stamm VAK367 keine Antikörpermarkierung festgestellt werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass die IF für das PR8-HA-Protein spezifisch ist. In den Proben vom Stamm VAK952 (PR8-HA) wurde ein HA-Signal um die Zelle herum detektiert. Da für die IF die Zellwand abgespalten wurde und HA ein Membranprotein ist, deutet dies auf eine Plasmamembran-Lokalisierung hin. Zusätzlich wurde PR8-HA innerhalb der Zelle nachgewiesen. Eine Überlagerung mit der DAPI-gefärbten Aufnahme (Merge) zeigte, dass PR8-HA überwiegend um den Kern herum lokalisiert ist. Da in diesem Bereich die Membranen des endoplasmatischen Retikulums (ER)

angeordnet sind und Glykoproteine während des Transportes diese passieren, wurde vermutet, dass es zusätzlich in den ER-Membranen konzentriert vorliegt.

Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden ER-Membranen mittels differentieller Zentrifugation isoliert. Hierfür wurden zunächst Spheroblasten einer induzierten Kultur des Stammes VAK952 (PR8-HA) gewonnen, die anschließend über chemische Lyse aufgebrochen wurden. Der Gesamtextrakt wurde dann bei 800 x g zentrifugiert, wobei nicht aufgeschlossene Hefezellen und größere Zellbestandteile, wie zum Beispiel die Plasmamembran, sedimentieren (P_{800}). Der Überstand wurde anschließend bei 27.000 x g zentrifugiert, wobei kleinere Zellbestandteile wie ER- und Golgi-Membranen sedimentieren ($P_{27.000}$). Anschließend wurde das Pellet gelöst und auf ein Saccharose-Kissen geladen, bei dem sich ER-Membranen in der Interphase anreichern sollten (Abbildung 34A).

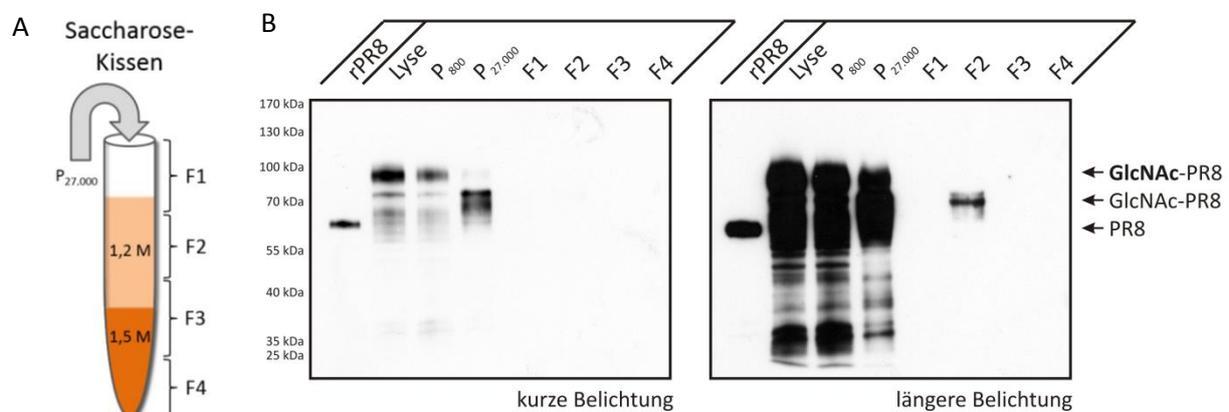


Abbildung 34: Isolation von ER-Membranen des Stammes VAK952 (PR8-HA) zur Lokalisation von PR8-HA. A: Zur Isolation der ER-Membranen wurden Zellen von VAK952 (PR8-HA) mit Glasperlen lysiert (Lyse) und bei 800 x g und 27.000 x g zentrifugiert. Das Pellet ($P_{27.000}$) wurde anschließend auf ein 1,2 bzw. 1,5 M Saccharose-Kissen geladen und für 1 h bei 105.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Kissen in vier Fraktionen (F1-F4) geerntet. B: Zusammen mit den Pellets P_{800} und $P_{27.000}$ wurden die Fraktionen F1 bis F4 mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Als weitere Kontrolle wurde rekombinantes PR8-HA-Protein aus *E. coli* (rPR8-HA) mit aufgetragen. PR8-HA wurde mit CM1-1 und dem anti-mouse-HRP Antikörper markiert.

Die einzelnen Fraktionen wurden mittels Western Blot untersucht, wobei es zunächst nicht gelang, in den Fraktionen vom Saccharose-Kissen PR8-HA nachzuweisen. Deshalb wurden die Fraktionen anschließend mit den Detergenzien Dodecyl- β -D-Maltopyranosid (DDM) und Cholesterylhemisuccinat (CHS) behandelt, um das Protein aus den Membranen zu lösen.

Die Fraktion P_{800} enthielt hauptsächlich PR8-HA, das bei einem Molekulargewicht von ca. 90 kDa lag und somit wahrscheinlich stark glykosyliert war (Abbildung 34B). Da sich in dieser Fraktion auch die Plasmamembranen befinden sollten, ist davon auszugehen, dass hier der Großteil des HA aus diesen Membranen isoliert wurde. Schwächer glykosyliertes Protein (ca. 75 kDa) wurde in der Fraktion $P_{27.000}$ detektiert, das sich im anschließenden Zentrifugationsschritt bei 1,2 M Saccharose-Lösung anreicherte. Da sich in diesem Bereich die ER-Membranen befinden sollten und das Protein nicht so stark modifiziert zu sein schien, wurde daraus geschlossen, dass PR8-HA ebenfalls in ER-Membranen

lokalisiert ist. Diese Ergebnisse unterstützen die IF-Daten, bei denen PR8-HA sowohl in der Plasmamembran als auch im ER-Kompartiment detektiert wurde.

3.2.3.3. Trimerisierung von HA

Hämagglutinin liegt auf der Virusoberfläche als Homotrimer vor, wobei die Trimerisierung in Metazoen bereits kotranslational zusammen mit der Faltung und Glykosylierung erfolgt [158]. Verschiedene Arbeiten zeigten, dass eine Vakzinierung mit dem trimeren HA effektiver ist als mit dem Monomer [159];[160];[161]. Für die Trimerisierung sind posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierung und die Ausbildung von Disulfidbrücken notwendig. Da Hefezellen in der Lage sind beide Modifikationen vorzunehmen, stellte sich die Frage, ob das HA in den Expressionsstämmen ebenfalls als trimeres Protein organisiert ist. Für diese Untersuchung sollten Proteinextrakte vom Stamm VAK952 (PR8-HA) und dem Kontrollstamm VAK367 auf einem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend im Immunblot analysiert werden (Abbildung 35). Da PR8-HA Membran-assoziiert vorliegt, musste dieses zuvor mittels Detergenz solubilisiert werden. In Vorversuchen wurde das beste Solubilisierungsergebnis mit Lauryldimethylamin-N-oxid (LDAO) erzielt, wenn der Proteinextrakt für eine Stunde bei 4 °C inkubiert wurde (Daten nicht gezeigt). Die native Polyacrylamidgel-Gelelektrophorese erfolgte mittels *Blue Native*-PAGE (BN-PAGE) nach dem Protokoll von Wittig *et al.*, wobei Proteinkomplexe anhand ihrer Größe aufgetrennt werden [128].

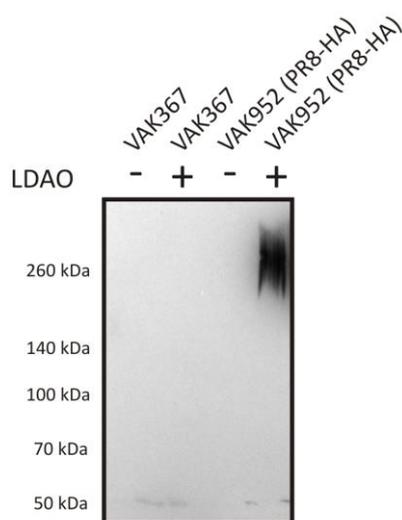


Abbildung 35: Untersuchung von PR8-HA-Trimeren mittels *Blue Native*-PAGE. Hefen vom Stamm VAK367 und VAK952 (PR8-HA) wurden über Nacht in 2 % Laktose YEP-Medium kultiviert und deren Proteinextrakte gewonnen. Die Proben wurden zum Teil mit dem Detergenz Lauryldimethylamin-N-oxid (LDAO) inkubiert und mittels *Blue Native*-PAGE in einem 7 % Acrylamid-Gel aufgetrennt. Zum spezifischen Nachweis von PR8-HA wurden die Proteine auf eine Membran transferiert und mit dem Antikörper CM1-1 und anti-*mouse*-HRP Antikörper inkubiert.

Der Western Blot zeigte, dass nach der Behandlung mit Detergenz auf einer Höhe von ca. 260 kDa PR8-HA detektiert werden konnte, das in etwa einem glykosylierten PR8-HA-Trimer entspricht. Ohne eine Solubilisierung mit LDAO konnte kein PR8-HA-Protein detektiert werden, da dieses wahrscheinlich Membran-integriert war und deshalb nicht in das native Gel laufen konnte. Eine weitere Kontrolle zum Nachweis des Monomers mit hitze-denaturiertem, solubilisiertem PR8-HA-Protein konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden, da dieses vermutlich aggregierte und ebenfalls

nicht im Gel aufgetrennt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die Daten der BN-PAGE deuten auf einen oligomeren Zustand des HA-Proteins hin, der einem trimeren Komplex entspricht. Für ein eindeutiges Ergebnis fehlte jedoch die Kontrolle, wie sich das Monomer in einem nativen Gel verhält.

3.2.3.4. Spaltbarkeit von Hämagglutinin in HA₁ und HA₂ durch Trypsin

Nachdem Hämagglutinin im ER gefaltet und glykosyliert wurde, wird es meist noch in der natürlichen Wirtszelle anschließend durch Proteasen in die zwei Untereinheiten HA₁ und HA₂ prozessiert. Die Spaltbarkeit vom HA₀ in HA₁ und HA₂ ist notwendig für die Infektiosität des Virus und bestimmt außerdem dessen Einteilung in hoch-pathogene und niedrig-pathogene Stämme. Niedrig-pathogene Stämme besitzen ein monobasisches HA-Spaltmotiv, das durch Trypsin oder andere Trypsin-ähnliche Serinproteasen hydrolysiert werden kann, die vor allem im Respirations- und Intestinaltrakt vorhanden sind. Dagegen zeichnen sich hoch-pathogene Viren (H5 und H7) durch ein polybasisches Motiv aus, welches durch die intrazelluläre Serinprotease Furin prozessiert wird, die in vielen Zelltypen vorhanden ist und so eine systemische Infektion verursachen kann [162]. Die Spaltung erfolgt zwischen den konservierten Aminosäuren Arginin und Glycin an Position 344/345. Anschließend bleiben beide Untereinheiten über Disulfidbrücken verbunden [158].

Die Hefe-exprimierten Proteine PR8-HA und PR8-CA_{T137E}-HA liegen ungespalten als Vorläuferprotein vor. Wenn die Proteine durch die Protease Trypsin in HA₁ und HA₂ prozessiert werden können, ist dies ein weiterer Hinweis dafür, dass HA in seiner nativen Konformation vorliegt [163];[164]. Da die IF-Versuche zeigten, dass PR8-HA unter anderem in der Plasmamembran lokalisiert ist, wurden zunächst Spheroblasten vom Stamm VAK952 (PR8-HA) und dem Kontrollstamm VAK367 isoliert und diese anschließend mit Trypsin inkubiert. Dann wurden Proteinextrakte gewonnen und mittels Western Blot analysiert. Dabei konnte für die Trypsin-behandelte Probe im Vergleich zur Kontrolle ohne Trypsin-Zugabe generell weniger PR8-HA-Protein detektiert werden, jedoch kein spezifisches Spaltprodukt (Daten nicht gezeigt).

In einem weiteren Versuch wurden Hefezellen von VAK367, VAK952 (PR8-HA) und VAK1047 (PR8-CA_{T137E}-HA) zunächst mittels Glasperlen aufgeschlossen und das Lysat mit Trypsin hydrolysiert.

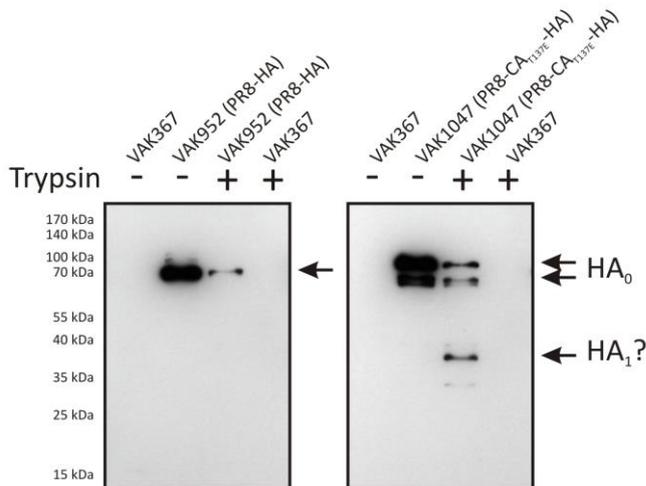


Abbildung 36: Trypsinspaltung von PR8-HA und PR8-CA_{T137E}-HA. Hefen vom Stamm VAK367, VAK952 (PR8-HA) und VAK1047 (PR8-CA_{T137E}-HA) wurden über Nacht in 2 % Laktose YEP-Medium angezogen und die Proteine isoliert. Die Extrakte wurden mit 1 µg/ml TPCK-Trypsin (Sigma Aldrich) für eine Stunde bei 37 °C prozessiert und anschließend mittels SDS-PAGE und Western Analyse untersucht. Die Detektion von PR8-HA und PR8-CA_{T137E}-HA erfolgte mit den Antikörpern CM1-1-AK (Wistar Institute Collection, Camden, NJ) und anti-*mouse*-HRP (Jackson Immuno Research).

Im anschließenden Western Blot wurde für den Stamm VAK952 (PR8-HA) erneut eine Abnahme des Volllängenproteins HA₀-Proteins beobachtet, die auf eine unspezifische Degradation des HA hindeutet (Abbildung 36). Im Gegensatz dazu wurde für den Stamm VAK1047 (PR8-CA_{T137E}-HA) eine weitere starke Bande bei ca. 38 kDa beobachtet. Dies könnte der HA₁-Untereinheit entsprechen, da für die nicht-glykosylierte HA₁-Untereinheit ein Molekulargewicht von ca. 36 kDa kalkuliert wurde (science gateway). Daneben wurden weitere schwächere Signale bei ca. 36 kDa und 39 kDa detektiert, die vermutlich von HA-Proteinen mit unterschiedlichem Glykosylierungsstatus kommen, die ebenfalls für das ungespaltene HA₀ zu beobachten sind. Die HA₂-Domäne konnte mit dem verwendeten monoklonalen Antikörper nicht nachgewiesen werden, da das Erkennungspeptid in der HA₁-Untereinheit lokalisiert ist. Eine Spaltung in die Untereinheiten HA₁ und HA₂ deutet darauf hin, dass PR8-CA_{T137E}-HA Trypsin-resistent und nativ gefaltet ist. Hingegen konnte für PR8-HA kein Spaltprodukt beobachtet werden, was auf ein anders gefaltetes Protein hindeutet.

3.2.3.5. Abschätzung der PR8-HA-Proteinmenge pro Hefezelle

Für die Vakzinierungsversuche und deren Beurteilung war eine Quantifizierung der PR8-HA-Menge in der Hefezelle von Interesse. Anders als bei der VP2_{T25}-Quantifizierung wurde das Protein, welches als Referenzwert genutzt wurde, aus *E. coli* gewonnen. Hierfür wurden zwei PR8-HA-Konstrukte in den Expressionsvektor pET21b kloniert (pET21_PR8-HA und pET21_PR8-HA'(330)) und in den *E. coli*-Stamm Rosetta (DE3) pLysS transformiert. Dabei wurde neben dem Volllängen-PR8-HA außerdem eine C-terminal, verkürzte Variante, die nur 330 AS kodierte, exprimiert. In einem Expressionsversuch und anschließender Western Analyse fanden sich beide Proteinkonstrukte in der nicht-löslichen Fraktion, wobei deutlich mehr Protein des verkürzten HA detektiert wurde (Daten nicht gezeigt). Da der Immunblot zur Quantifizierung mit einem monoklonalen Antikörper, der ein Peptid innerhalb der erste 330 AS bindet, durchgeführt werden sollte und das verkürzte Protein ein stärkeres Signal im Coomassie-gefärbten SDS-Gel zeigte, wurde dieses Konstrukt gewählt. Dabei wurde die rPR8-

HA'(330)-Proteinmenge im SDS-Gel mit einer BSA-Eichreihe verglichen. Da das HA in *K. lactis* glykosyliert vorliegt, wurde für die Quantifizierung zuvor eine Deglykosylierung der Proteine durchgeführt (vgl. 3.2.3.1). Damit sollte ausgeschlossen werden, dass es aufgrund der zusätzlichen Zuckerreste zu einer verminderten Antikörpererkennung des Hefe-HA im Vergleich zum nicht-glykosyliertem Protein aus *E. coli* kommt. Die Deglykosylierung erfolgte enzymatisch mit Peptid-N4-(N-acetyl- β -glucosaminyl)-Asparaginamidase (PNGase F). Anschließend wurden im Western Blot Proben des PNGase F-behandelten Proteins vom Stamm VAK952 (PR8-HA) mit dem rekombinanten Protein aus *E. coli* densitometrisch verglichen (Abbildung 37). So wurde eine PR8-HA-Menge von ca. 3,8 fg pro Hefezelle ermittelt.

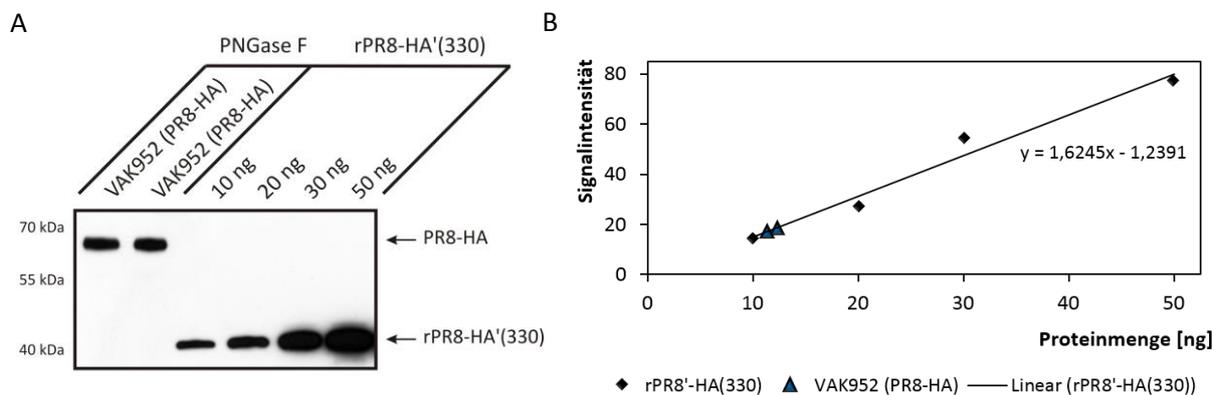


Abbildung 37: Quantifizierung der PR8-HA-Menge im Stamm VAK952 (PR8-HA). **A:** Der Stamm VAK952 (PR8-HA) und der Kontrollstamm VAK367 wurden für acht Stunden in 2 % Laktose YEP-Medium angezogen und nach der Denaturierung mit PNGase F (NEB) behandelt. 0,075 ODE (ca. $2,6 \times 10^6$ Zellen) wurden zusammen mit definierten Mengen von *E. coli*-exprimiertem PR8-HA'(330)-Protein mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht. Zum Nachweis von PR8-HA wurde die Membran mit den Antikörpern CM1-1 und anti-mouse-HRP inkubiert. **B:** Ausgewertet wurde der Western Blot densitometrisch mit der Software Image Lap 3.0 (BioRad), wobei eine Eichgerade des rPR8-HA'(330) erstellt wurde und die Proben von VAK952 (PR8-HA) damit verglichen wurden. Die so ermittelte PR8-HA-Menge pro Hefezelle ergab ca. 3,8 fg.

3.2.4. Orale und subkutane Immunisierung von Mäusen mit PR8-HA-Hefen

Die generierte PR8-HA-Hefe sollte anschließend in Immunisierungsexperimenten getestet werden. Bei dem Virusstamm A/Puerto Rico/8/34(Cambridge) (H1N1) handelt es sich um ein Maus-adaptiertes Virus, wodurch es als Modellsystem gut geeignet ist. Für die Vakzinierungsexperimente, die von Dr. Martina Behrens (AG mikrobielle Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg) durchgeführt wurden, wurde der Stamm VAK953 (PR8-HA;GAL4) verwendet, da dieser die höchste PR8-HA-Proteinausbeute zeigte. Die Hefen wurden fermentiert, getrocknet und zum Teil hitze-inaktiviert (inaktiv). Anschließend wurden die Hefen im Immunblot hinsichtlich der PR8-HA-Stabilität untersucht, wobei bei den hitze-inaktivierten im Vergleich zu den nicht-inaktivierten Hefen (lebend) etwas weniger PR8-HA-Protein nachgewiesen wurde (Abbildung 38A). Als Kontrollstamm wurde VAK907 (GAL4) verabreicht, bei dem wie in VAK953 (PR8-HA;GAL4) eine zusätzliche KIGAL4-Genkopie mittels des pLI1-Plasmids genomisch integriert wurde. Des Weiteren sollte der Einfluss der Adjuvantien Saponin und Freund's Adjuvans auf den Immunisierungserfolg untersucht werden. Dafür

wurde jeweils fünf von zehn Mäusen pro Gruppe der Wirkstoffverstärker verabreicht. Das Schema der Vakzinierung, sowie die verabreichte Hefemenge und die kalkulierte PR8-HA-Proteinmenge ist in Abbildung 38B zusammengefasst. 14 Tage nach der letzten Applikation wurde den Tieren das Blut entnommen und das Serum aufgearbeitet.

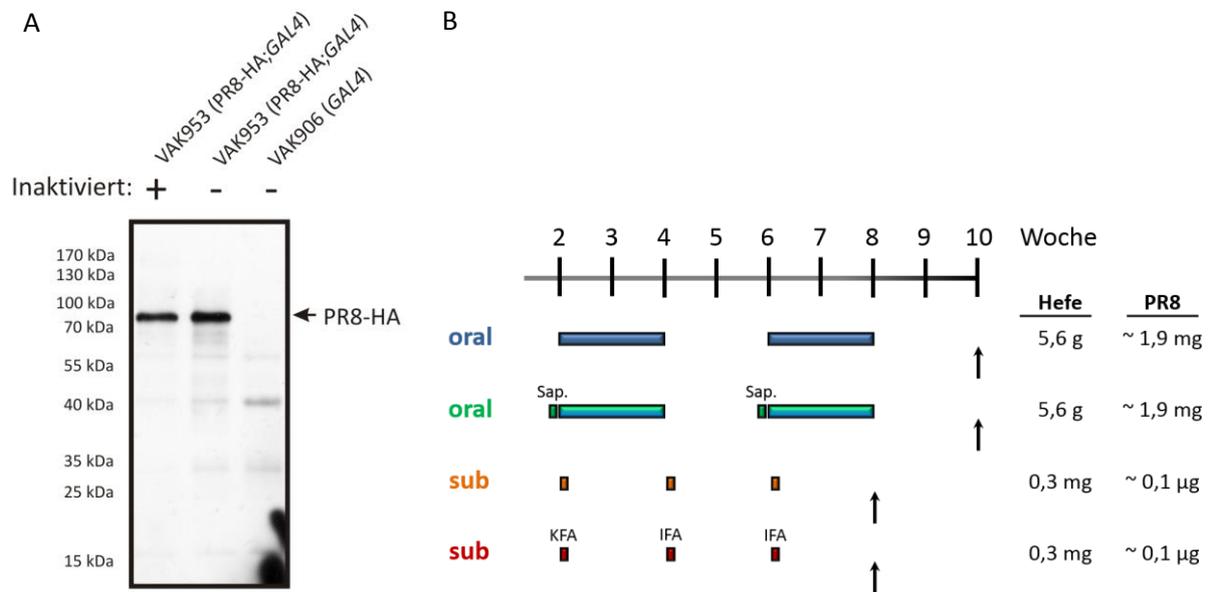


Abbildung 38: Übersicht des Immunisierungsversuchs mit Mäusen und PR8-HA-Hefen. **A:** Die Stämme VAK907 (GAL4) und VAK953 (PR8-HA;GAL4) wurden zu Vakzinierungszwecken mittels *fed-batch* Fermentation in Laktose YEP-Medium angezogen. Anschließend wurden die Hefen gefriergetrocknet und zum Teil für zwei Stunden bei 90 °C hitze-inaktiviert. Die Überprüfung der PR8-HA-Stabilität erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot. Zum Nachweis von PR8-HA wurden die Antikörper CM1-1 und anti-*mouse*-HRP AK verwendet. **B:** Sechs Wochen alte Mäuse wurden mit *K. lactis* VAK907 (GAL4) und VAK953 (PR8-HA;GAL4)-Hefen oral (blau) und subkutan (rot) vakzinert. Einigen Gruppen wurden zusätzlich die Adjuvantien Saponin (grün) und Freund's Adjuvans (orange) appliziert. Die orale Verabreichung erfolgte für zwei 14tägige Perioden mit 2 g pulverisierte Hefe pro Tag zusammen mit Futter. Die subkutane Immunisierung erfolgte mit 0,1 mg rekombinanter Hefe dreimal im Abstand von 14 Tagen. 14 Tage nach der letzten Hefegabe wurden die Tiere euthanasiert und zur Untersuchung der Immunantwort Blut entnommen (Pfeil).

Die Seren wurden auf Virus-neutralisierende Antikörper mittels Plaque-Reduktionsassays untersucht. Hierfür sollten wie beim H7N3-Plaque-Assay 100 PFU des Virusstammes A/Puerto Rico/8/34(Cambridge) (H1N1) (zur Verfügung gestellt von PD. Dr. Thorsten Wolff, RKI, Berlin) mit den Seren neutralisiert werden. Anschließend wurden mit dem Ansatz MDCK-Zellen infiziert. Die Ergebnisse des Versuches sind in Abbildung 39 zusammengefasst, wobei die Kontrollinfektion ohne Serum als 100 % Plaques angenommen wurde und die Anzahl der Plaques nach der Neutralisation mit den einzelnen Mäuseseren prozentual dargestellt sind.

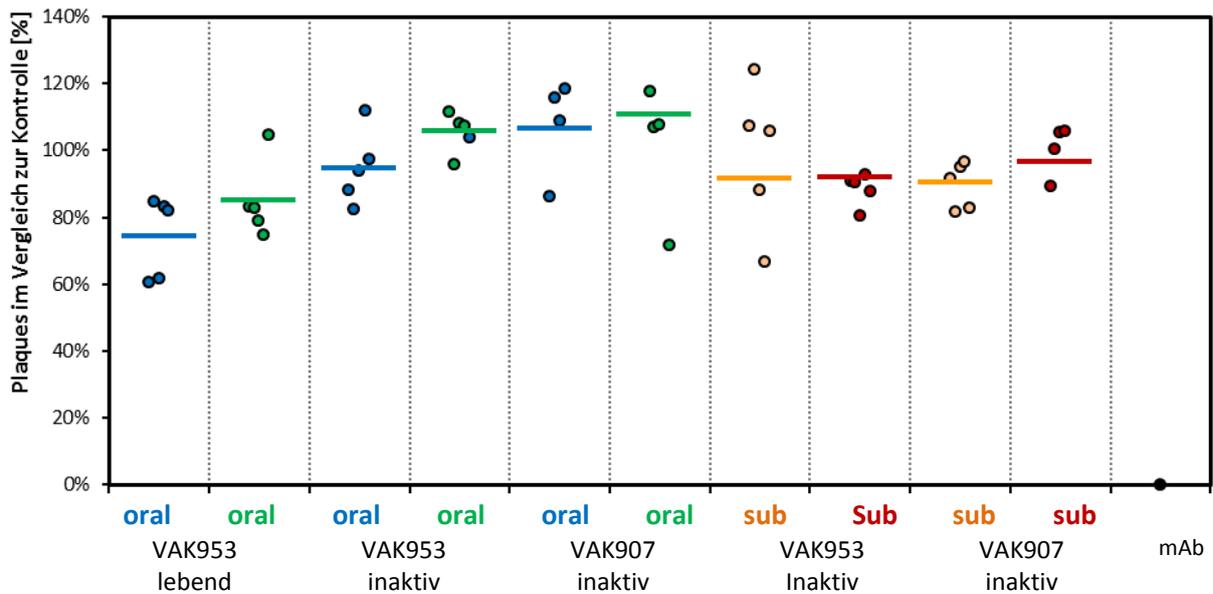


Abbildung 39: Virusneutralisationsassay nach der Immunisierung von Mäusen mit PR8-HA-Hefen. Der Virusneutralisationsassay erfolgte mittels Plaque-Assay mit A/Puerto Rico/8/34(Cambridge)-Viren und MDCK-Zellen. Ermittelt wurden die relativen Plaques im Vergleich zur Kontrolle ohne Serum (entspricht 100 % Plaques). Als weitere Kontrolle für eine Neutralisation wurde der Virus-neutralisierende Antikörper H37-66 (Wistar Institute Collection, Camden, NJ) verwendet (mAb). Dargestellt ist die relative Plaque-Anzahl der einzelnen Seren (Punkt) und der ermittelte Durchschnittswert für die Gruppen (Balken) 14 Tage nach der letzten Applikation.

Wie in Abbildung 39 ersichtlich konnte im Vergleich zur Kontrolle ohne Serum keine deutliche Reduktion der Plaques erzielt werden. Lediglich bei der Kontrolle mit dem monoklonalen Antikörper wurden weniger Plaques beobachtet, was auf eine Neutralisation der Viren zurückzuführen ist.

Die Seren wurden ebenfalls im WB getestet. Dafür wurden *E. coli*-Proteinextrakte (mit den Plasmiden pET21_PR8-HA bzw. pET21_PR8-HA'(330) transformiert) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot auf eine Membran transferiert. Diese wurde anschließend mit den Seren inkubiert. Der Nachweis von gebundenen Antikörpern sollte mit dem anti-*mouse*-HRP Antikörper (Jackson Immuno Research) erfolgen, jedoch konnten auch in dem Versuch keine anti-PR8-HA Antikörper detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

So konnten, wie bereits bei dem H7-Versuch mit Hühnern (vgl. 3.2.1) auch für den PR8-HA-Versuch mit Mäusen, keine Virus-neutralisierenden Antikörper im Serum nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass das Hämagglutinin in den applizierten Hefen keinen Immunschutz gegen Influenza-Viren vermitteln kann.

4. Diskussion

Impfstoffe gegen Geflügelkrankheiten müssen besondere Anforderungen erfüllen. Aufgrund der Vielzahl der Tiere eines Halters sollten diese kostengünstig produziert werden und massenanwendbar sein. Deshalb erfolgt die Impfung bisher meist über das Trinkwasser und seltener über Injektionen. Außerdem sollten Vakzine einen breiten Schutz gegen verschiedene Virusstämme hervorbringen ohne dabei Nebenwirkungen zu verursachen. Attenuierte Viruslebendimpfstoffe, die meist technisch einfach über das Trinkwasser verabreicht werden können, bergen jedoch aufgrund ihrer Infektiosität ein Sicherheitsrisiko wie Immunsuppression und können zu einer reduzierten Gewichtszunahme führen. Zusätzlich erschwert der Einsatz von attenuierten oder inaktiven Viren nach der Impfung die Unterscheidung zwischen geimpften und infizierten Tieren (*DIVA*). Das ist einer der Gründe, warum z. B. Vakzine gegen aviäre Influenza für Vögel zurzeit in der EU nicht zugelassen sind. Ein Hefe-basierter *subunit* Impfstoff ist kostengünstig, hat eine kurze Entwicklungs- und Produktionszeit und erfüllt das *DIVA*-Prinzip, womit eine Vielzahl der Anforderungen erfüllt wäre. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Entwicklung eines solchen Vakzins gegen die Geflügelkrankheiten Infektiöse Bursitis und aviäre Influenza angestrebt und war zumindest für die Infektiöse Bursitis erfolgreich. Warum dies für Influenza nicht gelang und wo die Unterschiede zwischen beiden Vakzinen liegen, soll unter anderem im Folgenden evaluiert werden.

4.1. Expression von IBDV-VP2 und Influenza-Hämagglutinin in *K. lactis*

Seit den 90er Jahren werden *Kluyveromyces lactis*-Hefen erfolgreich für die rekombinante Proteinexpression genutzt. Die Expression erfolgt meist über Plasmide, die vom pKD1-Plasmid aus *Kluyveromyces drosophilarum* abstammen [165]. Die Vorteile gegenüber einer genomischen Integration des Fremdgens sind eine höhere Transformationseffizienz und meist höhere Expressionsraten, da vom Plasmid ca. 60-80 Kopien in der Zelle vorliegen [165];[166]. Dies zeigten ebenfalls die Ergebnisse dieser Arbeit, bei der eine deutlich höhere Fremdproteinmenge von IBDV-VP2_{T2S} beobachtet wurde, wenn es mit Hilfe des pKD1-Plasmidabkömmlings pTS32x und unter Kontrolle des *ScADH1*-Promoters exprimiert wurde. Jedoch zeigte eine Untersuchung, dass die Weitergabe des Plasmides an die Tochterzellen relativ ineffizient war. So trugen nach einer 48-stündigen Kultivierung nur noch 30 % der Zellen ein Plasmid, obwohl die Hefen unter selektiven Bedingungen (2 % Glukose YNB ohne Uracil-Zusatz) angezogen wurden (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund lag der Fokus der Arbeit auf der Generierung von stabilen Stämmen, die eine genomische Integration des Fremdgens trugen. Ein einfaches und effizientes System zur Herstellung von neuen *K. lactis*-Stämmen wurde von Krijger *et al.* entwickelt [104]. Es ermöglicht die genomische Integration des Fremdgens über einen Transformationsschritt, ohne dass dabei ein Marker inseriert wird und die Stämme unter selektiven Bedingungen kultiviert werden müssen. Die Integration erfolgt

über homologe Rekombination in den *LAC4*-Lokus und ermöglicht anschließend die Expression des Fremdgens durch den starken *LAC4*-Promoter.

Die genomische Integration und der anschließende Proteinnachweis erfolgten für die VP2- und PR8-HA-Konstrukte problemlos, nachdem jeweils geeignete Antikörper für den Nachweis der Proteinexpression definiert werden konnten (vgl. 3.1.1 und 3.2.2.1). Nach der Transformation wuchsen zwischen 10 und 50 Kolonien auf Laktose-haltigem Selektivmedium, wobei es bei ca. 80 % der isolierten Kolonien zum gewünschten Verlust des *URA3*-Markers kam und im Western Blot Fremdprotein nachgewiesen werden konnte. Für das CA-HA-Konstrukt war der Protein-Nachweis etwas umständlicher. Erst nachdem die Aminosäure an Position 137 von Threonin nach Glutaminsäure ausgetauscht wurde, die im Erkennungspeptid des monoklonalen CM1-1-Antikörpers liegt, konnte auch das CA-HA-Protein im Immunblot detektiert werden. Allerdings lag die Menge deutlich unter der von PR8-HA im Stamm VAK952 (PR8-HA). Mit dem Austausch des Signalpeptids von CA-HA gegen das von PR8-HA, kam es zu einer deutlichen Erhöhung der nachweisbaren Proteinmenge (vgl. 3.2.2.2). Da das Signalpeptid in Influenza-infizierten Zellen kotranslational durch Signalpeptidasen abgespalten wird, sollte der Austausch keinen Einfluss auf die Immunisierung haben. Die Signalsequenz dient lediglich der erfolgreichen Translokation ins ER, wobei direkt nach der Translation des Signalpeptids Signalerkennungspartikel an die Sequenz binden und die Translation zunächst unterbrochen wird [59]. Erst nachdem sich die Ribosomen an ER-Membranen gelagert haben, erfolgt die weitere Translation direkt ins ER-Lumen. Möglicherweise wurde das CA-HA-Signalpeptid von *K. lactis*-Signalerkennungspartikeln nicht richtig erkannt, wodurch die Translation des Proteins nur sehr ineffizient ins ER erfolgen konnte. Falls CA-HA im Cytoplasma der Zelle translatiert wurde, könnte es zum Abbau des Proteins gekommen sein, da es hier nicht richtig gefaltet werden konnte.

Zur Optimierung der VP2-Expression wurde ein Austausch der zweiten Aminosäure von Threonin nach Serin in der VP2-Sequenz vorgenommen, wodurch die Proteinmenge gesteigert werden konnte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Ursache dafür nicht untersucht. Dieser Effekt wurde bereits für das IBDV-Polyprotein in *S. cerevisiae* beobachtet und mit einer erhöhten Proteinstabilität begründet [140]. Dafür spricht, dass die Halbwertszeit eines Proteins von der N-terminalen Aminosäure bestimmt wird (Ubiquitin-abhängiger *N-end rule pathway*) [137]. Jedoch wurden dabei für Serin und Threonin ähnlich stabilisierende Effekte in Hefezellen beobachtet [138]. Weiterhin werden beide Aminosäuren nach Abspaltung des Methionins acetyliert, um das Protein besser vor Abbau zu schützen. Da in *S. cerevisiae* 28 % der Proteine an zweiter Position Serin und 10 % Threonin tragen, könnte die Proteinsynthese aufgrund der verfügbaren tRNAs effizienter verlaufen. Die Mutation

sollte keinen Einfluss auf den Vakzinierungserfolg haben, da der N-terminale Bereich des VP2-Proteins in keinem antigenen Bereich, sondern im Inneren des Kapsids lokalisiert ist [167].

Ein weiterer Vorteil des *LAC*-Regulons ist, dass es sehr gut charakterisiert ist und eine Manipulation zur Steigerung der Proteinmenge vereinfachte. Die Expression der *LAC*-Gene wird durch Zugabe von Laktose oder Galaktose über *KIGal4* aktiviert und kann durch *KIGal80*, das unter Glukose-Bedingungen an *KIGal4* bindet, reprimiert werden. Das eine Überexpression von *KIGAL4* zu einer erhöhten β -Galaktosidaseaktivität (*Lac4*) führt, zeigten bereits Kuger *et al.* [119]. Eine weitere Möglichkeit zur Manipulation bietet ein *knock out* von *KIGAL80*. Dies sollte eine konstitutive Expression der *LAC*-Gene in Glukose-haltigem Medium zur Folge haben. Beide Möglichkeiten wurden für das Expressionssystem bereits getestet und gingen mit einer gesteigerten Proteinausbeute einher [104];[168]. Ein *KIGAL80 knock out* wurde im Rahmen dieser Arbeit für den VP2_{T2S}-Stamm gesetzt (VAK889 (VP2_{T2S};*gal80Δ*)) und resultierte in einer erhöhten VP2_{T2S}-Proteinmenge im Vergleich zum Ausgangstamm. Weitere Untersuchungen ließen jedoch vermuten, dass die Expression der *LAC*-Gene instabil war, da auf Glukose X-Gal-Platten ein heterogener Phänotyp (blaue und weiße Kolonien) beobachtet wurde (vgl. 3.1.2.2). Für das virale E2-Protein vom Bovinen Virusdiarrhoe-Virus wurden im selben Expressionssystem die gleichen Beobachtungen gemacht [104]. Probleme mit einer *KIGAL80* Deletion im VAK367-Hintergrund beschreiben auch Simon *et al.*, die das VP1-Protein des Polyomavirus exprimierten [168]. Nach einem *gene replacement* für den *KIGAL80 knock out* wurden keine Rekombinanten erhalten, weshalb alternativ eine Kreuzung zwischen dem VP1-Stamm und einem *Klga180Δ*-Stamm durchgeführt werden musste. Auffällig war außerdem, dass die Zellen vom Stamm VAK889 (VP2_{T2S};*gal80Δ*) in einem Fermentationsprozess nach ca. 20 Stunden nicht mehr gewachsen sind, obwohl das Substrat nicht aufgebraucht war. Möglicherweise führte die konstitutive Expression sowohl des Fremdgens als auch der *LAC*-Gene zu einer Stressreaktion, die eine Herunterregulation der *LAC*-Genexpression oder eine genetische Instabilität zur Folge hatten.

Als sehr erfolgreiche Methode die Fremdproteinexpression zu steigern, stellte sich die genomische Integration weiterer *KIGAL4*-Genkopien heraus. Ein positiver Nebeneffekt spiegelte sich in einer höheren Biomasseausbeute im Vergleich zum Kontrollstamm ohne pLI1-Integration wieder. Der Wachstumsvorteil der *KIGAL4*-Stämme könnte in einer verbesserten Laktoseaufnahme und -spaltung begründet sein, da die zusätzlichen *KIGal4*-Moleküle ebenfalls die *LAC12* und *LAC4*-Genexpression steigern sollten. Eine weitere Möglichkeit könnte die Uracil-Prototrophie aufgrund der Integration des kompletten pLI1-Plasmids sein.

Aus früheren Arbeiten war bekannt, dass die Transformation des Plasmids häufig zu Tandemintegrationen führt [104];[141]. Dies sollte für die konstruierten Stämme überprüft werden, was jedoch relativ umständlich war. Eine PCR zum Nachweis von Tandemintegrationen an flankierenden Bereichen war aufgrund der Größe des Plasmids (ca. 10 kb) nicht möglich. Da es

außerdem während der Arbeit nicht gelang einen Southern Blot zu etablieren, wurde eine qPCR an genomischer DNA durchgeführt (vgl. Abbildung 8). Mit dieser Methode konnten relativ eindeutige Ergebnisse mit kleinen Standardabweichungen für die Kontrollen VAK367 und VAK1005 (2xGAL4) erzielt werden, jedoch waren die Ergebnisse für die Stämme VAK890 (VP2_{T2S};GAL4) und VAK953 (PR8-HA;GAL4) nicht so eindeutig. Aufgrund der Kontrollergebnisse können methodische Fehler, wie die Primerauswahl oder Auswertungsmethode, bei der qPCR weitestgehend ausgeschlossen werden. Eine mögliche Ursache könnte eine quantitativ schlechtere DNA aufgrund des Zellaufschlusses (Phenolrückstände oder starke Scherung) bei den beiden Hefestämmen sein, die eine Amplifikation der KIGAL4-Bereiche oder der Kontrollregion (ALG9) nicht im gleichen Maße ermöglichte.

Eine weitere sehr erfolgreiche Methode, die Ausbeute an rekombinantem Protein im *K. lactis*-Expressionssystem zu erhöhen, war die Sequenzoptimierung. Dabei wurde lediglich die kodierende Sequenz jedoch nicht die Aminosäuresequenz verändert. In einer Studie mit 50 humanen Proteinen konnte die Proteinsynthese in der humanen Zelllinie HEK293T aufgrund der Optimierung durchschnittlich um einen Faktor 2 gesteigert werden. Dabei wurden bei 86 % der Proteine nach der Optimierung eine erhöhte Ausbeute im Vergleich zum nicht-optimierten Konstrukt erzielt [169]. In einer anderen Studie, bei der 73 humane Proteine in *E. coli* exprimiert wurden, konnte durchschnittlich eine 3,5fach höhere Expression erreicht werden [143]. In dieser Arbeit wurde zwar nach dem Codon-Adaptions-Index (CAI) von *S. cerevisiae* optimiert, jedoch unterscheiden sich die beiden Hefespezies in diesem Punkt nicht deutlich voneinander [98]. Die Optimierung erfolgte mit Algorithmus von Raab *et al.*, was für VP2_{T2S} zu einem deutlichen Anstieg der Proteinausbeute führte [144]. Neben VP2 wurde die Optimierung außerdem für H7-HA durchgeführt, wobei ebenfalls ein Anstieg der Proteinmenge zu beobachten war (vgl. 3.2). Für die HA-Proteine PR8-HA und CA-HA wurden nur die bereits sequenzoptimierten Konstrukte kloniert, weshalb hierfür keine Rückschlüsse auf eine verbesserte Expression gezogen werden können. Ob die Sequenzoptimierung in den *K. lactis*-Stämmen einen positiven Einfluss auf die Transkription, mRNA-Stabilität oder Translation hat, wurde nicht genauer untersucht. Maertens *et al.* postulieren, dass der positive Einfluss auf die Proteinausbeute vor allem in einem erhöhten mRNA-Level begründet ist [143]. Dagegen zeigte die Studie von Fath *et al.* zusätzlich eine effektivere Translation, die in der Decodierung durch tRNAs begründet sein sollte [169].

Neben der Erzielung von hohen Proteinausbeuten sollte sich die Fremdgenexpression nicht negativ auf das Wachstum der Hefezellen auswirken. Für die Expression von VP2 wurde kein negativer Einfluss beobachtet. Dahingegen wurde für PR8-HA (VAK952 (PR8-HA)) im Vergleich zu VAK367 deutlich geringere Zelldichten von Übernachtskulturen festgestellt (vgl. 3.2.2.1). Dies scheint offensichtlich in der Expression des Antigens begründet zu sein, da dieser Phänotyp vor allem unter

induzierenden Bedingungen beobachtet wurde. Außerdem konnten sekundäre Effekte durch eine Neukonstruktion des Stammes ausgeschlossen werden. In neu generierten Rekombinanten zeigte sich, dass eine hohe *PR8-HA*-Expression mit einem Wachstumsdefizit korrelierte (vgl. Abbildung 28). Eine Überexpression von Fremdproteinen führt häufig zu Stressreaktionen in der Zelle, wodurch der Organismus in seiner Fitness beeinträchtigt ist. Ein Auslöser für eine Stressantwort sind die Akkumulation von ungefalteten oder fehlerhaft-gefalteten Proteinen im ER, die dazu führen, dass Chaperone sich an die fehlerhaft-gefalteten Proteine anlagern und für die Proteinsynthese anderer Proteine nicht verfügbar sind. Dadurch wird die *unfolded protein response* (UPR) angeschaltet. Die Regulation der UPR erfolgt über den Transkriptionsaktivator Hac1p, dessen Synthese über unkonventionelles Spleißen der *HAC1*-mRNA reguliert wird [153]. Die Untersuchung der *HAC1*-mRNA in den Stämmen VAK952 (*PR8-HA*) und VAK953 (*PR8-HA;GAL4*) zeigte, dass durch die Induktion der Proteinsynthese von *PR8-HA* ein vermehrtes Spleißen der *HAC1*-mRNA zu beobachten war und somit die UPR in den Stämmen aktiviert wurde (vgl. Abbildung 29). Außerdem korrelierte der Anteil an gespleißter mRNA in den beiden Stämmen mit der *PR8-HA*-Menge, was darauf hindeutet, dass die Erhöhung der *PR8-HA*-Expression zu einer stärkeren UPR führte. Die Überexpression von *PR8-HA* könnte zu einem Mangel an Chaperonen, Glykosylierungsenzymen und Oxidoreduktasen führen, der falsch-gefaltete Proteine zur Folge hat. Dabei soll die Aktivierung der UPR die Expression dieser Faltungshelferproteine erhöhen. Die UPR könnte außerdem durch die Glykosylierung von *PR8-HA* verstärkt werden, da *PR8-HA* wegen der Mannose-reichen Glykosylierung in *K. lactis* möglicherweise nicht richtig gefaltet werden kann. Dass die Überexpression von Glykoproteinen in *S. cerevisiae* eine UPR-Stressantwort auslösen kann, wurde ebenfalls mit den viralen Proteinen MuHN (Mumps Hämagglutinin-Neuraminidase) und MeH (Masern-Hämagglutinin) beobachtet. Wie bei *PR8-HA* wurde während der Expression der Glykoproteine, ein geringeres Wachstum festgestellt, das jedoch nur zu einer 1,4fach verringerten Biomasseausbeute im Vergleich zum Kontrollstamm führte [170]. Obwohl die Stressantwort im Stamm VAK953 (*PR8-HA;GAL4*) höher war als im Stamm VAK952 (*PR8-HA*) und mehr *PR8-HA* synthetisiert wurde, wuchs der Stamm VAK953 (*PR8-HA;GAL4*) auch unter induzierten Bedingungen besser. Der Wachstumsvorteil könnte jedoch durch die erhöhte Laktoseaufnahme und -verwertung oder die Uracil-Prototrophie verursacht worden sein, wodurch das Wachstumsdefizit kompensiert wurde. Da der Fokus dieser Arbeit auf eine hohe Proteinausbeute gelegt wurde und der Phänotyp durch die zusätzliche Integration von *KIGAL4* weitestgehend aufgehoben werden konnte, wurde mit dem Stamm VAK953 (*PR8-HA;GAL4*) weitergearbeitet.

Für zukünftige Arbeiten mit dem *K. lactis*-Expressionssystem würde sich möglicherweise die Entwicklung eines neuen Ausgangsstammes anbieten. Dieser könnte auf dem Stamm VAK1005 (*2xGAL4*) basieren, der bereits eine zusätzliche Genkopie von *KIGAL4* an einem anderen Locus trägt. Damit wäre die *KIGAL4*-Kopienzahl definiert und zusätzlich wäre der Verlust des integrierten Locus

durch homologe Rekombination erschwert. Damit die Anpassung der kodierenden Sequenz an die Hefe-CAI nicht für jedes Antigen neu durchgeführt werden muss, würde sich außerdem die Überexpression seltener tRNAs anbieten. Außerdem könnte die heterologe Proteinexpression durch eine Überexpression von Chaperonen und Faltungskatalysatoren gesteigert werden. Eine erhöhte Gendosis von *KIPDI1* (Protein-Disulfidisomerase) und *KIERO1* (ER-Oxidase 1), deren Produkte bei der oxidativen Faltungsmaschinerie eine Rolle spielen, führte zu einer deutlichen Sekretionssteigerung von disulfidverbrückten, rekombinanten Proteinen [171];[172]. Da HA Disulfidbrücken besitzt und eine Stressantwort (URP) wahrscheinlich aufgrund falsch-gefalteter Moleküle ausgelöst wurde, könnte eine Überexpression der beiden Gene eventuell auch hier die Produktausbeute steigern.

4.2. Charakterisierung der Antigene

Für eine erfolgreiche Immunisierung mit der Ausbildung Virus-neutralisierender Antikörper ist häufig eine native Konformation der Antigenproteine essentiell. Bei VP2 sind die Faltung sowie eine anschließende Assemblierung besonders wichtig, da eine Vakzinierung mit denaturiertem Protein nicht erfolgreich war [173]. Für Hämagglutinin ist die Faltung zwar nicht zwingend notwendig, jedoch erhöht sie den Immunisierungserfolg deutlich. Neben der Faltung wird der Einfluss der HA-Glykosylierung auf die Induktion von neutralisierenden Antikörpern kontrovers diskutiert. Um die Vakzinierungsergebnisse besser interpretieren zu können, erfolgte eine Charakterisierung der rekombinanten Proteine.

Für VP2 wurde nach der Expression in verschiedensten Organismen eine Assemblierung zu so genannten subviralen Partikeln (SVP) beobachtet. Die SVP-Ausbildung ist vor allem in Insektenzellen sehr gut untersucht [136];[174]. Dabei wurden sowohl Partikel mit einer T=1 (ca. 23 nm) als auch T=13 (ca. 60 nm) Struktur isoliert und charakterisiert. Zur Bildung von T=13 Partikeln kam es jedoch nur, wenn VP2 entweder zusammen mit VP3 exprimiert wurde oder aber VP2 N-terminal mit einem His-Tag fusioniert war. Aufgrund von Sequenz-Ähnlichkeiten zu VP3 wurde postuliert, dass der *Tag* vermutlich die Gerüstfunktion von VP3 übernimmt. T=13 Partikel setzen sich aus VP2-Trimeren zusammen, die sich wiederum zu 120 Hexamere und zwölf Pentamere anordnen. Dahingegen werden die T=1 Partikel nur aus Pentameren gebildet. Die Assemblierung wird jedoch stark von verschiedenen Faktoren beeinflusst, wie zum Beispiel dem *scaffold* Protein VP3, der Protease VP4 (Prozessierung von pVP2), sowie der Flexibilität des VP2-C-Terminus, der mit der amphipathischen α -Helix (AS 443 bis 452) von VP2 interagiert.

Für das in *K. lactis* exprimierte VP2_{T25}-Konstrukt konnten keine SVPs mittels Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden (vgl. 3.1.3.2). Zwar sedimentierte VP2_{T25} bei einer Dichte (1,14-1,16 g/cm) im Saccharose-Gradient, die zumindest auf größere Oligomere schließen lässt, jedoch könnte diese auch auf VP2-Tubuli zurückzuführen sein, die aber ebenfalls nicht nachgewiesen werden konnten. Das

Konstrukt für die *K. lactis*-Expression war 456 AS lang. Die Kristallstruktur von VP2 zeigt, dass die AS 443 bis 452 eine amphipathische α -Helix bilden, die die Ausbildung der unterschiedlichen Konformationen (Pentamere und Hexamere) ermöglicht. Die weiteren C-terminalen AS sind dagegen flexibel und ragen in das Innere des Kapsids [174]. Das reife VP2-Protein im Virion ist lediglich 441 AS lang, da es während der Virusassemblierung zwischen den Positionen 441/442 autoproteolytisch gespalten wird [25];[33]. Dennoch zeigen die Daten aus Insektenzellen, dass mit dem 456 AS langen Konstrukt eine effiziente T=1 Assemblierung möglich ist [136];[174]. Dass der Austausch der zweiten Aminosäure in VP2_{T25} die Partikelbildung unterbinden könnte, wurde mit einer Kontrollreinigung aus Stamm VAK887 (VP2), der das native VP2-Protein exprimiert, ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt). Auch eine Erhöhung der VP2_{T25}-Expression mit einem *multicopy* Plasmid, bei dem die Proteinausbeute im Vergleich zum Stamm VAK890 (VP2_{T25};GAL4) deutlich größer war, führte nicht zum Nachweis von SVPs in *K. lactis*. Dass eine SVP-Anordnung von IBDV-VP2 auch in Hefen erfolgen kann, zeigte eine Expression in *S. cerevisiae* [130]. Um auszuschließen, dass lediglich *K. lactis* nicht in der Lage war, diese Partikel auszubilden, wurde das VP2_{T25}-Konstrukt ebenfalls in einem *S. cerevisiae*-Stamm getestet. Allerdings führte auch diese Reinigung nicht zum Nachweis von SVPs. In der Arbeit von Garriga *et al.* wurden nur die ersten 452 AS exprimiert, was möglicherweise für die Kapsidbildung in Hefe von Vorteil ist [130]. Außerdem wurden die Arbeiten in Insektenzellen und *S. cerevisiae* mit dem VP2-Protein vom Soroa-Stamm durchgeführt, das sich in zwei Positionen von D78-VP2 unterscheidet (Soroa_{PositionD78}: S₅Q und R₂₄₉Q). Möglicherweise behindern insbesondere die Austausche im N-Terminus die Kapsidbildung, da sie womöglich deren Flexibilität einschränken könnten. Zur Überprüfung der Hypothese bietet sich die Expression des Soroa-Konstrukts in *K. lactis* an. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Expression in *K. lactis* zu gering war und die Moleküldichte in der Zelle für eine spontane Assemblierung nicht ausreichte.

Die Kapsidbildung für VP2 zu optimieren, könnte den Immunisierungserfolg noch steigern. Denn VP2 beinhaltet mindestens drei konformations-abhängige Epitope, die für die Induktion von Virus-neutralisierenden Antikörpern relevant sind [10];[79];[173]. Zwar werden die Tubuli ebenfalls durch VP2-Trimere gebildet, jedoch ist eine Immunisierung mit diesen oder irregulären Partikeln weniger effizient [39]. Potentielle Ansatzpunkte zur Optimierung wäre beispielsweise die zusätzliche Expression von VP3, welches als *scaffold*-Protein bei der T=13 Struktur fungiert. Auch die Fusion eines N-terminalen His-Tags, wie in den Arbeiten von Saugar *et al.* und Luque *et al.* beschrieben, könnte versucht werden [136];[174]. Eine Expression vom Polyprotein, das in einigen Organismen nach der Autoproteolyse durch VP4 in Virus-analoge Partikel assembliert, wurde im *K. lactis*-Expressionssystem bereits getestet. Allerdings war dies ebenfalls nicht erfolgreich, da es zu einer Degradation von VP2 führte (Daten nicht gezeigt).

Influenza-Hämagglutinin ist ebenfalls auf der Virusoberfläche als Trimer assembliert. Allerdings ist die Trimerisierung anders als bei VP2 für den Impferfolg nicht zwingend notwendig, jedoch fördert es diesen [159];[160];[161]. Dies liegt vermutlich daran, dass HA als Monomer in einer Konformation vorliegt, die sonst erst nach der Infektion im Zellinneren bei einem erniedrigten pH-Wert ausgebildet wird. Dahingegen präsentiert das trimere HA die Epitope, die genauso auf der Virusoberfläche exponiert sind [161]. Ob die HA-Proteine, die im *K. lactis*-Expressionssystem gebildet werden, dem nativen Zustand entsprechen, wurde in dieser Arbeit versucht zu evaluieren. Die Daten der nativen Gelelektrophorese deuten an, dass PR8-HA Trimere bilden könnte, da das Protein in nicht-denaturierender PAGE bei entsprechendem Molekulargewicht läuft. Jedoch konnte keine geeignete Kontrolle mitgeführt werden, die dem PR8-HA-Monomer entsprach, womit die Ergebnisse nicht als eindeutig zu bewerten sind (vgl. 3.2.3.3). Dass PR8-HA nicht die native Konformation einnimmt, deuten die Ergebnisse der Trypsinbehandlung an. Trypsin kann als Indikator genutzt werden, um zu testen, ob HA in seiner nativen Konformation und als Trimer vorliegt, da es nur so vor der Protease geschützt ist. Bei nativer Faltung sollte es lediglich zu einer Prozessierung in HA₁ und HA₂ kommen. Ansonsten wird eine generelle Proteolyse des Proteins beobachtet. Da für PR8-HA nach der Inkubation mit TPCK-behandeltem Trypsin nur ein unspezifischer Abbau und kein Produkt beobachtet wurde, das HA₁ entsprechen würde, ist das Protein möglicherweise nicht nativ gefaltet oder trimerisiert (vgl. 3.2.3.4). Für das Konstrukt von PR8-CA_{T137E}-HA war hingegen neben dem unspezifischen Abbau auch ein deutliches Signal zu sehen, das dem gespaltenen HA₁ entsprechen könnte. Diese Trypsin-Resistenz deutet auf einen nativen Zustand hin [164]. Das Ergebnis ist wiederum kontrovers zur nativen Gelelektrophorese. Dort wurde für PR8-CA_{T137E}-HA keine eindeutige Bande detektiert sondern nur ein diffuses Signal über die gesamte Spur (Daten nicht gezeigt). Dies könnte allerdings auch auf Proteinabbau während des Zellaufschlusses oder der Solubilisierung zurückzuführen sein. Beide Experimente sind somit nicht ausreichend, um Informationen zur Konformation von HA nach der Expression in *K. lactis* zu erhalten. Ein weiterer, häufig genutzter Assay zur Untersuchung der HA-Aktivität ist der Hämagglutinationstest. Dieser wäre jedoch sehr aufwendig, da der Test nur mit gereinigtem Protein möglich ist.

Die Trimerisierung von HA erfolgt bereits kotranslational und wird von der Glykosylierung und durch die Bildung von Disulfidbrücken beeinflusst [159]. Für die untersuchten HA-Varianten PR8-HA und PR8-CA_{T137E}-HA konnte eine N-Glykosylierung in *K. lactis* mittels PNGase F-Behandlung festgestellt werden, womit eine wichtige Modifikation des Proteins gegeben ist (vgl. 3.2.3.1). Jedoch ist die Glykosylierung ein sehr komplexer Vorgang, der in verschiedenen Organismen sehr unterschiedlich erfolgt. So weicht die Glykosylierung in Hefen deutlich von der in höheren Eukaryoten ab und ist auch zwischen den Hefegattungen *K. lactis* und *S. cerevisiae* unterschiedlich stark ausgeprägt [175]. Das wiederum könnte die korrekte Faltung und Assemblierung von HA beeinträchtigen. Die Mannose-

reiche Glykosylierung der Milchehen erfolgt ohne N-Acetylglukosamine, Galaktose, Fukose und Sialinsäuren, die jedoch Bestandteile der humanen, komplexen Glykosylierung sind. Die Mannose-Reste führen oft dazu, dass ein Großteil der Glykoproteine aus Hefe an Mannoserezeptoren bindet, womit jedoch nur eine schwache pharmakokinetische Antwort induziert werden kann. Aus diesem Grund werden Hefen bisher kaum für die Produktion von Glykoproteinen in der pharmazeutischen Industrie genutzt und es wird intensiv an der Humanisierung der N-Glykosylierung gearbeitet [176]. Außerdem kann die Mannose-reiche Glykosylierung direkt den Immunisierungserfolg durch eine Maskierung der potentiellen Antigene behindern.

Die Anzahl und Position der Glykosylierungsstellen ist zwischen den Influenza-Stämmen nicht konserviert, sondern variiert meist zwischen fünf und elf Positionen [67]. Die Verteilung der Stellen wird durch verschiedene Faktoren bestimmt und dient vor allem der Maskierung der Antigenbereiche, womit das Virus vor einer Erkennung durch das Immunsystem geschützt wird. Dennoch kann nicht das gesamte Protein durch Kohlenhydratketten abgeschirmt werden, da sie an bestimmten Stellen das Virus inhibieren. So dürfen die Glykane nicht zu dicht an der Schnittstelle zwischen HA₁ und HA₂ liegen, da ansonsten Proteasen das Protein nicht spalten können und der Viruseintritt behindert ist [177]. Außerdem inhibieren Kohlenhydratketten im Bereich der Rezeptorbindetaschen die Replikation und die Freisetzung der Viren [178].

Im Rahmen dieses Projektes konnten zumindest nach subkutaner Applikation von Mäusen mit H7-HA-Hefe (VAK880 (H7-HA;GAL4)) neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden. Das aviäre HA hat jedoch nur vier potentielle Glykosylierungsstellen, wohingegen PR8-HA sieben enthält (ermittelt mit der Software NetNGlyc 1.0, *Technical University of Denmark*). Dies könnte den Immunisierungserfolg beeinflusst haben, da das Protein weniger maskiert bzw. die Konformation nicht so stark von der Modifikation beeinflusst sein sollte. Allerdings konnte weder nach subkutaner noch nach oraler Vakzinierung von Hühnern mit H7-HA eine Antikörperantwort beobachtet werden. Das Ausmaß der Modifikation scheint jedoch auch stark von den Anzuchtbedingungen abhängig zu sein. Darauf lassen zumindest die Daten von parallel laufenden Fermentationsprozessen mit unterschiedlichen Temperaturen schließen. Diese zeigten, dass die Glykosylierung sowohl von der Temperatur als auch von der Prozessdauer abhängig war (vgl. Abbildung 32). Des Weiteren ist die Glykosylierung von Proteinen abhängig von der Lokalisation in der Zelle. Entsprechend wurde erwartet, dass in der Zellmembran verankertes HA vollständig modifiziert ist, wohingegen ER-lokalisiertes Protein kürzere Kohlenhydratketten gebunden haben sollte. IF-Bilder zeigten relativ viel Protein in internen Membranen, vermutlich der ER-Membranen, das weniger stark modifiziert war als in der Plasmamembran. Jedoch muss hierbei berücksichtigt werden, dass die Glykosylierung die Antikörperbindung von CM1-1 beeinflusst, was wahrscheinlich die Interpretation der Verteilung des HA-Proteins in den IF-Aufnahmen verfälscht. In jedem Fall wurde mit unterschiedlich stark

modifiziertem HA immunisiert und die Glykosylierung des Proteins ist stets eine unbekannte Variabel bei der Vakzinierung mit ganzen Hefen.

Um diesen Effekt zu umgehen, könnte die N-Glykosylierung in *K. lactis* reduziert werden, indem ein *knock out* der Gene *OCH1* und *MNN1* durchgeführt wird. Die beiden Gene kodieren für Mannosyltransferasen. Nach deren Disruption in *K. lactis* konnte die Modifikation vom Glykoprotein HSA/GM-CSF (*human serum albumin and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) von Man_{>30}GlcNAc₂ auf Man₉₋₁₁GlcNAc₂ herabgesetzt werden [179];[180];[181]. Generell scheint eine Reduktion der Mannose-reichen Glykosylierung in Hefe von Vorteil zu sein, wie ein Vergleich des Vakzinierungserfolgs mit Influenza-Neuraminidase aus *P. pastoris* (Man₈₋₁₄GlcNAc₂) und *S. cerevisiae* (Man_{>50}GlcNAc₂) zeigte [182]. Eine weitere Möglichkeit wäre, HA durch Entfernung des Signalpeptids intrazellulär zu lokalisieren, wodurch eine Glykosylierung des Proteins unterbunden wird. Jedoch könnte dies, wie in *E. coli* und Insektenzellen, zu unlöslichen Aggregaten führen [183];[184]. Um die Assemblierung zu löslichen Trimeren zu unterstützen, würde sich die Fusion einer GCN4-Trimerisierungssequenz (Isoleucin-Zipper) an die HA₁-Domäne anbieten. Diese Methode war bereits in Insektenzellen und Tabakpflanzen für HA erfolgreich [161],[185]. Inwiefern die Glykosylierung für den Immunisierungserfolg essentiell ist, wird kontrovers diskutiert [186]. Jedoch waren Vakzinierungsstudien mit gereinigten und zurückgefalteten HA aus *E. coli* ebenfalls erfolgreich, obwohl das Protein nicht modifiziert war [183].

Aufgrund dessen, dass HA im Gegensatz zu VP2 ein Glykoprotein ist, liegt es in *K. lactis* Membran-gebunden vor, wohingegen VP2_{T25} cytoplasmatisch lokalisiert ist. Der Unterschied der subzellulären Lokalisierung könnte ein weiterer Grund dafür sein, dass die Immunisierung mit VP2_{T25}-Hefen erfolgreich war und mit PR8-HA-Hefen fehlgeschlagen ist. Dass die intrazelluläre Lokalisierung des Antigens eine Rolle spielen kann, wurde mit Hefezellen bereits in einem Ovalbumin-spezifischen CD8 T-Lymphozyten Assay beobachtet. Dafür wurden verschiedene Ovalbumin-Varianten cytosolisch und Zellwand-gebunden in *S. cerevisiae* und *P. pastoris* exprimiert. Die Hefen wurden von Makrophagen phagozytiert und aktivierten CD8 T-Zellen über MHC-Klasse I, die schließlich Interferon γ sekretierten. Dabei wurde die höchste Interferon γ -Antwort für *S. cerevisiae* mit cytoplasmatischem Protein beobachtet. Bei *P. pastoris* wurde mit Zellwand-gebundenen Protein mehr Interferon γ induziert. Jedoch war bei diesen Hefen weniger Protein auf der Oberfläche als im Plasma vorhanden, wodurch unterschiedliche Ovalbuminmengen eingesetzt wurden, die die Ergebnisse erklären könnten [187]. Dass verkapseltes IBDV-VP2 für Immunisierungen besser geeignet ist, wurde mit rekombinanten Hühnerpocken- (*fowlpox*-)Viren beobachtet, die das Protein zum einen durch die Fusion eines HA-Membranankers auf der Oberfläche gebunden hatten oder im Inneren des Virions trugen. Die Antikörperantwort war nach der Vakzinierung mit Membran-gebundenen VP2 deutlich niedriger als mit rekombinanten Viren, die VP2 im Virion lokalisiert hatten [188]. Bei Vakzinierungsversuchen von

Hühnern mit *P. pastoris*, die Influenza-HA Zellwand-gebundenen hatten, konnten nach oraler Applikation zwar Virus-neutralisierende Antikörper detektiert werden, jedoch lag die Neutralisation nur knapp über der Kontrollgruppe und konnte mittels Hämagglutinations-Inhibitionsassay nicht beobachtet werden [189]. Vor allem für die orale Verabreichung ist eine intrazelluläre Lokalisierung des Antigens von Vorteil, da die rekombinanten Proteine weitestgehend vor dem sauren pH des Magens und den Proteasen des Gastrointestinaltrakts geschützt sein sollten. Dies spielt besonders für die Induktion von Virus-neutralisierenden Antikörpern gegen konformationsabhängige Epitope eine Rolle, die sowohl für VP2 als auch HA beschrieben sind.

Neben der Charakterisierung der rekombinanten Virusproteine war eine Abschätzung der Proteinausbeute von Interesse. Die Proteinausbeute von VP2_{T25} und PR8-HA konnte mit Western Blots jedoch nur grob abgeschätzt werden. Über vergleichende Coomassie-gefärbte SDS-PAGE und Western Blot Analysen wurden für den Stamm VAK890 (VP2_{T25};GAL4) ca. 0,7 fg und den Stamm VAK952 (PR8-HA) ca. 3,8 fg rekombinantes Protein pro Hefezelle ermittelt.

Die Methode ist für eine genaue Quantifizierung generell eher ungeeignet, da sich Coomassie an basische Aminosäuren anlagert und somit von der Aminosäuresequenz des Proteins abhängig ist. Eine weitere Fehlerquelle dieser Methode ist, dass die Standardfraktionen noch Fremdprotein enthielten und eine Hintergrundfärbung durch weitere Proteine nicht ausgeschlossen werden konnte. Außerdem wurde bei VP2_{T25} nur das Signal bei ca. 40 kDa (Monomer) kalkuliert, wodurch die potentiellen VP2_{T25}-Oligomere, die im SDS-Gel oberhalb von 80 kDa detektiert wurden, nicht berücksichtigt wurden. Somit diente die Methode lediglich einer sehr groben Abschätzung der Proteinmenge in der Zelle.

Aus den kalkulierten Proteinmengen pro Hefezelle ergaben sich für den Fermentationsprozess, bei dem eine OD₆₀₀ von 23 erreicht wurde, 0,55 mg VP2_{T25} pro Liter. Für den Stamm VAK952 (PR8-HA) gab es keine Fermentationsdaten, weshalb die Proteinausbeute (mg PR8-HA/l Kultur) nicht genau bestimmt werden konnte. Jedoch sollte sie aufgrund der fünffach höheren Proteinmenge/Zelle noch höher liegen. In der Literatur sind für *K. lactis* zum Teil deutlich höhere Proteinausbeuten erzielt worden [97]. So wurde für das Humane Serumalbumin in Fermentationsprozessen ca. 3 g/l [99];[101], für α -Galaktosidase (*Cyamopsis tetragonoloba*) 250 mg/l [190] oder für humanes Lysozyme 100 mg/l [191] erreicht. Jedoch wurden diese hohen Ausbeuten stets mit Proteinen erzielt, die nicht intrazellulär angereichert sondern ins Medium sekretiert wurden. Über eine intrazelluläre Expression von rekombinanten Proteinen in *K. lactis* gibt es bisher keine Daten.

Für den wirtschaftlichen Erfolg eines *K. lactis*-Vakzin sind neben der effizienten Immunisierung und der geringen Produktionskosten die Praktikabilität entscheidend. So sollte der Impfstoff sicher, lange haltbar und ohne Kühlung transportierbar sein. Diese Eigenschaften können durch eine Inaktivierung

der Hefen erzielt werden. Um eine geeignete Inaktivierungsmethode zu etablieren, wurden im Vorfeld verschiedene Möglichkeiten getestet. Da die Hefe sowohl oral als auch subkutan appliziert werden sollten, kamen aggressive Chemikalien wie β -Propiolacton nicht in Frage. Das beste Inaktivierungsergebnis, bei der auf 10^{10} Zellen eine (VAK367) bzw. keine lebende Hefezelle (VAK890 (VP2_{T2S};GAL4)) kam, wurde mittels Gefriertrocknung und anschließender Hitzebehandlung für zwei Stunden bei 90 °C erreicht. Die meisten Hefen (99,9 %) wurden bereits durch die Lyophilisierung abgetötet. Vermutlich führten die rasche Abkühlung beim vorherigen Einfrieren (-20 °C) zur Bildung von intrazellulären Eiskristallen sowie ein hoher osmotischer Druck durch den Wasserentzug zur Zerstörung der Membransysteme [192]. Jedoch sollte neben der effizienten Inaktivierung die Konformation des rekombinanten Proteins möglichst erhalten bleiben. Wie die Versuche zeigten, überstand VP2_{T2S} die Inaktivierung mit vorheriger Gefriertrocknung ohne große Verluste (vgl. 3.1.3.4). Eine Degradation der Proteine wurde nicht beobachtet. Jedoch war hierfür eine vorherige Trocknung essentiell. Ohne Lyophilisierung führte bereits eine Inkubation für fünf Minuten bei 80 °C im Wasserbad dazu, dass nur noch sehr wenig lösliches Protein im Zellextrakt nachgewiesen werden konnte, da es vermutlich denaturiert war (Daten nicht gezeigt).

Die so produzierten Hefen erfüllen damit einige wichtige Kriterien eines praktikablen Impfstoffes. Zum einen verursachen sie geringe Lager- und Transportkosten und sie sind unabhängig von Kühlsystemen. Zum anderen sind sie aufgrund der Inaktivierung sicher, da sie sich nicht mehr vermehren können. Weiterhin kann so mit einer definierten Antigenmenge immunisiert werden, denn die Proteinmenge wird weder durch fortlaufende Proteinsynthese noch durch Zellteilung erhöht. Ein weiterer Vorteil von hitze-behandelten Hefen könnte eine erhöhte Immunogenität sein. So wurde für *C. albicans* und *S. cerevisiae* durch eine Hitze-Inaktivierung für 20 min bei 90 °C mehr β -Glykan auf der Zellwandoberfläche beobachtet, was eine verstärkte Phagozytose durch Makrophagen zur Folge hatte [193];[194].

4.3. Vakzinierung

Hefe wird seit vielen Jahren als Futterzusatzstoff in der Nutztierhaltung eingesetzt. Es dient als natürlicher Eiweißlieferant und enthält außerdem viele wichtige Vitamine, Mineralien und Aminosäuren. Neben der Verwendung als Nährstoffquelle wurde in den letzten Jahren verstärkt an der Entwicklung von Hefe-Impfstoffen geforscht. Dabei wurde beobachtet, dass nach der Injektion ganzer Zellen, diese von Dendritischen Zellen phagozytiert wurden und die Antigene sowohl auf MHC-Klasse I als auch II präsentiert wurden (Kreuzpräsentation) [113]. Somit war es möglich sowohl eine CD4- als auch eine CD8-Zellantwort zu induzieren, weshalb Hefezellen auch ein adjuvierender Effekt attestiert wurde. Verantwortlich dafür sind Zellwandkomponenten wie β -1,3 und β -1,6-verknüpfte Glykane, die durch Dectin-1-Rezeptoren von Dendritischen Zellen, Makrophagen und

Neutrophilen Granulozyten gebunden werden und die Phagozytose induzieren. Dectin 1-Rezeptoren aktivieren zusammen mit Toll-ähnlichen Rezeptoren die Zytokinausschüttung von IL-1 β ; IL-2, IL-10, IL-12 und TNF- α und induzieren die Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffspezies. Außerdem werden die Zellwandbestandteile Mannose und N-Acetylglukosamine durch Mannose-Rezeptoren (CD206) von Makrophagen und Dendrischen Zellen gebunden. Dies führt zur Induktion des NF- κ B Signalweges und der Zytokinproduktion von IL-1 β und TNF. Eine weitere Rezeptorgruppe, die für die mikrobielle Abwehr wichtig ist, sind die Toll-ähnlichen Rezeptoren. Diese erkennen Phospholipomannan, O-verknüpfte Mannane und Zymosan und haben die Ausschüttung von IL-8, TNF, TGF β , IL-10 und IFN γ zur Folge. Neben diesen gibt es noch weitere Rezeptoren, wie Galectin 3- und Chitinrezeptoren, die die Immunantwort gegen Hefen initiieren [195].

Der Hefezellwandaufbau wird jedoch durch die Kultivierungsbedingungen sehr stark beeinflusst. Gut untersucht ist der Einfluss auf die Zellwandzusammensetzung durch die Wachstumsparameter Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck, Kohlenstoffquelle sowie das Medium für *S. cerevisiae* [196]. Dabei schwankten die Werte für Trockenmasse und Verteilung der Polysaccharide um bis zu 50 %. Einige Studien lassen vermuten, dass der *K. lactis*-Zellwandaufbau ebenfalls von den Kultivierungsbedingungen sehr stark abhängig ist. So führte die Anzucht auf 3 % Ethanol zu einer fast doppelt so dicken Zellwand als auf Glukose. Auch die Verteilung der Glykoproteine in der Zellwand wurden durch die unterschiedlichen Kohlenstoffquellen beeinflusst [197]. Die Kultivierungsbedingungen waren in dieser Arbeit nicht konstant. Die Hefen wurden für die Immunisierung in unterschiedlichen Fermenter mit verschiedenen Fütterungsprofilen angezogen und für den subkutanen Vakzinierungsversuch mit VP_{T25}-Hefen sogar in Schüttelkolben. Insbesondere bei diesem Versuch waren die Bedingungen sehr unterschiedlich, da die Zellen zum Teil auf Glukosehaltigem Minimalmedium bzw. auf Laktosehaltigem Vollmedium kultiviert wurden (vgl. 3.1.4.2). Dies könnte zu sehr deutlichen Unterschieden des Zellwandaufbaus geführt haben, die die Aufnahme der Hefen durch Immunzellen beeinflusst haben könnte. Des Weiteren könnte dies erklären, warum einige Vakzinierungsstudien erfolgreich waren und andere nicht. Für zukünftige Arbeiten wäre es deshalb zwingend notwendig, die optimalen Kultivierungsbedingungen zu definieren.

Die Aufnahme der Zellen durch das Immunsystem ist nach der oralen Applikation weitaus komplexer als nach subkutaner. Subkutan verabreichte Hefen werden von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) direkt phagozytiert und die Antigene werden über MHC-Klasse I und II präsentiert. Bei der oralen Vakzinierung spielen die Peyer-Plaques eine zentrale Rolle. Grundsätzlich sind diese Peyer-Plaques von Vögeln denen von Säugetieren ähnlich und auch die Antigenaufnahme erfolgt durch M-Zellen [198]. Jedoch scheint ihnen keine so große Bedeutung zu zukommen, wie zunächst angenommen wurde. Im menschlichen Intestinum finden sich nur ca. 20-30 und Hühner haben nach 16 Wochen

höchstens fünf, die sich anschließend sogar auf ein einzelnes Plaque im Übergangsbereich vom Dünndarm zum Dickdarm reduzieren [199]. Das könnte wiederum beim Impfzeitpunkt eine Rolle spielen. Weitere Möglichkeiten zur Antigenaufnahme und Induktion des Immunsystems stellen Enterozyten und Dendritische Zellen dar. Enterozyten sind die häufigsten Zellen des Darmepithels und wie Dendritische Zellen können sie nach Pathogenaufnahme als APZ fungieren. Die Anzahl Dendritischer Zellen, die zwischen den Enterozyten im Darmepithel lokalisiert sind und direkten Kontakt mit Antigenen haben, ist nur gering [74].

Insbesondere für die orale Vakzinierung wurde die Verträglichkeit der *K. lactis*-Hefen in Vorversuchen getestet, wobei keine Auffälligkeiten in der Gewichtszunahme oder im Verhalten der Tiere zu beobachten waren. Anschließend wurde der Hefeanteil im Futter der Tiere jedoch auf 5 % begrenzt. Obwohl die applizierte Hefe- und Antigenmenge bei oraler Vakzinierung 15.000 bis 18.000fach höher war, wiesen deutlich weniger Tiere Virus-neutralisierende Antikörper auf und waren protektiv geschützt. Nach subkutaner Injektion der Hefen zeigten 100 % der Mäuse eine Immunantwort und 80 % der Hühner einen vollständigen Schutz vor einer IBDV-Infektion. Nach oraler Verabreichung waren es lediglich 10 % (vgl. 3.1.4.3). Dass eine orale Vakzinierung gegen IBDV mit *subunit* Impfstoffen möglich ist, konnte mit transgenen Reispflanzen gezeigt werden. Dabei wurde das VP2-Gen in diesen exprimiert und die Reiskörner an Hühner verfüttert. Dies entsprach pro Applikation einer VP2-Menge von ca. 2,25 mg, 4,5 mg oder 11,25 mg (je nach Gruppe), die viermal im Abstand von sieben Tagen erfolgte. Beim Challenge-Versuch zeigte sich, dass fünf von sechs Hühnern vollständig geschützt waren, wenn sie mit 11,25 mg VP2 vakziniert wurden. Nach der Fütterung von 2,25 mg (entspricht bei vier Applikationen insgesamt 9 mg) war lediglich eins von sechs Hühnern vollständig geschützt [85]. Da die Hühner in dieser Arbeit mit insgesamt nur ca. 2,7 mg VP2-Protein immunisiert wurden, war die Menge möglicherweise nicht ausreichend. Ebenfalls denkbar ist, dass das verwendete Immunisierungsschema (zwei 14tägige Fütterungsperioden) nicht so gut geeignet ist und es besser wäre die Antigenmenge zu erhöhen, jedoch die Fütterungsperiode zu verkürzen. Die lange Immunisierungsperiode könnte die Ausbildung einer oralen Toleranz fördern, die vor allem dann beobachtet wird, wenn der Körper zu oft mit einer geringen Antigenmenge in Kontakt kommt [76]. Dass die orale Vakzinierung auch mit Hefen erfolgreich sein könnte, zeigte eine Studie von Allnutt *et al.*, die sehr ähnlich zu dieser Arbeit ist [93]. Das Ziel war die Entwicklung eines Hefeimpfstoffes gegen das IBDV-verwandte Virus IPNV, welches vor allem Forelle und Lachse infiziert. Dabei wurde das VP2-Protein des Virus in *S. cerevisiae* exprimiert, was zur Bildung von SVP führte. Für die orale Immunisierung der Fische wurden ebenfalls ganze Hefezellen unter das Futter gemischt und diese zweimal für sieben Tage mit einer 24tägigen Pause appliziert. Anschließend konnten anti-VP2-Antikörper in allen Fischen nachgewiesen werden, die einen partiellen Schutz beim Challenge-Versuch vermitteln.

Die Infektion von Hühnern mit IBD-Viren ist vor allem zwischen der dritten und sechsten Lebenswoche bedrohlich für die Tiere, da in dieser Zeit die *Bursa fabricii* das Hauptimmunorgan ist und dieses aufgrund der schnellen Proliferation sehr empfindlich ist. Die orale Immunisierung war mit dem hier verwendeten Immunisierungsschema erst nach der achten Lebenswoche abgeschlossen, was für die Impfung von Nutztieren zu spät wäre. Auch aus diesem Grund müssten kürzere Fütterungsperioden verwendet werden. Dahingegen erfolgte die letzte subkutane Applikation nach der sechsten Lebenswoche, wobei Untersuchungen der Seren im Virusneutralisationstest zeigten, dass bereits nach der zweiten Applikation ähnliche Werte erreicht werden. Die zweite Boost-Injektion führte zu keiner weiteren Steigerung der Neutralisation und ist somit wahrscheinlich nicht notwendig (vgl. 3.1.4.3). Damit wäre die Immunisierung nach der vierten Lebenswoche abgeschlossen. Um den Impfschutz noch früher zu erzielen, könnte geprüft werden, ob mit der Vakzinierung bereits früher begonnen werden könnte. Allerdings muss beim Impfzeitpunkt die Interferenz mit maternalen Antikörpern berücksichtigt werden. Küken sind in der Regel die ersten 2-3 Wochen gegen IBD geschützt, wenn die Hennen zuvor geimpft wurden. Dies erschwert zusätzlich die Bestimmung des geeigneten Impfzeitpunktes, da die Übertragung der maternalen Antikörper auf die Küken nicht konstant ist [200].

Die Immunisierung gegen Inflenzaviren führte, mit Ausnahme der Vorversuche mit H7-HA-Hefen in Mäusen, nicht zu nachweisbaren Virus-neutralisierenden Antikörpern. Allerdings kann mit den durchgeführten Untersuchungen nicht ausgeschlossen werden, dass es zu einer Immunreaktion kam. Beispielsweise könnte die orale Applikation zur Induktion von IgA-Antikörpern in der Mukosa geführt haben. Da der Immunschutz gegen Influenza auf HA-spezifischen Antikörpern im Blutserum und Mukosa beruht, könnten IgA-Antikörper auch protektiv wirken [87]. Da es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war, die gegen aviäre Influenza vakzinierten Hühner im Challenge-Versuch zu testen, konnte diese Möglichkeit nicht geprüft werden. Auch eine mögliche T-Zellantwort wurde nicht untersucht. Diese beiden Faktoren sollten für eine bessere Beurteilung des Impferfolgs in zukünftigen Versuchen berücksichtigt werden.

Um die Immunisierung zu unterstützen werden häufig Adjuvantien zugesetzt. Während dieser Arbeit wurde das Freund's Adjuvans subkutan appliziert und für die orale Vakzinierung Saponin einen Tag vor Beginn der Fütterungsperioden verabreicht. Der Einfluss von Freund's Adjuvans wurde bei der Hefeimpfung nicht näher untersucht. Lediglich bei den PR8-HA-Versuchen mit Mäusen gab es zu diesem Zweck eine Kontrollgruppe ohne Adjuvantien, jedoch konnten in dieser Versuchsreihe generell keine Antikörper gegen HA detektiert werden und somit der adjuvierende Effekt nicht ausgewertet werden (vgl. 3.2.4). Bei der oralen Hefegabe mit Saponin konnte keine Wirksamkeit festgestellt werden. Jedoch wurden nach der oralen Immunisierung nur wenige Seren auf enthaltene

anti-VP2-Antikörper positiv getestet, sodass eine endgültige Beurteilung aufgrund der kleinen Testgruppen nicht möglich war. Dennoch befanden sich in den Gruppen mit Saponingabe nicht mehr positive Seren als in der Kontrollgruppe. Die Wirkweise des Extraktes aus dem Seifenrindenbaum *Quillaja saponaria* liegt in der Permeabilisierung der Darmbarriere. Dabei bindet Saponin an Cholesterin von Zellmembranen, wodurch es zur Bildung von größeren, micellen-ähnlichen Komplexen kommen soll. Das hat zur Folge, dass die intestinale Permeabilität erhöht wird und die Aufnahme von größeren Molekülen aus dem Intestinum erleichtert wird [201]. Diese, von Saponin gebildeten Poren, haben in etwa eine Größe 40-80 Å, wohingegen Hefezellen ca. 5 µm messen [202]. Vermutlich ist der deutliche Größenunterschied eine Ursache für die ausbleibende Wirkung des Adjuvans, da im Gegensatz zu anderen Antigenen, bei denen eine immunstimulierende Wirkung beschrieben ist, *K. lactis*-Zellen die Barriere nicht verstärkt passieren können.

Für die Optimierung der oralen Vakzinierung, wären weitere Studien mit anderen Adjuvantien sinnvoll. Als vielversprechender Kandidat galt die hitze-labile Untereinheit vom *E. coli*-Enterotoxin, die bereits in vielen Studien erfolgreich war [203]. Im Rahmen des Projektes wurde die Untereinheit bereits in rekombinanten *K. lactis*-Hefen exprimiert und zusammen mit VAK890 (VP2_{T2S};GAL4) verfüttert. Jedoch führte dies ebenfalls nicht zu einem Anstieg der Antikörper-positiven Mäuse (Daten nicht gezeigt). Außer Saponin und dem *E. coli*-Enterotoxin gibt es noch eine ganze Bandbreite an postulierten Wirkstoffverstärkern, die über bakterielle (z. B. Cholera-toxin), pflanzliche (z. B. Lektine) und synthetische (z. B. Threonyl-Muramyl-dipeptid), bis hin zu Zytokinen (z. B. IL12), Epitop-Adjuvantien (z. B. B- und T-Zellrezeptoren) und Toll-ähnlichen Rezeptoren-Liganden (z. B. MALP-2) reichen [76].

4.4. Schlussfolgerung und Ausblick

Die Vorteile eines Hefe-basierenden *subunit* Vakzins sind vielseitig. Zum einen ist es kostengünstig, praktikabel und sicher. Zum anderen wird Hefe seit Jahrzehnten als Futterzusatz verwendet und ist deshalb in der Tierhaltung weitestgehend akzeptiert. Auch die einfache genetische Manipulierbarkeit ist ein großer Vorteil beispielsweise gegenüber transgenen Pflanzen. Insbesondere Influenzaviren können immer wieder die Immunabwehr durch veränderte Oberflächenantigene durchbrechen. Dazu kommt, dass die Vielzahl der Virusstämme bis heute die Entwicklung eines Breitband-Impfstoffes verhindert hat. Ein Vorteil der Hefevakzine ist, dass verschiedene Antigen-exprimierende Stämme schnell erzeugt und gemischt werden könnten. Somit könnte ein Impfstoff gegen mehrere Stämme bzw. auch ein Kombinationsimpfstoff gegen mehrere Krankheiten einfach hergestellt werden. Das Anwendungsgebiet ist sehr breit und könnte neben Impfstoffen gegen verschiedenste Geflügelkrankheiten auch für Fische, Kaninchen und Haustiere erfolgreich sein.

In dieser Arbeit konnten wichtige Grundsteine zur Entwicklung von *K. lactis*-basierten Impfstoffen gelegt werden. Insbesondere die Ergebnisse mit VP2-exprimierenden Hefen sind sehr vielversprechend. Dahingegen sind die Ergebnisse mit Influenza-HA noch widersprüchlich und erfordern eine systematische Evaluation. Dabei könnte die lösliche Expression des Antigens sehr hilfreich sein. Damit die Hefeimpfstoffe optimal massenanwendbar sind, wäre die Etablierung einer oralen Vakzinierung ein erheblicher Vorteil.

5. Zusammenfassung

Vor über 50 Jahren wurde die Impfstoffproduktion gegen diverse Viruserkrankungen mit Hühnereiern entwickelt und ist bis heute die meistgenutzte Methode, obwohl sie zahlreiche Nachteile besitzt. Beispielsweise beträgt die Produktionszeit für ein humanes Influenza-Vakzin von der Virusidentifizierung bis zur Auslieferung ca. sechs Monate, was vor allem für unerwartet auftretende, pandemische Virusstämme ein großes Problem darstellt. Eine weitere Gefahr besteht in der Neurekombination zwischen Feld- und Vakzinviren. Diese Probleme könnten mit einem Hefe-basierten *subunit* Impfstoff umgangen werden, der zudem noch deutlich kostengünstiger wäre.

Diese Arbeit zeigt, dass mit einem *Kluyveromyces lactis*-basierten Vakzin gegen die Geflügelkrankheit Infektiöse Bursitis protektiv vakziniert werden kann. Das VP2-Protein war intrazellulär lokalisiert und hielt einer Hitzebehandlung zur Inaktivierung der Hefen stand. Die Applikation des Antigens erfolgte mit ganzen Hefezellen, ohne dass eine vorherige Proteinreinigung notwendig war. Mäuse und Hühner wurden durch subkutane Injektion oder oral als Futterzusatz vakziniert. Nach oraler Immunisierung konnte eine schwache Antikörperantwort beobachtet werden. Dahingegen induzierte die subkutane Injektion bei 100 % der Tiere Virus-neutralisierende Antikörper. Ein Challenge-Versuch mit IBDV zeigte, dass vier von fünf Hühnern nach der Vakzinierung vollständig immun waren und ein Huhn partiell geschützt war.

Die positiven Ergebnisse mit IBDV-VP2 veranlassten die Entwicklung eines *K. lactis* Vakzins gegen Influenza. Da jedoch orale und subkutane Immunisierungsversuche von Hühnern mit Hefen, die Hämagglutinin (HA) vom aviären Influenza-Subtyp H7N3 rekombinant exprimierten, zu keinen nachweislichen Antikörpern führten, wurden zwei HA-Varianten vom H1N1 Subtyp exprimiert und charakterisiert. HA lag in *K. lactis* glykosyliert, Membran-assoziiert und vermutlich trimerisiert vor. Nach oraler und subkutaner Vakzinierung von Mäusen mit HA vom Influenzastamm A/Puerto Rico/8/34 konnten jedoch keine Virus-neutralisierenden Antikörper detektiert werden. Als mögliche Ursache für die ausbleibende Antikörperinduktion wurde die Mannose-reiche Glykosylierung von *K. lactis* diskutiert, die stark von den Kultivierungsbedingungen abhängig ist.

Rekombinante *K. lactis*-Hefen stellen einen sicheren Vektorimpfstoff dar, der als *subunit* Vakzin eine Unterscheidung zwischen geimpften und infizierten Tieren ermöglicht. Das entwickelte *K. lactis*-System eignet sich aufgrund eines kurzen Entwicklungsprozesses sowie unkomplizierter und kostengünstiger Kultivierungsbedingungen optimal für die Geflügelindustrie und bietet das Potential für die Vakzinierung gegen diverse Erkrankungen.

Summary

More than 50 years ago, the production of vaccines against various viral diseases has been developed in chicken eggs. This is still the most widely used method today, but it has a lot of disadvantages. The production time for a human influenza vaccine takes about six months from identification of the virus to delivery. This is a serious problem especially for unexpected, pandemic virus strains. Additionally there is the risk of reassortment between field and vaccine viruses. These problems could be overcome with a cost-effective yeast-based subunit vaccine.

This thesis shows the proof of principle, that a *Kluyveromyces lactis*-based subunit vaccine is able to induce a protective immune response of poultry against IBD (infectious bursal disease). For this purpose the VP2 gene of the capsid forming protein of IBD-Virus (IBDV) was inserted into the genomic *LAC4* locus of *K. lactis* and the expression was increased by *GAL4* overexpression and sequence optimization. The VP2 protein was localized intracellularly and was stable after heat treatment for inactivation of yeast cells. The antigen application was carried out with whole yeast cells, with no need of prior protein purification. Mice and chickens were vaccinated by subcutaneous injection or oral ingestion as feed additive. After oral immunization a weak antibody response was observed. In contrast, the subcutaneous injection induced virus neutralizing antibodies in 100 % of animals. A challenge test with IBDV showed that four out of five chickens were fully immune after vaccination and one chicken was partially protected.

The positive results with IBDV VP2 prompted the development of a *K. lactis* vaccine against influenza. However, oral and subcutaneous immunization studies of chickens with recombinant yeasts, that expressed HA (hemagglutinin) from avian influenza subtype H7N3, resulted in no detectable antibodies. Two HA variants of the H1N1 subtype were expressed and characterized. HA was glycosylated in *K. lactis*, membrane associated and probably trimerized. After oral and subcutaneous vaccination of mice with HA from influenza strain A/Puerto Rico/8/34 no virus-neutralizing antibodies could be detected. The high-mannose glycosylation of *K. lactis*, which is highly dependent on cultivation conditions, was discussed as a possible reason for the lack of antibody induction.

Recombinant *K. lactis* yeasts are a safe subunit vector vaccine, which allow to discriminate between vaccinated and infected animals (marker vaccine). Because of a short generation time of yeast strains and cost-effective cultivation conditions, the developed *K. lactis* expression system is optimal for the poultry industry and offers the potential for vaccination against various diseases.

6. Referenzen

- [1] W. J. Benton, M. S. Cover, J. K. Rosenberger, and R. S. Lake, "Physicochemical properties of the infectious bursal agent (IBA).," *Avian diseases*, vol. 11, no. 3, pp. 438–45, Aug. 1967.
- [2] M. Rolle and A. Mayr, *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, 8th ed. MVS Medizinverlage Stuttgart, 2006.
- [3] A. S. Cosgrove, "An apparently new disease of chickens - avian nephrosis," *Avian diseases*, vol. 6, no. 3, pp. 385–389, 1962.
- [4] J. K. Rosenberger and J. Gelb, "Response to several avian respiratory viruses as affected by infectious bursal disease virus.," *Avian diseases*, vol. 22, no. 1, pp. 95–105, 1978.
- [5] S. B. Hitchner, "Persistence of parental infectious bursal disease antibody and its effect on susceptibility of young chickens.," *Avian diseases*, vol. 15, no. 4, pp. 894–900, 1971.
- [6] J. T. Faragher, W. H. Allan, and P. J. Wyeth, "Immunosuppressive effect of infectious bursal agent on vaccination against Newcastle disease.," *The Veterinary record*, vol. 95, no. 17, pp. 385–8, Oct. 1974.
- [7] R. Müller, I. Käufer, M. Reinacher, and E. Weiss, "Immunofluorescent studies of early virus propagation after oral infection with infectious bursal disease virus (IBDV).," *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B*, vol. 26, no. 5, pp. 345–52, Jul. 1979.
- [8] M. J. Ratcliffe, O. Lassila, J. R. Pink, and O. Vainio, "Avian B cell precursors: surface immunoglobulin expression is an early, possibly bursa-independent event.," *European journal of immunology*, vol. 16, no. 2, pp. 129–33, Feb. 1986.
- [9] B. Lucio and S. B. Hitchner, "Response of susceptible versus immune chicks to killed, live-modified, and wild infectious bursal disease virus vaccines.," *Avian diseases*, vol. 23, no. 4, pp. 1037–50, 1979.
- [10] H. Becht, H. Müller, and H. K. Müller, "Comparative studies on structural and antigenic properties of two serotypes of infectious bursal disease virus.," *The Journal of general virology*, vol. 69 (Pt 3), pp. 631–40, Mar. 1988.
- [11] S. B. Hitchner, "Immunization of adult hens against infectious bursal disease virus.," *Avian diseases*, vol. 20, no. 3, pp. 611–3, 1976.
- [12] P. Dobos, B. J. Hill, R. Hallett, D. T. Kells, H. Becht, and D. Teninges, "Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes.," *Journal of virology*, vol. 32, no. 2, pp. 593–605, Nov. 1979.
- [13] J. B. McFerran, M. S. McNulty, E. R. McKillop, T. J. Connor, R. M. McCracken, D. S. Collins, and G. M. Allan, "Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys and ducks: demonstration of a second serotype.," *Avian pathology : journal of the W.V.P.A*, vol. 9, no. 3, pp. 395–404, Jul. 1980.

- [14] D. J. Jackwood, Y. M. Saif, and P. D. Moorhead, "Immunogenicity and antigenicity of infectious bursal disease virus serotypes I and II in chickens.," *Avian diseases*, vol. 29, no. 4, pp. 1184–94, 1985.
- [15] N. M. Ismail, Y. M. Saif, and P. D. Moorhead, "Lack of pathogenicity of five serotype 2 infectious bursal disease viruses in chickens.," *Avian diseases*, vol. 32, no. 4, pp. 757–9, 1988.
- [16] Y. Wei, J. Li, J. Zheng, H. Xu, L. Li, and L. Yu, "Genetic reassortment of infectious bursal disease virus in nature.," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 350, no. 2, pp. 277–87, Nov. 2006.
- [17] J. A. van den Berg, K. J. van der Laken, A. J. van Ooyen, T. C. Renniers, K. Rietveld, A. Schaap, A. J. Brake, R. J. Bishop, K. Schultz, and D. Moyer, "Kluyveromyces as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin.," *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, vol. 8, no. 2, pp. 135–9, Feb. 1990.
- [18] M. F. Rudd, H. G. Heine, S. I. Sapats, L. Parede, and J. Ignjatovic, "Characterisation of an Indonesian very virulent strain of infectious bursal disease virus.," *Archives of virology*, vol. 147, no. 7, pp. 1303–22, Jul. 2002.
- [19] A. Banda and P. Villegas, "Genetic characterization of very virulent infectious bursal disease viruses from Latin America.," *Avian diseases*, vol. 48, no. 3, pp. 540–9, Sep. 2004.
- [20] M. Ozel and H. Gelderblom, "Capsid symmetry of viruses of the proposed Birnavirus group.," *Archives of virology*, vol. 84, no. 3–4, pp. 149–61, Jan. 1985.
- [21] B. Böttcher, N. A. Kiselev, V. Y. Stel'Mashchuk, N. A. Perevozchikova, A. V. Borisov, and R. A. Crowther, "Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy.," *Journal of virology*, vol. 71, no. 1, pp. 325–30, Jan. 1997.
- [22] U. I. von Einem, A. E. Gorbalenya, H. Schirrmeyer, S.-E. Behrens, T. Letzel, and E. Mundt, "VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase.," *The Journal of general virology*, vol. 85, no. Pt 8, pp. 2221–9, Aug. 2004.
- [23] E. Mundt, J. Beyer, and H. Müller, "Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells.," *The Journal of general virology*, vol. 76 (Pt 2), pp. 437–43, Feb. 1995.
- [24] Z. Li, Y. Wang, Y. Xue, X. Li, H. Cao, and S. J. Zheng, "Critical role for voltage-dependent anion channel 2 in infectious bursal disease virus-induced apoptosis in host cells via interaction with VP5.," *Journal of virology*, vol. 86, no. 3, pp. 1328–38, Feb. 2012.
- [25] A. A. Azad, S. A. Barrett, and K. J. Fahey, "The characterization and molecular cloning of the double-stranded RNA genome of an Australian strain of infectious bursal disease virus.," *Virology*, vol. 143, no. 1, pp. 35–44, May 1985.
- [26] M. N. Jagadish, V. J. Staton, P. J. Hudson, and A. A. Azad, "Birnavirus precursor polyprotein is processed in Escherichia coli by its own virus-encoded polypeptide.," *Journal of virology*, vol. 62, no. 3, pp. 1084–7, Mar. 1988.

- [27] C. Birghan, E. Mundt, and A. E. Gorbalenya, "A non-canonical lon proteinase lacking the ATPase domain employs the ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus.," *The EMBO journal*, vol. 19, no. 1, pp. 114–23, Jan. 2000.
- [28] D. Luque, I. Saugar, M. T. Rejas, J. L. Carrascosa, J. F. Rodríguez, and J. R. Castón, "Infectious Bursal disease virus: ribonucleoprotein complexes of a double-stranded RNA virus.," *Journal of molecular biology*, vol. 386, no. 3, pp. 891–901, Feb. 2009.
- [29] A. Valli, I. Busnadiego, V. Maliogka, D. Ferrero, J. R. Castón, J. F. Rodríguez, and J. A. García, "The VP3 factor from viruses of Birnaviridae family suppresses RNA silencing by binding both long and small RNA duplexes.," *PloS one*, vol. 7, no. 9, p. e45957, Jan. 2012.
- [30] M. G. Tacken, P. J. Rottier, A. L. Gielkens, and B. P. Peeters, "Interactions in vivo between the proteins of infectious bursal disease virus: capsid protein VP3 interacts with the RNA-dependent RNA polymerase, VP1.," *The Journal of general virology*, vol. 81, no. Pt 1, pp. 209–18, Jan. 2000.
- [31] A. Oña, D. Luque, F. Abaitua, A. Maraver, J. R. Castón, and J. F. Rodríguez, "The C-terminal domain of the pVP2 precursor is essential for the interaction between VP2 and VP3, the capsid polypeptides of infectious bursal disease virus.," *Virology*, vol. 322, no. 1, pp. 135–42, Apr. 2004.
- [32] A. B. Sánchez and J. F. Rodríguez, "Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis.," *Virology*, vol. 262, no. 1, pp. 190–9, Sep. 1999.
- [33] N. Irigoyen, D. Garriga, A. Navarro, N. Verdaguer, J. F. Rodríguez, and J. R. Castón, "Autoproteolytic activity derived from the infectious bursal disease virus capsid protein.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 284, no. 12, pp. 8064–72, Mar. 2009.
- [34] B. Da Costa, C. Chevalier, C. Henry, J.-C. Huet, S. Petit, J. Lepault, H. Boot, and B. Delmas, "The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2.," *Journal of virology*, vol. 76, no. 5, pp. 2393–402, Mar. 2002.
- [35] C. Chevalier, M. Galloux, J. Pous, C. Henry, J. Denis, B. Da Costa, J. Navaza, J. Lepault, and B. Delmas, "Structural peptides of a nonenveloped virus are involved in assembly and membrane translocation.," *Journal of virology*, vol. 79, no. 19, pp. 12253–63, Oct. 2005.
- [36] M. Galloux, S. Libersou, N. Morellet, S. Bouaziz, B. Da Costa, M. Ouldali, J. Lepault, and B. Delmas, "Infectious bursal disease virus, a non-enveloped virus, possesses a capsid-associated peptide that deforms and perforates biological membranes.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 282, no. 28, pp. 20774–84, Jul. 2007.
- [37] T.-W. Lin, C.-W. Lo, S.-Y. Lai, R.-J. Fan, C.-J. Lo, Y.-M. Chou, R. Thiruvengadam, A. H.-J. Wang, and M.-Y. Wang, "Chicken heat shock protein 90 is a component of the putative cellular receptor complex of infectious bursal disease virus.," *Journal of virology*, vol. 81, no. 16, pp. 8730–41, Aug. 2007.
- [38] A. A. Azad, M. N. Jagadish, M. A. Brown, and P. J. Hudson, "Deletion mapping and expression in Escherichia coli of the large genomic segment of a birnavirus.," *Virology*, vol. 161, no. 1, pp. 145–52, Nov. 1987.

- [39] J. L. Martinez-Torrecuadrada, N. Saubi, A. Pagès-Manté, J. R. Castón, E. Espuña, and J. I. Casal, "Structure-dependent efficacy of infectious bursal disease virus (IBDV) recombinant vaccines.," *Vaccine*, vol. 21, no. 23, pp. 3342–50, Jul. 2003.
- [40] C. D. Bayliss, U. Spies, K. Shaw, R. W. Peters, A. Papageorgiou, H. Müller, and M. E. Boursnell, "A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2.," *The Journal of general virology*, vol. 71 (Pt 6), pp. 1303–12, Jun. 1990.
- [41] T. Ito, Y. Suzuki, A. Takada, A. Kawamoto, K. Otsuki, H. Masuda, M. Yamada, T. Suzuki, H. Kida, and Y. Kawaoka, "Differences in sialic acid-galactose linkages in the chicken egg amnion and allantois influence human influenza virus receptor specificity and variant selection.," *Journal of virology*, vol. 71, no. 4, pp. 3357–62, Apr. 1997.
- [42] E. F. Kaleta, G. Hergarten, and A. Yilmaz, "Avian influenza A viruses in birds --an ecological, ornithological and virological view.," *DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, vol. 112, no. 12, pp. 448–56, Dec. 2005.
- [43] Wright P. F. and Webster R. G., "Orthomyxoviruses," in in *Fields Virology* , 4th ed., Knipe David M., Howley Peter M., Griffin Diane E., Lamb Robert A., Martin Malcolm A., Roizman Bernard, and Straus Stephen E., Eds. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, pp. 1533–1579.
- [44] S. Tong, Y. Li, P. Rivaller, C. Conrardy, D. A. A. Castillo, L.-M. Chen, S. Recuenco, J. A. Ellison, C. T. Davis, I. A. York, A. S. Turmelle, D. Moran, S. Rogers, M. Shi, Y. Tao, M. R. Weil, K. Tang, L. A. Rowe, S. Sammons, X. Xu, M. Frace, K. A. Lindblade, N. J. Cox, L. J. Anderson, C. E. Rupprecht, and R. O. Donis, "A distinct lineage of influenza A virus from bats.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, no. 11, pp. 4269–74, Mar. 2012.
- [45] "A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum.," *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 58, no. 4, pp. 585–91, Jan. 1980.
- [46] M. C. Zambon, "Epidemiology and pathogenesis of influenza.," *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, vol. 44 Suppl B, pp. 3–9, Nov. 1999.
- [47] P. W. CHOPPIN, J. S. MURPHY, and I. TAMM, "Studies of two kinds of virus particles which comprise influenza A2 virus strains. III. Morphological characteristics: independence to morphological and functional traits.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 112, pp. 945–52, Nov. 1960.
- [48] B. C. Lin and C. J. Lai, "The influenza virus nucleoprotein synthesized from cloned DNA in a simian virus 40 vector is detected in the nucleus.," *Journal of virology*, vol. 45, no. 1, pp. 434–8, Jan. 1983.
- [49] J. Braam, I. Ulmanen, and R. M. Krug, "Molecular model of a eucaryotic transcription complex: functions and movements of influenza P proteins during capped RNA-primed transcription.," *Cell*, vol. 34, no. 2, pp. 609–18, Sep. 1983.
- [50] L. Wakefield and G. G. Brownlee, "RNA-binding properties of influenza A virus matrix protein M1.," *Nucleic acids research*, vol. 17, no. 21, pp. 8569–80, Nov. 1989.

- [51] B. G. Hale, R. E. Randall, J. Ortín, and D. Jackson, "The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses.," *The Journal of general virology*, vol. 89, no. Pt 10, pp. 2359–76, Oct. 2008.
- [52] R. E. O'Neill, J. Talon, and P. Palese, "The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins.," *The EMBO journal*, vol. 17, no. 1, pp. 288–96, Jan. 1998.
- [53] W. Chen, P. A. Calvo, D. Malide, J. Gibbs, U. Schubert, I. Bacik, S. Basta, R. O'Neill, J. Schickli, P. Palese, P. Henklein, J. R. Bennink, and J. W. Yewdell, "A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death.," *Nature medicine*, vol. 7, no. 12, pp. 1306–12, Dec. 2001.
- [54] S. L. Zebedee and R. A. Lamb, "Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions.," *Journal of virology*, vol. 62, no. 8, pp. 2762–72, Aug. 1988.
- [55] L. J. Holsinger and R. A. Lamb, "Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds.," *Virology*, vol. 183, no. 1, pp. 32–43, Jul. 1991.
- [56] J. A. Griffin, S. Basak, and R. W. Compans, "Effects of hexose starvation and the role of sialic acid in influenza virus release.," *Virology*, vol. 125, no. 2, pp. 324–34, Mar. 1983.
- [57] P. M. Colman, "Influenza virus neuraminidase: structure, antibodies, and inhibitors.," *Protein science : a publication of the Protein Society*, vol. 3, no. 10, pp. 1687–96, Oct. 1994.
- [58] J. J. Skehel and D. C. Wiley, "Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin.," *Annual review of biochemistry*, vol. 69, pp. 531–69, Jan. 2000.
- [59] M. Abdul Jabbar and D. P. Nayak, "Signal processing, glycosylation, and secretion of mutant hemagglutinins of a human influenza virus by *Saccharomyces cerevisiae*.," *Molecular and cellular biology*, vol. 7, no. 4, pp. 1476–85, Apr. 1987.
- [60] D. A. Senne, J. C. Pedersen, D. L. Suarez, and B. Panigrahy, "Rapid diagnosis of avian influenza (AI) and assessment of pathogenicity of avian H5 and H7 subtypes by molecular methods.," *Developments in biologicals*, vol. 126, pp. 171–7; discussion 326–7, Jan. 2006.
- [61] H. D. Klenk and W. Garten, "Host cell proteases controlling virus pathogenicity.," *Trends in microbiology*, vol. 2, no. 2, pp. 39–43, Feb. 1994.
- [62] S. J. Gamblin, L. F. Haire, R. J. Russell, D. J. Stevens, B. Xiao, Y. Ha, N. Vasisht, D. A. Steinhauer, R. S. Daniels, A. Elliot, D. C. Wiley, and J. J. Skehel, "The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 303, no. 5665, pp. 1838–42, Mar. 2004.
- [63] R. Xu, D. C. Ekiert, J. C. Krause, R. Hai, J. E. Crowe, and I. A. Wilson, "Structural basis of preexisting immunity to the 2009 H1N1 pandemic influenza virus.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 328, no. 5976, pp. 357–60, Apr. 2010.
- [64] R. Xu, R. McBride, J. C. Paulson, C. F. Basler, and I. A. Wilson, "Structure, receptor binding, and antigenicity of influenza virus hemagglutinins from the 1957 H2N2 pandemic.," *Journal of virology*, vol. 84, no. 4, pp. 1715–21, Feb. 2010.

- [65] A. Vines, K. Wells, M. Matrosovich, M. R. Castrucci, T. Ito, and Y. Kawaoka, "The role of influenza A virus hemagglutinin residues 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction.," *Journal of virology*, vol. 72, no. 9, pp. 7626–31, Sep. 1998.
- [66] D. C. Wiley, I. A. Wilson, and J. J. Skehel, "Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation.," *Nature*, vol. 289, no. 5796, pp. 373–8, Jan. 1981.
- [67] D. J. Vigerust and V. L. Shepherd, "Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions.," *Trends in microbiology*, vol. 15, no. 5, pp. 211–8, May 2007.
- [68] Y. Kawaoka and R. G. Webster, "Interplay between carbohydrate in the stalk and the length of the connecting peptide determines the cleavability of influenza virus hemagglutinin.," *Journal of virology*, vol. 63, no. 8, pp. 3296–300, Aug. 1989.
- [69] R. Daniels, B. Kurowski, A. E. Johnson, and D. N. Hebert, "N-linked glycans direct the cotranslational folding pathway of influenza hemagglutinin.," *Molecular cell*, vol. 11, no. 1, pp. 79–90, Jan. 2003.
- [70] S. R. Das, P. Puigbò, S. E. Hensley, D. E. Hurt, J. R. Bennink, and J. W. Yewdell, "Glycosylation focuses sequence variation in the influenza A virus H1 hemagglutinin globular domain.," *PLoS pathogens*, vol. 6, no. 11, p. e1001211, Jan. 2010.
- [71] A. Azizi, A. Kumar, F. Diaz-Mitoma, and J. Mestecky, "Enhancing oral vaccine potency by targeting intestinal M cells.," *PLoS pathogens*, vol. 6, no. 11, p. e1001147, Jan. 2010.
- [72] D. J. Brayden, M. A. Jepson, and A. W. Baird, "Keynote review: intestinal Peyer's patch M cells and oral vaccine targeting.," *Drug discovery today*, vol. 10, no. 17, pp. 1145–57, Sep. 2005.
- [73] J. Holmgren and C. Czerkinsky, "Mucosal immunity and vaccines.," *Nature medicine*, vol. 11, no. 4 Suppl, pp. S45–53, Apr. 2005.
- [74] B. Devriendt, B. G. De Geest, B. M. Goddeeris, and E. Cox, "Crossing the barrier: Targeting epithelial receptors for enhanced oral vaccine delivery.," *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, vol. 160, no. 3, pp. 431–9, Jun. 2012.
- [75] E. N. Meeusen, "Exploiting mucosal surfaces for the development of mucosal vaccines.," *Vaccine*, vol. 29, no. 47, pp. 8506–11, Nov. 2011.
- [76] D. S. Silin, O. V Lyubomska, V. Jirathitikal, and A. S. Bourinbaiar, "Oral vaccination: where we are?," *Expert opinion on drug delivery*, vol. 4, no. 4, pp. 323–40, Jul. 2007.
- [77] Ganten Detlev and Ruckpaul Klaus, *Immunsystem und Infektiologie*, 1st ed. Springer Berlin, 1999.
- [78] J. N. Zuckerman, "The importance of injecting vaccines into muscle. Different patients need different needle sizes.," *BMJ (Clinical research ed.)*, vol. 321, no. 7271, pp. 1237–8, Nov. 2000.
- [79] J. Rong, T. Cheng, X. Liu, T. Jiang, H. Gu, and G. Zou, "Development of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens.," *Vaccine*, vol. 23, no. 40, pp. 4844–51, Sep. 2005.

- [80] J. Pitcovski, D. Di-Castro, Y. Shaaltiel, A. Azriel, B. Gutter, E. Yarkoni, A. Michael, S. Krispel, and B. Z. Levi, "Insect cell-derived VP2 of infectious bursal disease virus confers protection against the disease in chickens.," *Avian diseases*, vol. 40, no. 4, pp. 753–61, 1996.
- [81] H. Wu, N. K. Singh, R. D. Locy, K. Scissum-Gunn, and J. J. Giambrone, "Immunization of chickens with VP2 protein of infectious bursal disease virus expressed in *Arabidopsis thaliana*.,," *Avian diseases*, vol. 48, no. 3, pp. 663–8, Sep. 2004.
- [82] S. Dey, C. Upadhyay, C. Madhan Mohan, J. M. Kataria, and V. N. Vakharia, "Formation of subviral particles of the capsid protein VP2 of infectious bursal disease virus and its application in serological diagnosis.," *Journal of virological methods*, vol. 157, no. 1, pp. 84–9, Apr. 2009.
- [83] J. Pitcovski, B. Gutter, G. Gallili, M. Goldway, B. Perelman, G. Gross, S. Krispel, M. Barbakov, and A. Michael, "Development and large-scale use of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens.," *Vaccine*, vol. 21, no. 32, pp. 4736–43, Dec. 2003.
- [84] R. Darteil, M. Bublot, E. Laplace, J. F. Bouquet, J. C. Audonnet, and M. Rivière, "Herpesvirus of turkey recombinant viruses expressing infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 immunogen induce protection against an IBDV virulent challenge in chickens.," *Virology*, vol. 211, no. 2, pp. 481–90, Aug. 1995.
- [85] J. Wu, L. Yu, L. Li, J. Hu, J. Zhou, and X. Zhou, "Oral immunization with transgenic rice seeds expressing VP2 protein of infectious bursal disease virus induces protective immune responses in chickens.," *Plant biotechnology journal*, vol. 5, no. 5, pp. 570–8, Sep. 2007.
- [86] E. D. Kilbourne, J. L. Schulman, G. C. Schild, G. Schloer, J. Swanson, and D. Bucher, "Related studies of a recombinant influenza-virus vaccine. I. Derivation and characterization of virus and vaccine.," *The Journal of infectious diseases*, vol. 124, no. 5, pp. 449–62, Nov. 1971.
- [87] L. C. Lambert and A. S. Fauci, "Influenza vaccines for the future.," *The New England journal of medicine*, vol. 363, no. 21, pp. 2036–44, Nov. 2010.
- [88] D. Mattanovich, P. Branduardi, L. Dato, B. Gasser, M. Sauer, and D. Porro, "Recombinant protein production in yeasts.," *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 824, pp. 329–58, Jan. 2012.
- [89] W. J. McAleer, E. B. Buynak, R. Z. Maigetter, D. E. Wampler, W. J. Miller, and M. R. Hilleman, "Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast.," *Nature*, vol. 307, no. 5947, pp. 178–80, 1984.
- [90] J. N. Waitumbi, S. B. Anyona, C. W. Hunja, C. M. Kifude, M. E. Polhemus, D. S. Walsh, C. F. Ockenhouse, D. G. Heppner, A. Leach, M. Lievens, W. R. Ballou, J. D. Cohen, and C. J. Sutherland, "Impact of RTS,S/AS02(A) and RTS,S/AS01(B) on genotypes of *P. falciparum* in adults participating in a malaria vaccine clinical trial.," *PloS one*, vol. 4, no. 11, p. e7849, Jan. 2009.
- [91] S. Murugan, S. Ponselaran, L. Kannivel, L. N. Mangamoori, D. Chandran, S. Villuppanoor Alwar, C. Chakravarty, and S. K. Lal, "Recombinant haemagglutinin protein of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus expressed in *Pichia pastoris* elicits a neutralizing

- antibody response in mice.," *Journal of virological methods*, vol. 187, no. 1, pp. 20–5, Jan. 2013.
- [92] T. N. Athmaram, S. Saraswat, S. R. Santhosh, A. K. Singh, W. S. Suryanarayana, R. Priya, N. Gopalan, M. Parida, P. V. L. Rao, and R. Vijayaraghavan, "Yeast expressed recombinant Hemagglutinin protein of novel H1N1 elicits neutralising antibodies in rabbits and mice.," *Virology journal*, vol. 8, p. 524, Jan. 2011.
- [93] F. C. T. Allnutt, R. M. Bowers, C. G. Rowe, V. N. Vakharia, S. E. LaPatra, and A. K. Dhar, "Antigenicity of infectious pancreatic necrosis virus VP2 subviral particles expressed in yeast.," *Vaccine*, vol. 25, no. 26, pp. 4880–8, Jun. 2007.
- [94] G. Batra, R. Raut, S. Dahiya, N. Kamran, S. Swaminathan, and N. Khanna, "Pichia pastoris-expressed dengue virus type 2 envelope domain III elicits virus-neutralizing antibodies.," *Journal of virological methods*, vol. 167, no. 1, pp. 10–6, Jul. 2010.
- [95] C. Verduyn, "Physiology of yeasts in relation to biomass yields.," *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 60, no. 3–4, pp. 325–53, 1991.
- [96] L. S. Grinna and J. F. Tschopp, "Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, Pichia pastoris.," *Yeast (Chichester, England)*, vol. 5, no. 2, pp. 107–15, 1989.
- [97] A. J. J. van Ooyen, P. Dekker, M. Huang, M. M. A. Olsthoorn, D. I. Jacobs, P. A. Colussi, and C. H. Taron, "Heterologous protein production in the yeast Kluyveromyces lactis.," *FEMS yeast research*, vol. 6, no. 3, pp. 381–92, May 2006.
- [98] B. Dujon, D. Sherman, G. Fischer, P. Durrens, S. Casaregola, I. Lafontaine, J. De Montigny, C. Marck, C. Neuvéglise, E. Talla, N. Goffard, L. Frangeul, M. Aigle, V. Anthouard, A. Babour, V. Barbe, S. Barnay, S. Blanchin, J.-M. Beckerich, E. Beyne, C. Bleykasten, A. Boisramé, J. Boyer, L. Cattolico, F. Confanioleri, A. De Daruvar, L. Despons, E. Fabre, C. Fairhead, H. Ferry-Dumazet, A. Groppi, F. Hantraye, C. Hennequin, N. Jauniaux, P. Joyet, R. Kachouri, A. Kerrest, R. Koszul, M. Lemaire, I. Lesur, L. Ma, H. Muller, J.-M. Nicaud, M. Nikolski, S. Oztas, O. Ozier-Kalogeropoulos, S. Pellenz, S. Potier, G.-F. Richard, M.-L. Straub, A. Suleau, D. Swennen, F. Tekaia, M. Wésolowski-Louvel, E. Westhof, B. Wirth, M. Zeniou-Meyer, I. Zivanovic, M. Bolotin-Fukuhara, A. Thierry, C. Bouchier, B. Caudron, C. Scarpelli, C. Gaillardin, J. Weissenbach, P. Wincker, and J.-L. Souciet, "Genome evolution in yeasts.," *Nature*, vol. 430, no. 6995, pp. 35–44, Jul. 2004.
- [99] B. W. Swinkels, A. J. van Ooyen, and F. J. Bonekamp, "The yeast Kluyveromyces lactis as an efficient host for heterologous gene expression.," *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 64, no. 2, pp. 187–201, 1993.
- [100] X. J. Chen, M. M. Bianchi, K. Suda, and H. Fukuhara, "The host range of the pKD1-derived plasmids in yeast.," *Current genetics*, vol. 16, no. 2, pp. 95–8, Aug. 1989.
- [101] R. Fleer, P. Yeh, N. Amellal, I. Maury, A. Fournier, F. Bacchetta, P. Baduel, G. Jung, H. L'Hôte, and J. Becquart, "Stable multicopy vectors for high-level secretion of recombinant human serum albumin by Kluyveromyces yeasts.," *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, vol. 9, no. 10, pp. 968–75, Oct. 1991.

- [102] K. Sreekrishna and R. C. Dickson, "Construction of strains of *Saccharomyces cerevisiae* that grow on lactose.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 82, no. 23, pp. 7909–13, Dec. 1985.
- [103] A. Gödecke, W. Zachariae, A. Arvanitidis, and K. D. Breunig, "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*, vol. 19, no. 19, pp. 5351–8, Oct. 1991.
- [104] J.-J. Krijger, J. Baumann, M. Wagner, K. Schulze, C. Reinsch, T. Klose, O. F. Onuma, C. Simon, S.-E. Behrens, and K. D. Breunig, "A novel, lactase-based selection and strain improvement strategy for recombinant protein expression in *Kluyveromyces lactis*.," *Microbial cell factories*, vol. 11, p. 112, Jan. 2012.
- [105] K. D. Breunig and P. Kuger, "Functional homology between the yeast regulatory proteins GAL4 and LAC9: LAC9-mediated transcriptional activation in *Kluyveromyces lactis* involves protein binding to a regulatory sequence homologous to the GAL4 protein-binding site.," *Molecular and cellular biology*, vol. 7, no. 12, pp. 4400–6, Dec. 1987.
- [106] W. Zachariae and K. D. Breunig, "Expression of the transcriptional activator LAC9 (KIGAL4) in *Kluyveromyces lactis* is controlled by autoregulation.," *Molecular and cellular biology*, vol. 13, no. 5, pp. 3058–66, May 1993.
- [107] F. T. Zenke, W. Zachariae, A. Lunkes, and K. D. Breunig, "Gal80 proteins of *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae* are highly conserved but contribute differently to glucose repression of the galactose regulon.," *Molecular and cellular biology*, vol. 13, no. 12, pp. 7566–76, Dec. 1993.
- [108] M. A. Barron, N. Blyveis, S. C. Pan, and C. C. Wilson, "Human dendritic cell interactions with whole recombinant yeast: implications for HIV-1 vaccine development.," *Journal of clinical immunology*, vol. 26, no. 3, pp. 251–64, May 2006.
- [109] M. P. Schreuder, C. Deen, W. J. Boersma, P. H. Pouwels, and F. M. Klis, "Yeast expressing hepatitis B virus surface antigen determinants on its surface: implications for a possible oral vaccine.," *Vaccine*, vol. 14, no. 5, pp. 383–8, Apr. 1996.
- [110] A. A. Haller, G. M. Lauer, T. H. King, C. Kemmler, V. Fiolkoski, Y. Lu, D. Bellgrau, T. C. Rodell, D. Apelian, A. Franzusoff, and R. C. Duke, "Whole recombinant yeast-based immunotherapy induces potent T cell responses targeting HCV NS3 and Core proteins.," *Vaccine*, vol. 25, no. 8, pp. 1452–63, Feb. 2007.
- [111] E. K. Wansley, M. Chakraborty, K. W. Hance, M. B. Bernstein, A. L. Boehm, Z. Guo, D. Quick, A. Franzusoff, J. W. Greiner, J. Schlom, and J. W. Hodge, "Vaccination with a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing a tumor antigen breaks immune tolerance and elicits therapeutic antitumor responses.," *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 14, no. 13, pp. 4316–25, Jul. 2008.
- [112] A. Ardiani, J. P. Higgins, and J. W. Hodge, "Vaccines based on whole recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells.," *FEMS yeast research*, vol. 10, no. 8, pp. 1060–9, Dec. 2010.

- [113] M. B. Bernstein, M. Chakraborty, E. K. Wansley, Z. Guo, A. Franzusoff, S. Mostböck, H. Sabzevari, J. Schlom, and J. W. Hodge, "Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* (yeast-CEA) as a potent activator of murine dendritic cells.," *Vaccine*, vol. 26, no. 4, pp. 509–21, Jan. 2008.
- [114] A. C. Stubbs, K. S. Martin, C. Coeshott, S. V Skaates, D. R. Kuritzkes, D. Bellgrau, A. Franzusoff, R. C. Duke, and C. C. Wilson, "Whole recombinant yeast vaccine activates dendritic cells and elicits protective cell-mediated immunity.," *Nature medicine*, vol. 7, no. 5, pp. 625–9, May 2001.
- [115] A. Tanaka, J. D. Jensen, R. Prado, H. Riemann, Y. G. Shellman, D. A. Norris, L. Chin, C. Yee, and M. Fujita, "Whole recombinant yeast vaccine induces antitumor immunity and improves survival in a genetically engineered mouse model of melanoma.," *Gene therapy*, vol. 18, no. 8, pp. 827–34, Aug. 2011.
- [116] T. Zhang, H. Yang, R. Wang, K. Xu, Y. Xin, G. Ren, G. Zhou, C. Zhang, L. Wang, and Z. Zhang, "Oral administration of myostatin-specific whole recombinant yeast *Saccharomyces cerevisiae* vaccine increases body weight and muscle composition in mice.," *Vaccine*, vol. 29, no. 46, pp. 8412–6, Oct. 2011.
- [117] M. Arnold, V. Durairaj, E. Mundt, K. Schulze, K. D. Breunig, and S.-E. Behrens, "Protective vaccination against infectious bursal disease virus with whole recombinant *Kluyveromyces lactis* yeast expressing the viral VP2 subunit.," *PLoS one*, vol. 7, no. 9, p. e42870, Jan. 2012.
- [118] M. Himly, D. N. Foster, I. Bottoli, J. S. Iacovoni, and P. K. Vogt, "The DF-1 chicken fibroblast cell line: transformation induced by diverse oncogenes and cell death resulting from infection by avian leukosis viruses.," *Virology*, vol. 248, no. 2, pp. 295–304, Sep. 1998.
- [119] P. Kuger, A. Gödecke, and K. D. Breunig, "A mutation in the Zn-finger of the GAL4 homolog LAC9 results in glucose repression of its target genes.," *Nucleic acids research*, vol. 18, no. 4, pp. 745–51, Feb. 1990.
- [120] D. M. Bui, I. Kunze, C. Horstmann, T. Schmidt, K. D. Breunig, and G. Kunze, "Expression of the *Arxula adenivorans* glucoamylase gene in *Kluyveromyces lactis*.," *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 45, no. 1–2, pp. 102–6, Mar. 1996.
- [121] H. Granzow, C. Birghan, T. C. Mettenleiter, J. Beyer, B. Köllner, and E. Mundt, "A second form of infectious bursal disease virus-associated tubule contains VP4.," *Journal of virology*, vol. 71, no. 11, pp. 8879–85, Nov. 1997.
- [122] D. B. Snyder, D. P. Lana, P. K. Savage, F. S. Yancey, S. A. Mengel, and W. W. Marquardt, "Differentiation of infectious bursal disease viruses directly from infected tissues with neutralizing monoclonal antibodies: evidence of a major antigenic shift in recent field isolates.," *Avian diseases*, vol. 32, no. 3, pp. 535–9, 1988.
- [123] H. Inoue, H. Nojima, and H. Okayama, "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids.," *Gene*, vol. 96, no. 1, pp. 23–8, Nov. 1990.
- [124] R. Akada, M. Kawahata, and Y. Nishizawa, "Elevated temperature greatly improves transformation of fresh and frozen competent cells in yeast.," *BioTechniques*, vol. 28, no. 5, pp. 854–6, May 2000.

- [125] M. Knop, K. Siegers, G. Pereira, W. Zachariae, B. Winsor, K. Nasmyth, and E. Schiebel, "Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines.," *Yeast (Chichester, England)*, vol. 15, no. 10B, pp. 963–72, Jul. 1999.
- [126] F. M. Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology, Band 1*. John Wiley & Sons Inc, 1998.
- [127] C. Ramakers, J. M. Ruijter, R. H. L. Deprez, and A. F. M. Moorman, "Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data.," *Neuroscience letters*, vol. 339, no. 1, pp. 62–6, Mar. 2003.
- [128] I. Wittig, H.-P. Braun, and H. Schägger, "Blue native PAGE.," *Nature protocols*, vol. 1, no. 1, pp. 418–28, Jan. 2006.
- [129] J. R. Castón, J. L. Martínez-Torrecuadrada, A. Maraver, E. Lombardo, J. F. Rodríguez, J. I. Casal, and J. L. Carrascosa, "C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly.," *Journal of virology*, vol. 75, no. 22, pp. 10815–28, Nov. 2001.
- [130] D. Garriga, J. Querol-Audí, F. Abaitua, I. Saugar, J. Pous, N. Verdaguer, J. R. Castón, and J. F. Rodríguez, "The 2.6-Angstrom structure of infectious bursal disease virus-derived T=1 particles reveals new stabilizing elements of the virus capsid.," *Journal of virology*, vol. 80, no. 14, pp. 6895–905, Jul. 2006.
- [131] J. Pous, C. Chevalier, M. Ouldali, J. Navaza, B. Delmas, and J. Lepault, "Structure of birnavirus-like particles determined by combined electron cryomicroscopy and X-ray crystallography.," *The Journal of general virology*, vol. 86, no. Pt 8, pp. 2339–46, Aug. 2005.
- [132] L. J. Wuestehube and R. W. Schekman, "Reconstitution of transport from endoplasmic reticulum to Golgi complex using endoplasmic reticulum-enriched membrane fraction from yeast.," *Methods in enzymology*, vol. 219, pp. 124–36, Jan. 1992.
- [133] J. K. Skeeles, P. D. Lukert, E. V De Buysscher, O. J. Fletcher, and J. Brown, "Infectious bursal disease viral infections. I. Complement and virus-neutralizing antibody response following infection of susceptible chickens.," *Avian diseases*, vol. 23, no. 1, pp. 95–106, 1979.
- [134] M. Matrosovich, T. Matrosovich, W. Garten, and H.-D. Klenk, "New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays.," *Virology journal*, vol. 3, p. 63, Jan. 2006.
- [135] Charles H. Chunningham, *A Laboratory Guide in Virology*, 7th ed. Minneapolis: Burgess Publishing Co., 1973.
- [136] I. Saugar, D. Luque, A. Oña, J. F. Rodríguez, J. L. Carrascosa, B. L. Trus, and J. R. Castón, "Structural polymorphism of the major capsid protein of a double-stranded RNA virus: an amphipathic alpha helix as a molecular switch.," *Structure (London, England : 1993)*, vol. 13, no. 7, pp. 1007–17, Jul. 2005.
- [137] A. Bachmair, D. Finley, and A. Varshavsky, "In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 234, no. 4773, pp. 179–86, Oct. 1986.
- [138] A. Varshavsky, "The N-end rule pathway of protein degradation.," *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, vol. 2, no. 1, pp. 13–28, Jan. 1997.

- [139] R. Hamilton, C. K. Watanabe, and H. A. de Boer, "Compilation and comparison of the sequence context around the AUG startcodons in *Saccharomyces cerevisiae* mRNAs.," *Nucleic acids research*, vol. 15, no. 8, pp. 3581–93, Apr. 1987.
- [140] M. N. Jagadish, D. L. Laughton, A. A. Azad, and I. G. Macreadie, "Stable synthesis of viral protein 2 of infectious bursal disease virus in *Saccharomyces cerevisiae*," *Gene*, vol. 108, no. 2, pp. 275–9, Dec. 1991.
- [141] J. Baumann, "Genetische Optimierung der LAC4 Expressionskassette zur Generierung immunogener *Kluyveromyces lactis* Stämme," Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2010.
- [142] P. M. Sharp and W. H. Li, "The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications.," *Nucleic acids research*, vol. 15, no. 3, pp. 1281–95, Feb. 1987.
- [143] B. Maertens, A. Spriestersbach, U. von Groll, U. Roth, J. Kubicek, M. Gerrits, M. Graf, M. Liss, D. Daubert, R. Wagner, and F. Schäfer, "Gene optimization mechanisms: a multi-gene study reveals a high success rate of full-length human proteins expressed in *Escherichia coli*," *Protein science : a publication of the Protein Society*, vol. 19, no. 7, pp. 1312–26, Jul. 2010.
- [144] D. Raab, M. Graf, F. Notka, T. Schödl, and R. Wagner, "The GeneOptimizer Algorithm: using a sliding window approach to cope with the vast sequence space in multiparameter DNA sequence optimization.," *Systems and synthetic biology*, vol. 4, no. 3, pp. 215–25, Sep. 2010.
- [145] N. A. Burgess-Brown, S. Sharma, F. Sobott, C. Loenarz, U. Oppermann, and O. Gileadi, "Codon optimization can improve expression of human genes in *Escherichia coli*: A multi-gene study.," *Protein expression and purification*, vol. 59, no. 1, pp. 94–102, May 2008.
- [146] N. F. Cheville, "Studies on the pathogenesis of Gumboro disease in the bursa of Fabricius, spleen, and thymus of the chicken.," *The American journal of pathology*, vol. 51, no. 4, pp. 527–51, Oct. 1967.
- [147] I. I. Mendez, L. L. Hermann, P. R. Hazelton, and K. M. Coombs, "A comparative analysis of freon substitutes in the purification of reovirus and calicivirus.," *Journal of virological methods*, vol. 90, no. 1, pp. 59–67, Oct. 2000.
- [148] I. Maharaj, K. J. Froh, and J. B. Campbell, "Immune responses of mice to inactivated rabies vaccine administered orally: potentiation by Quillaja saponin.," *Canadian journal of microbiology*, vol. 32, no. 5, pp. 414–20, May 1986.
- [149] J. Wrammert, D. Koutsonanos, G.-M. Li, S. Edupuganti, J. Sui, M. Morrissey, M. McCausland, I. Skountzou, M. Hornig, W. I. Lipkin, A. Mehta, B. Razavi, C. Del Rio, N.-Y. Zheng, J.-H. Lee, M. Huang, Z. Ali, K. Kaur, S. Andrews, R. R. Amara, Y. Wang, S. R. Das, C. D. O'Donnell, J. W. Yewdell, K. Subbarao, W. A. Marasco, M. J. Mulligan, R. Compans, R. Ahmed, and P. C. Wilson, "Broadly cross-reactive antibodies dominate the human B cell response against 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 208, no. 1, pp. 181–93, Jan. 2011.
- [150] G.-M. Li, C. Chiu, J. Wrammert, M. McCausland, S. F. Andrews, N.-Y. Zheng, J.-H. Lee, M. Huang, X. Qu, S. Edupuganti, M. Mulligan, S. R. Das, J. W. Yewdell, A. K. Mehta, P. C. Wilson, and R. Ahmed, "Pandemic H1N1 influenza vaccine induces a recall response in humans that

- favors broadly cross-reactive memory B cells.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, no. 23, pp. 9047–52, Jun. 2012.
- [151] J. F. Rossignol, S. La Frazia, L. Chiappa, A. Ciucci, and M. G. Santoro, "Thiazolidines, a new class of anti-influenza molecules targeting viral hemagglutinin at the post-translational level.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 284, no. 43, pp. 29798–808, Oct. 2009.
- [152] K. J. Travers, C. K. Patil, L. Wodicka, D. J. Lockhart, J. S. Weissman, and P. Walter, "Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation.," *Cell*, vol. 101, no. 3, pp. 249–58, Apr. 2000.
- [153] J. S. Cox and P. Walter, "A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response.," *Cell*, vol. 87, no. 3, pp. 391–404, Nov. 1996.
- [154] C. Sidrauski and P. Walter, "The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response.," *Cell*, vol. 90, no. 6, pp. 1031–9, Sep. 1997.
- [155] G. Whyteside, R. M. Nor, M. J. C. Alcocer, and D. B. Archer, "Activation of the unfolded protein response in *Pichia pastoris* requires splicing of a HAC1 mRNA intron and retention of the C-terminal tail of Hac1p.," *FEBS letters*, vol. 585, no. 7, pp. 1037–41, Apr. 2011.
- [156] F. Maley, R. B. Trimble, A. L. Tarentino, and T. H. Plummer, "Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases.," *Analytical biochemistry*, vol. 180, no. 2, pp. 195–204, Aug. 1989.
- [157] M. M. Sveda, L. J. Markoff, and C. J. Lai, "Cell surface expression of the influenza virus hemagglutinin requires the hydrophobic carboxy-terminal sequences.," *Cell*, vol. 30, no. 2, pp. 649–56, Sep. 1982.
- [158] I. A. Wilson, J. J. Skehel, and D. C. Wiley, "Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution.," *Nature*, vol. 289, no. 5796, pp. 366–73, Jan. 1981.
- [159] C.-J. Wei, L. Xu, W.-P. Kong, W. Shi, K. Canis, J. Stevens, Z.-Y. Yang, A. Dell, S. M. Haslam, I. A. Wilson, and G. J. Nabel, "Comparative efficacy of neutralizing antibodies elicited by recombinant hemagglutinin proteins from avian H5N1 influenza virus.," *Journal of virology*, vol. 82, no. 13, pp. 6200–8, Jul. 2008.
- [160] L. A. H. M. Cornelissen, R. P. de Vries, E. A. de Boer-Luijtzte, A. Rigter, P. J. M. Rottier, and C. A. M. de Haan, "A single immunization with soluble recombinant trimeric hemagglutinin protects chickens against highly pathogenic avian influenza virus H5N1.," *PloS one*, vol. 5, no. 5, p. e10645, Jan. 2010.
- [161] W. C. Weldon, B.-Z. Wang, M. P. Martin, D. G. Koutsouanos, I. Skountzou, and R. W. Compans, "Enhanced immunogenicity of stabilized trimeric soluble influenza hemagglutinin.," *PloS one*, vol. 5, no. 9, Jan. 2010.
- [162] Y. Kawaoka and R. G. Webster, "Sequence requirements for cleavage activation of influenza virus hemagglutinin expressed in mammalian cells.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 85, no. 2, pp. 324–8, Jan. 1988.

- [163] C. S. Copeland, R. W. Doms, E. M. Bolzau, R. G. Webster, and A. Helenius, "Assembly of influenza hemagglutinin trimers and its role in intracellular transport.," *The Journal of cell biology*, vol. 103, no. 4, pp. 1179–91, Oct. 1986.
- [164] S. Thoennes, Z.-N. Li, B.-J. Lee, W. A. Langley, J. J. Skehel, R. J. Russell, and D. A. Steinhauer, "Analysis of residues near the fusion peptide in the influenza hemagglutinin structure for roles in triggering membrane fusion," *Virology*, vol. 370, no. 2, pp. 403–414, Jan. 2008.
- [165] C. Falcone, M. Saliola, X. J. Chen, L. Frontali, and H. Fukuhara, "Analysis of a 1.6-micron circular plasmid from the yeast *Kluyveromyces drosophilum*: structure and molecular dimorphism.," *Plasmid*, vol. 15, no. 3, pp. 248–52, May 1986.
- [166] G. B. Morlino, L. Tizzani, R. Fleer, L. Frontali, and M. M. Bianchi, "Inducible amplification of gene copy number and heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*," *Applied and environmental microbiology*, vol. 65, no. 11, pp. 4808–13, Nov. 1999.
- [167] C.-C. Lee, T.-P. Ko, C.-C. Chou, M. Yoshimura, S.-R. Doong, M.-Y. Wang, and A. H.-J. Wang, "Crystal structure of infectious bursal disease virus VP2 subviral particle at 2.6Å resolution: implications in virion assembly and immunogenicity.," *Journal of structural biology*, vol. 155, no. 1, pp. 74–86, Jul. 2006.
- [168] C. Simon, S. Schaepe, K. Breunig, and H. Lilie, "Production of polyomavirus-like particles in a Klg180 knockout strain of the yeast *Kluyveromyces lactis*," *Preparative biochemistry & biotechnology*, vol. 43, no. 2, pp. 217–35, Jan. 2013.
- [169] S. Fath, A. P. Bauer, M. Liss, A. Spriestersbach, B. Maertens, P. Hahn, C. Ludwig, F. Schäfer, M. Graf, and R. Wagner, "Multiparameter RNA and codon optimization: a standardized tool to assess and enhance autologous mammalian gene expression.," *PloS one*, vol. 6, no. 3, p. e17596, Jan. 2011.
- [170] E. Ciplys, D. Samuel, M. Juozapaitis, K. Sasnauskas, and R. Slibinskas, "Overexpression of human virus surface glycoprotein precursors induces cytosolic unfolded protein response in *Saccharomyces cerevisiae*," *Microbial cell factories*, vol. 10, p. 37, Jan. 2011.
- [171] W. G. Bao and H. Fukuhara, "Secretion of human proteins from yeast: stimulation by duplication of polyubiquitin and protein disulfide isomerase genes in *Kluyveromyces lactis*," *Gene*, vol. 272, no. 1–2, pp. 103–10, Jul. 2001.
- [172] T. Lodi, B. Neglia, and C. Donnini, "Secretion of human serum albumin by *Kluyveromyces lactis* overexpressing KIPD11 and KIERO1.," *Applied and environmental microbiology*, vol. 71, no. 8, pp. 4359–63, Aug. 2005.
- [173] K. J. Fahey, K. Erny, and J. Crooks, "A conformational immunogen on VP-2 of infectious bursal disease virus that induces virus-neutralizing antibodies that passively protect chickens.," *The Journal of general virology*, vol. 70 (Pt 6), pp. 1473–81, Jun. 1989.
- [174] D. Luque, I. Saugar, J. F. Rodríguez, N. Verdaguer, D. Garriga, C. S. Martín, J. A. Velázquez-Muriel, B. L. Trus, J. L. Carrascosa, and J. R. Castón, "Infectious bursal disease virus capsid assembly and maturation by structural rearrangements of a transient molecular switch.," *Journal of virology*, vol. 81, no. 13, pp. 6869–78, Jul. 2007.

- [175] S. Wildt and T. U. Gerngross, "The humanization of N-glycosylation pathways in yeast.," *Nature reviews. Microbiology*, vol. 3, no. 2, pp. 119–28, Feb. 2005.
- [176] L.-X. Wang and J. V. Lomino, "Emerging technologies for making glycan-defined glycoproteins.," *ACS chemical biology*, vol. 7, no. 1, pp. 110–22, Jan. 2012.
- [177] K. L. Deshpande, V. A. Fried, M. Ando, and R. G. Webster, "Glycosylation affects cleavage of an H5N2 influenza virus hemagglutinin and regulates virulence.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 84, no. 1, pp. 36–40, Jan. 1987.
- [178] H.-D. Klenk, R. Wagner, D. Heuer, and T. Wolff, "Importance of hemagglutinin glycosylation for the biological functions of influenza virus.," *Virus research*, vol. 82, no. 1–2, pp. 73–5, Jan. 2002.
- [179] E. Zanni, F. Farina, A. Ricci, P. Mancini, C. Frank, C. Palleschi, and D. Uccelletti, "The Golgi alpha-1,6 mannosyltransferase KIOch1p of *Kluyveromyces lactis* is required for Ca²⁺/calmodulin-based signaling and for proper mitochondrial functionality.," *BMC cell biology*, vol. 10, p. 86, Jan. 2009.
- [180] B. Liu, X. Gong, S. Chang, Y. Yang, M. Song, D. Duan, L. Wang, Q. Ma, and J. Wu, "Disruption of the OCH1 and MNN1 genes decrease N-glycosylation on glycoprotein expressed in *Kluyveromyces lactis*.," *Journal of biotechnology*, vol. 143, no. 2, pp. 95–102, Aug. 2009.
- [181] D. Uccelletti, F. Farina, S. Rufini, P. Magnelli, C. Abeijon, and C. Palleschi, "The *Kluyveromyces lactis* alpha1,6-mannosyltransferase KIOch1p is required for cell-wall organization and proper functioning of the secretory pathway.," *FEMS yeast research*, vol. 6, no. 3, pp. 449–57, May 2006.
- [182] W. Martinet, X. Saelens, T. Deroo, S. Neiryck, R. Contreras, W. Min Jou, and W. Fiers, "Protection of mice against a lethal influenza challenge by immunization with yeast-derived recombinant influenza neuraminidase.," *European journal of biochemistry / FEBS*, vol. 247, no. 1, pp. 332–8, Jul. 1997.
- [183] S. Khurana, S. Verma, N. Verma, C. J. Crevar, D. M. Carter, J. Manischewitz, L. R. King, T. M. Ross, and H. Golding, "Properly folded bacterially expressed H1N1 hemagglutinin globular head and ectodomain vaccines protect ferrets against H1N1 pandemic influenza virus.," *PloS one*, vol. 5, no. 7, p. e11548, Jan. 2010.
- [184] N. Nwe, Q. He, S. Damrongwatanapokin, Q. Du, I. Manopo, Y. Limlamthong, B. J. Fenner, L. Spencer, and J. Kwang, "Expression of hemagglutinin protein from the avian influenza virus H5N1 in a baculovirus/insect cell system significantly enhanced by suspension culture.," *BMC microbiology*, vol. 6, p. 16, Jan. 2006.
- [185] H. T. Phan, J. Pohl, D. M. Floss, F. Rabenstein, J. Veits, B. T. Le, H. H. Chu, G. Hause, T. Mettenleiter, and U. Conrad, "ELPylated haemagglutinins produced in tobacco plants induce potentially neutralizing antibodies against H5N1 viruses in mice.," *Plant biotechnology journal*, vol. 11, no. 5, pp. 582–93, Jun. 2013.
- [186] J. M. Aguilar-Yáñez, R. Portillo-Lara, G. I. Mendoza-Ochoa, S. A. García-Echauri, F. López-Pacheco, D. Bulnes-Abundis, J. Salgado-Gallegos, I. M. Lara-Mayorga, Y. Webb-Vargas, F. O. León-Angel, R. E. Rivero-Aranda, Y. Oropeza-Almazán, G. M. Ruiz-Palacios, M. I. Zertuche-Guerra, R. M. DuBois, S. W. White, S. Schultz-Cherry, C. J. Russell, and M. M. Alvarez, "An

- influenza A/H1N1/2009 hemagglutinin vaccine produced in *Escherichia coli*,” *PloS one*, vol. 5, no. 7, p. e11694, Jan. 2010.
- [187] S. B. Bazan, G. Geginat, T. Breinig, M. J. Schmitt, and F. Breinig, “Uptake of various yeast genera by antigen-presenting cells and influence of subcellular antigen localization on the activation of ovalbumin-specific CD8 T lymphocytes,” *Vaccine*, vol. 29, no. 45, pp. 8165–73, Oct. 2011.
- [188] H. G. Heine, A. D. Hyatt, and D. B. Boyle, “Modification of infectious bursal disease virus antigen VP2 for cell surface location fails to enhance immunogenicity,” *Virus research*, vol. 32, no. 3, pp. 313–28, Jun. 1994.
- [189] J. L. Wasilenko, L. Sarmiento, S. Spatz, and M. Pantin-Jackwood, “Cell surface display of highly pathogenic avian influenza virus hemagglutinin on the surface of *Pichia pastoris* cells using alpha-agglutinin for production of oral vaccines,” *Biotechnology progress*, vol. 26, no. 2, pp. 542–7, 2010.
- [190] R. J. Bergkamp, I. M. Kool, R. H. Geerse, and R. J. Planta, “Multiple-copy integration of the alpha-galactosidase gene from *Cyamopsis tetragonoloba* into the ribosomal DNA of *Kluyveromyces lactis*,” *Current genetics*, vol. 21, no. 4–5, pp. 365–70, Apr. 1992.
- [191] T. Iwata, R. Tanaka, M. Suetsugu, M. Ishibashi, H. Tokunaga, M. Kikuchi, and M. Tokunaga, “Efficient secretion of human lysozyme from the yeast, *Kluyveromyces lactis*,” *Biotechnology letters*, vol. 26, no. 23, pp. 1803–8, Dec. 2004.
- [192] P. Mazur, “The role of cell membranes in the freezing of yeast and other single cells,” *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 125, no. 2, pp. 658–76, Oct. 1965.
- [193] C. Fradin, T. Jouault, A. Mallet, J. M. Mallet, D. Camus, P. Sinaÿ, and D. Poulain, “Beta-1,2-linked oligomannosides inhibit *Candida albicans* binding to murine macrophage,” *Journal of leukocyte biology*, vol. 60, no. 1, pp. 81–7, Jul. 1996.
- [194] B. N. Gantner, R. M. Simmons, and D. M. Underhill, “Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments,” *The EMBO journal*, vol. 24, no. 6, pp. 1277–86, Mar. 2005.
- [195] M. G. Netea, G. D. Brown, B. J. Kullberg, and N. A. R. Gow, “An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system,” *Nature reviews. Microbiology*, vol. 6, no. 1, pp. 67–78, Jan. 2008.
- [196] B. Aguilar-Uscanga and J. M. François, “A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation,” *Letters in applied microbiology*, vol. 37, no. 3, pp. 268–74, Jan. 2003.
- [197] K. Backhaus, C. J. Heilmann, A. G. Sorgo, G. Purschke, C. G. de Koster, F. M. Klis, and J. J. Heinisch, “A systematic study of the cell wall composition of *Kluyveromyces lactis*,” *Yeast (Chichester, England)*, vol. 27, no. 8, pp. 647–60, Aug. 2010.
- [198] R. B. Burns and M. H. Maxwell, “Ultrastructure of Peyer’s patches in the domestic fowl and turkey,” *Journal of anatomy*, vol. 147, pp. 235–43, Aug. 1986.

-
- [199] A. D. Befus, N. Johnston, G. A. Leslie, and J. Bienenstock, "Gut-associated lymphoid tissue in the chicken. I. Morphology, ontogeny, and some functional characteristics of Peyer's patches.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 125, no. 6, pp. 2626–32, Dec. 1980.
- [200] K. Kumar, K. C. Singh, and C. B. Prasad, "Immune responses to intermediate strain IBD vaccine at different levels of maternal antibody in broiler chickens.," *Tropical animal health and production*, vol. 32, no. 6, pp. 357–60, Dec. 2000.
- [201] S. Nakhukool, I. Horinouchi, and H. Hatta, "Stimulating macrophage activity in mice and humans by oral administration of quillaja saponin.," *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, vol. 75, no. 10, pp. 1889–93, Jan. 2011.
- [202] P. Seeman, D. Cheng, and G. H. Iles, "Structure of membrane holes in osmotic and saponin hemolysis.," *The Journal of cell biology*, vol. 56, no. 2, pp. 519–27, Feb. 1973.
- [203] E. Fingerut, B. Gutter, M. Goldway, D. Eliahoo, and J. Pitcovski, "B subunit of E. coli enterotoxin as adjuvant and carrier in oral and skin vaccination.," *Veterinary immunology and immunopathology*, vol. 112, no. 3–4, pp. 253–63, Aug. 2006.

7. Anhang

7.1. Nukleotidsequenzen

oVP2_{T2S}:

ATGTCCAACCTACAAGACCAAAACCAAAATCGTCCCTTTATCAGATCCTTATAATGCCTACTACCGGTCTGCTTATTCTGATGACACCTTGAAAA
 ACACACCTTGAGATCCGAAACTCAACCTATAACTGACTGTCGGTGACACTGGTTCTGGTTAATCGTTTTCTCCCTGGTTTTCTGGTTCAATTGCGGTG
 CCCACTATACCTTACAAGGTAACGGTAACATAAGTTGATCAAAATGTTGTTGACCGCCAAAATTTGCCTGCCTCTATAACTATTGTAGATTGGTTCTAG
 ATCTTTAACCGTCAGATCATCACTTTGCCTGGTGGTGTCTATGCTTTGAACGGTACAATCAACGCTGTACATTTCAAGGTTCTTCCGAAATTGACCGAT
 GTCTCTATAACGGTTAATGTCGGCTACTGCCAATATCAATGACAAAATGGTAACGCTTAGTTCGGTGAAGGTGTTACTGTTTTGAGTTGCCAACCTCTT
 ATGACTTGGTTATGTGAGATTGGGTGACCTATTCTGCTATCGGTTAGACCCAAAATGGTGGCACTTGACTCTAGTGATAGACCAAGAGTCTATA
 CCATCACTGCTGCCGATGACTATCAATTCTCTCCCAATATCAACCTGGTGGTGTACTATCACCTTGTCTCGCAACATCGACGCTATAACATCTTTGTCC
 GTCGGTGGTGAATTGGTATCCAACTCCGTCATGTTTAGTATTGGGTGCCACCATCTATTTGATTGGTTTCGACGGTACAACCGCTACTAGAGCC
 GTTGCTGCCAAATGTTTAACTGCTACTGACAACTTGTGATGCACTTCACTTGGTAAATCCCTACCAACGAAATCACACAAACCAATCACATCCATCAAA
 TGGAAATTGTCACCTCCAAATCCGGTGGTCAAGCCGGTGACAAAATGTCATGGAGTGCTAGAGGTTCAATAGCCGTAACCATCCACGGTGGTAACTATCCT
 GGTGCCTTGAGACCTGTCACTTTAGTCGCTATGAAAGAGTTGCTACTGGTCCGTCGTTACTGTTGCCGGTGGTTCAAACCTCGAATTGATCCCAACCCA
 GAATTGGCCAAAACCTGGTTACCGAATATGGTAGATTGACCCCTGGTGTATGAACTATACAAAATGATCTTATCCGAAAGAGACAGATTGGGTATCAA
 AACTGCTGGCCTACTAGAGAATATACCGACTTTAGAGAATATTTATGGAAGTCCCGGACTTAAATCCCAATGAAAATCGCCGGTGCCTTTGGTTTTAA
 GGACATCATTAGAGCCATTAGAAGAATAGCCGCTGA

oPR8-HA:

ATGAAGGCCAAGCTGTTAGTATTATTGTGTGCTTTAGCCGCTGCCGACGCCGATACCATTTGATTGGTTATCACGCCAACCACTCCACCGACTGTAGAC
 ACCGTTTTGAAAAAATGTCACCGTCACCCATTCTGTAACCTATTGGAAGATTCTATAACGGTAAATTTGTGTAGATTGAAGGGTATTGCTCCATTACAA
 TTGGGTAAATGCAACATTGCTGGTTGGTTATTGGGTAACCTGAATGTGATCCATTATTGCCTGTCAGATCCTGGTCTATATCGTGAACCCCAAAATTC
 GAAAACGGTATTTGCTATCCTGGTACTCATCGACTATGAAGAATTGAGAGAACAATTGAGTCCGTTTCTCCTTCGAAAGATTGAAATTTCCCAAAG
 GAATCCTCTGGCCAAACCATTAACACCACTAAGGGTGTACTGCTGCTTGTCCCATGCCGGTAAAAGTTCTTTCTATAGAAACTGTTGTGGTTGACCGAA
 AAGGAAGTTCCTATCCAAAATGAAAACTCTATGTCAAAAAAGGTAAGGAAGTCTGGTTTTGTGGGTATCCATCATCCATCCAACTCTAAGGA
 TCAACAAAACATCTATCAAAACGAAAACGCTTATGCTCCGTTGTCACTCCAATAATAGAAGATTCAACCCGAAATCGCCGAAAGACCAAAAGTTAG
 AGATCAAGCCGGTAGAATGAACTATTATTGACCTTGTGAACTGGTACACAATCATCTTGAAGCAATGGTAACTTGAATGCCCAAGATATGCTTT
 TGCTTTGTCTAGAGGTTTCCGTTCCGGTATCATTACTAGTAACGCCCTCATGATGAATGTAACACCAAAATGCCAAACCCATTGGGTGCTATCAACTCCTCA
 TTGCCATTTCAAAACATCCACCTGTCACTATCGGTGAATGCCAAAATATGTGATGATCGCCAAATGAGAATGGTACCAGTTTGAAGAACATCCCATCC
 ATCCAATCCAGAGGTTTATTCCGGTCCATAGCCGGTTTTATCGAAGGTGGTGGACTGGTATGATAGACGGTGGTATGGTTATCATCAAAAATGAACA
 AGGTTCTGGTTATGCTGCCGACCAAAAATCCACTCAAAATGCCATCAACGGTATCACCAACAAAGTCAACTCCGTTATCGAAAAATGAACATCCAAATCAC
 TGCCGTCGGTAAAGAAATCAACAAATGGAAAAGAGAATGAAAACCTGAACAAAAAGTTGACGACGGTTTCTGGACATCTGGACCTATAATGCCGAA
 TTATTAGTCTTATTAGAAAACGAAAAGAACATTGGACTTCCACGACTCCAACGTCAAAAATTTGATGAAAAAGTCAAAATCAAAATGAAAAACAACGCCAA
 GGAAATGGTAACGGTTCCTGCAATTTATCAAAATGTGATAACGAATGCATGGAATCCGTTAGAAACGGTACTTATGACTATCCAAAATATTCCGAAG
 AATCCAAATGAATAGAGAAAAAGTTGACGGTGTAAAATGGAAATCCATGGGTATCTATCAAAATCTGGCCATCTATTCCACTGTTGCCTCATCTTGGTAT
 TATTGGTATCATTGGGTGCCATTTCACTCTGGATGTGCTCAACGGTTCATTACAATGTAGAATCTGCATCTGA

oPR8-oCA_{T137E}-HA:

ATGAAGGCCAAGCTGTTAGTATTATTGTGTGCTTTAGCCGCTGCCGACGCCGACTTTGTGTATCGGTTATCACGCCAACCACTCTACCGACACCGTAGAC
 ACCGCTTTGAAAAAACGTCACCTGTCACCCATTCTGTAACCTATTGGAAGACAAGCATAACGGTAAATTTGTGAAATGAGAGGTGTCGCCCATTACA
 CTTGGGTAAATGCAACATTGCTGGTTGGATCTGGGTAACCTGAATGTGAATCTTATCCACTGCCTCATCTGGTCTATATCGTTGAAACTCCATCCTCC
 GACAATGGTACTTGTATCCTGGTACTCATCGACTATGAAGAATTGAGAGAACAATTGCTCCGTTTCTCCTTTGAAAGATTGAAATCTTCCAAAA
 GAATCCTCTGGCCAAATCATGACTCAAAACAGGGTGTACTGCTGCTGTCACATGCCGGTGCCAAATCCTTCTATAAAAACCTGATCTGGTTAGTCAA
 AAGGGTAACTCCTATCCAAAATGTCCAACTCTATATCAATGACAAGGGTAAGGAAGTCTGGTTTTGTGGGTATTATCATACCCATCCACATCTGCCGAC
 CAACAATCCTGTATCAAAATGCCGACATATGCTTTGTCGGTCTCAAGATATTCAAAAAATCAAACCTGAAATCGCCATTAGACCAAAAGTCAGA
 GATCAAGAAGGTAGAATGAACTATTATTGGACCTGGTGAACCTGGTACAAAATCACCTCGAAGCCACTGGTAACTTGGTTGTCCCAAGATATGCTTT
 CGCTATGGAAGAAACCGTGGTTCCGGTATCATCATCTCCGACACACCTGTTGATGACTGTAATACCACCTGCCAAACCCAAAAGGTGCTATCAACACATC
 CTTGCCCTTCCAAAACATCCACCAATCACTATCGGTAATGCCAAAATATGTCAAATCCACCAAAATGAGATTAGCCACTGGTTGAGAAACATCCCATCC
 ATTCAATCCAGAGGTTTATTCCGGTCCATTGCCGGTTTTATCGAAGGTGGTGGACTGGTATGGTGTGATGGTTATGTTATCATCAAAAACGAAACA
 AGGTTCCGGTTATGCCCGGATTTGAAATCCACTCAAAACGCTATCGACGAAATCAAAAACAAAGTCAACTCCGTCATGAAAAAATGAACACCAATTCAC
 CGCTGTTGGTAAGGAATCAACCACTGGAAAAGAGAATCGAAAACCTGAACAAAAAGTTCGATGATGGTTTCTTGGACATCTGGACCTATAATGCCGAA
 TATTAGTCTTATTAGAAAACGAAAAGAACATTGGACTATACGATTTCAAGTCAAAAACCTGATGAAAAAGTCAGATCCCAATGAAAAACAACGCCAAAG
 GAAATGGTAACGGTTCCTGCAATTTATCAAAATGTGACAACACCTGTATGGAATCCGTTCAAAAACGGTACTTATGACTATCCAAAATATTCCGAAGAA
 GCCAAATGAAATAGAGAAGAAATCGATGGTGTCAAATGGAAATCCACTAGAATCTATCAAAATCTAGCCATCTATTCCACCGTTGCCTTCTATTGGTATTG
 GTCGATCCTTGGGTGCCATCTTTCTGGATGTGCTCAACGGTTCATTACAATGTAGAATTTGCATCTGA

7.2. Sequenzoptimierungen

VP2_{T2S}:

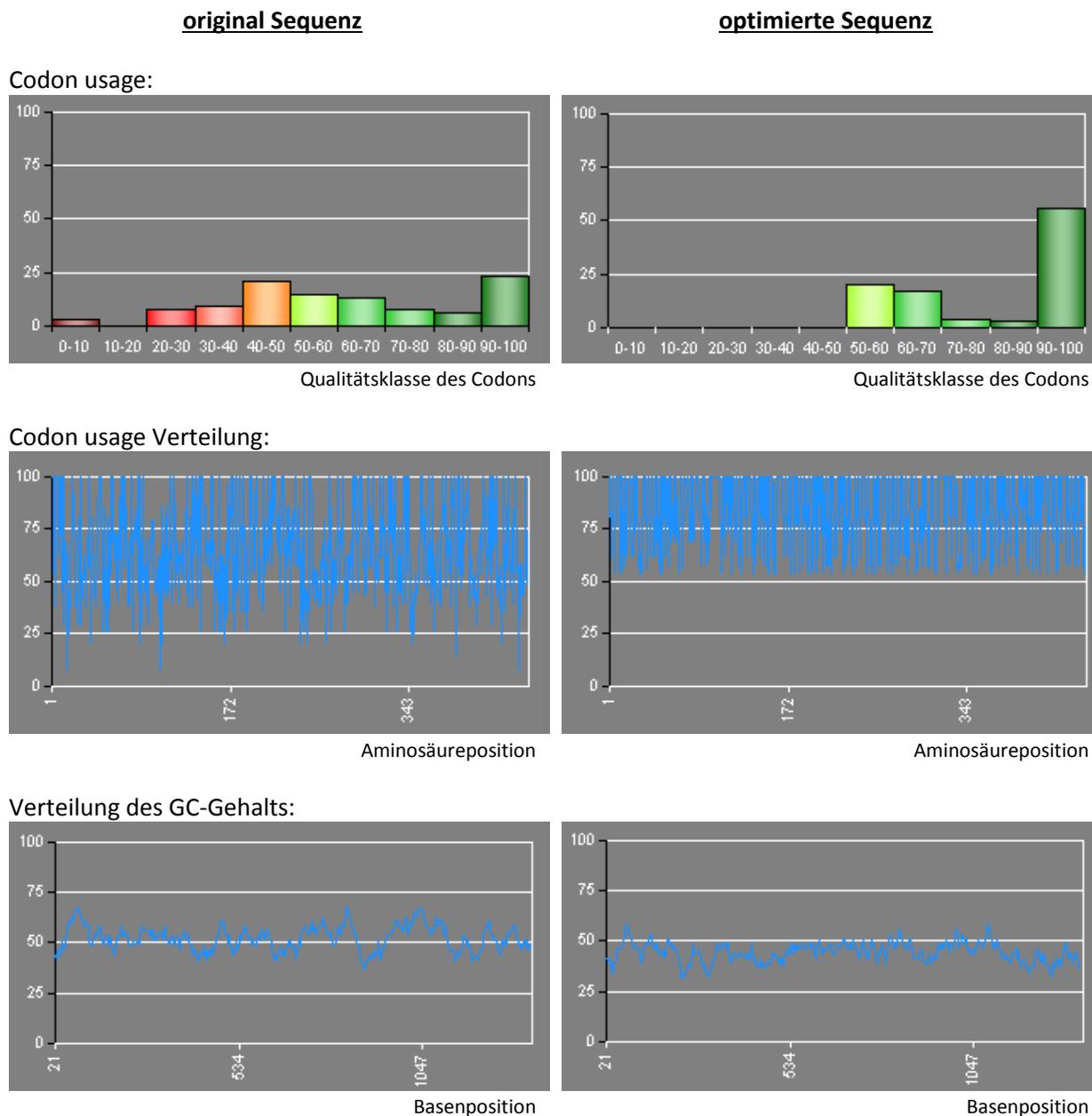
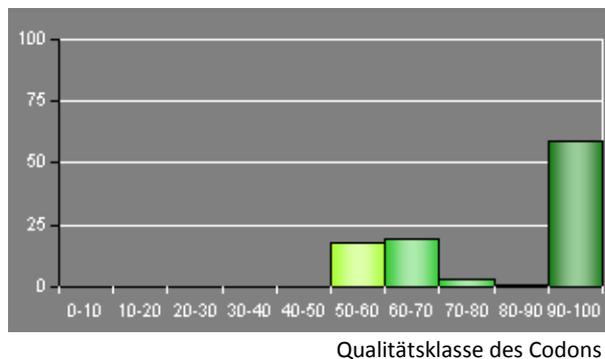
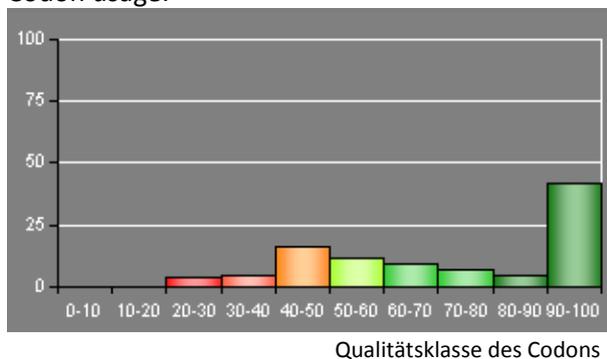


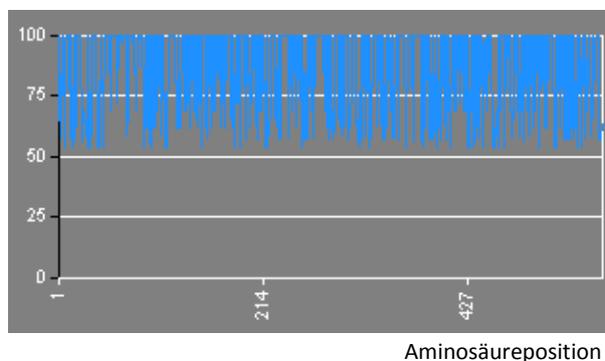
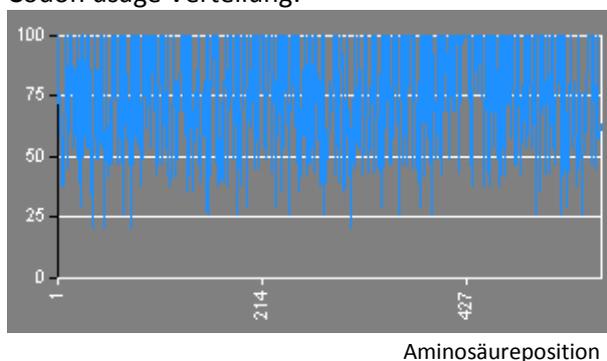
Abbildung 40: Sequenzoptimierung von VP2_{T2S}. Die Optimierung der Nukleotidsequenz erfolgte mit der Software von mr.gene.org nach Raab *et al.* [144]. Dargestellt ist die *codon usage*, die *codon usage*-Verteilung und die Verteilung des GC-Gehalts vor und nach der Optimierung.

PR8-HA:original Sequenzoptimierte Sequenz

Codon usage:



Codon usage Verteilung:



Verteilung des GC-Gehalts:

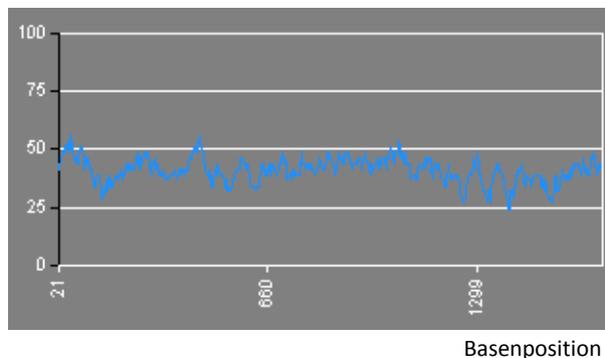
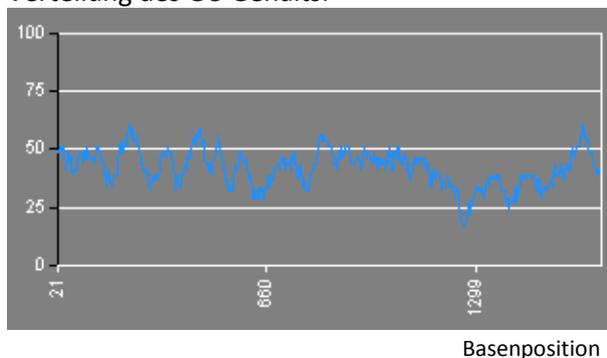
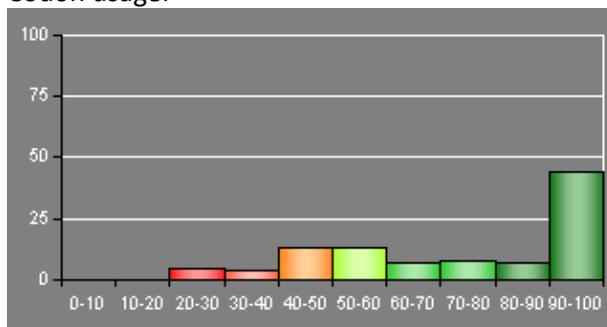


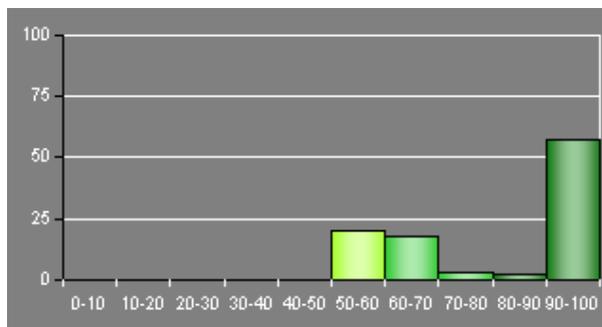
Abbildung 41: Sequenzoptimierung von PR8-HA. Die Optimierung der Nukleotidsequenz erfolgte mit der Software von mr.gene.org nach Raab *et al.* [144]. Dargestellt ist die *codon usage*, die *codon usage*-Verteilung und die Verteilung des GC-Gehalts vor und nach der Optimierung.

CA-HA:original Sequenzoptimierte Sequenz

Codon usage:

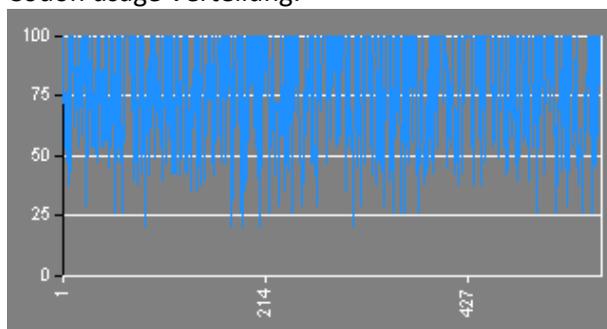


Qualitätsklasse des Codons

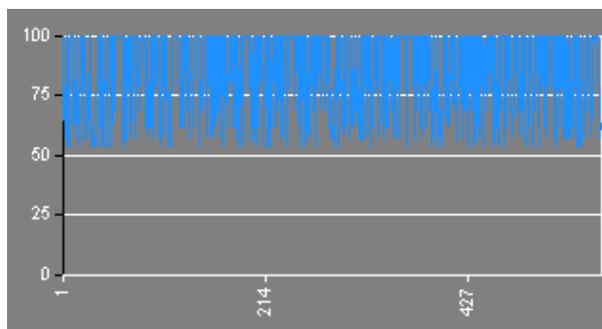


Qualitätsklasse des Codons

Codon usage Verteilung:

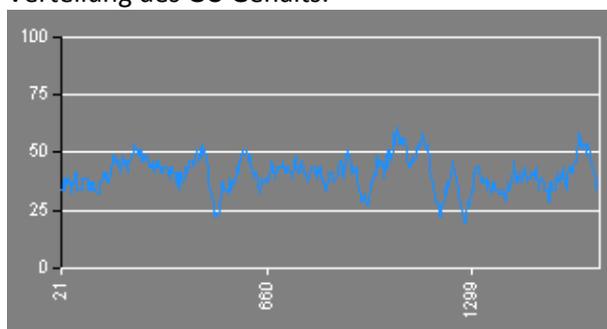


Aminosäureposition

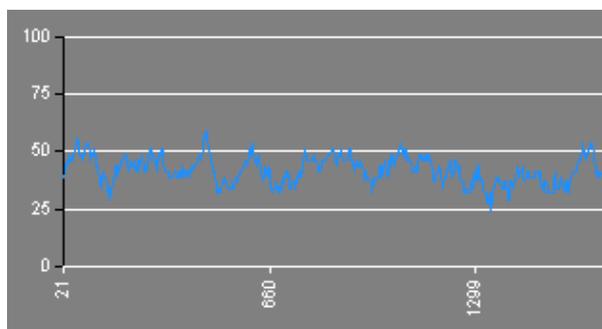


Aminosäureposition

Verteilung des GC-Gehalts:



Basenposition



Basenposition

Abbildung 42: Sequenzoptimierung von CA-HA. Die Optimierung der Nukleotidsequenz erfolgte mit der Software von mr.gene.org nach Raab *et al.* [144]. Dargestellt ist die *codon usage*, die *codon usage*-Verteilung und die Verteilung des GC-Gehalts vor und nach der Optimierung.

7.4. Zugelassene Impfstoffe gegen IBD

Tabelle 18: Übersicht der zugelassenen Impfstoffe gegen Infektiöse Bursitis (Paul-Ehrlich-Institut; Stand Januar 2013):

Handelsname	Hersteller	Impfstamm	Applikation	Art des Impfstoffes	Wirtssystem
AviPro GUMBORO VAC	Lohmann Animal Health GmbH & Co KG	IBDV Cu-1M	Trinkwasser	attenuierter Lebendimpfstoff	Hühnereier
AviPro IBD Xtreme	Lohmann Animal Health GmbH & Co KG	IBDV V217	Trinkwasser, intranasal, intraocular	attenuierter Lebendimpfstoff	Hühnereier
AviPro PRECISE	Lohmann Animal Health GmbH & Co KG	IBDV LC75	Trinkwasser	intermediär-virulenter Lebendimpfstoff	Hühnereier
CEVAC TRANSMUNE	CEVA Tiergesundheit GmbH	Winterstrain 2512, IBD Antikörper	Injektion (in ovo; subkutan)	attenuierter Lebendimpfstoff	Hühnereier
HIPRAGUMBORO-GM97	Laboratorios Hipra S.A., Spanien	GM97	Trinkwasser	Lebendvakzin	Hühnereier
HIPRAGUMBORO CW	Laboratorios Hipra S.A., Spanien	CH/80	Trinkwasser, intranasal, intraocular	Lebendvakzin	Hühnereier
Nobilis Gumboro 228E	Intervet Deutschland GmbH	IBDV 228E	Trinkwasser	Lebendvakzin	Hühnereier
Nobilis Gumboro D78	Intervet Deutschland GmbH	IBDV D78	Trinkwasser, intranasal, intraocular	Lebendvakzin	Hühnereier
Nobilis IB+G+ND	Intervet Deutschland GmbH	IBDV D78	subkutan, intramuskulär	inaktivierter Kombinationsimpfstoff	Hühnereier
Nobilis Reo+IB+G+ND	Intervet Deutschland GmbH	IBDV D78	subkutan, intramuskulär	inaktivierter Kombinationsimpfstoff	Hühnereier
Nobilis RT+IB Multi+G+ND	Intervet Deutschland GmbH	IBDV D78	subkutan, intramuskulär	inaktivierter Kombinationsimpfstoff	Hühnereier
Poulvac Bursa Plus	Pfizer GmbH	IBDV V887	Trinkwasser	Lebendvakzin	Hühnereier
Poulvac Bursine 2	Pfizer GmbH	IBDV Lukert	Trinkwasser	Lebendvakzin	Hühnereier
VAXXITEK® HVT+IBD	Merial, Frankreich	VP2 IBDV Faragher 52/70	in ovo, subkutan	rekombinante HVT-Viren mit VP2	Zellkultur

Danksagung

Zunächst möchte ich Prof. Karin Breunig und Prof. Sven-Erik Behrens ganz herzlich dafür danken, dass sie mir die Möglichkeit und das Vertrauen gegeben haben, meine Dissertation im Rahmen des VAKZINOVA-Projekts anzufertigen. Ohne die exzellenten Arbeitsbedingungen, die stetige Diskussionsbereitschaft und ihre Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Dem gesamten VAKZINOVA-Team möchte ich für die tolle Zeit der Zusammenarbeit.

Dr. Egbert Mundt bin ich sehr dankbar dafür, dass er mir den Forschungsaufenthalt in den USA ermöglichte, sowie für die herzliche Aufnahme und die Bereitstellung zahlreicher Antikörper. Außerdem möchte ich Vijay Durairaj für den täglichen Shuttleservice und die Einführung in die Arbeit mit Hühnern und der IBDV-Zellkultur danken. Ein herzlicher Dank gilt außerdem Tiffany Jenkins, die mich nicht nur aufgenommen hat, sondern mich sowohl privat als auch im Labor sehr freundlich empfing.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen „Molekulargenetik“ und „mikrobielle Biotechnologie“ bedanken, die mich stets willkommen hießen und mich in meiner Arbeit unterstützten. Ein ganz besonderer Dank geht hierbei an René Zabel, der immer ein offenes Ohr für mich und meine Probleme hatte und ohne den der Laboralltag nur halb so schön gewesen wäre. Sina und Christian danke ich dafür, dass sie mich gegen Ende der Arbeit im Labor unterstützt haben.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Dr. Gerd Hause (MLU Halle) für die Elektronenmikroskopie, bei Dr. Michael Bulang (MLU Halle) für die Herstellung der Hefepellets und bei PD Dr. Thorsten Wolff (RKI, Berlin) für den Influenzavirusstock bedanken.

Der größte Dank gilt jedoch meiner ganzen Familie und meinen Freunden für den Halt, die Unterstützung und die Zuversicht in allen Lebenslagen.

Lebenslauf**Zur Person:**

Name: Marina Arnold-Klingbeil, Dipl.-Biol.
Geburtsdatum und -ort: 2. November 1983 in Salzwedel
Familienstand: ledig, 1 Kind
Nationalität: deutsch
Geschlecht: Weiblich

Bildungsweg:

seit 08/2009 Promotion an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
am Institut für Biochemie/ Biotechnologie in der Arbeitsgruppe „mikrobielle
Biotechnologie“ von Prof. Sven-Erik Behrens
und am Institut für Biologie in der Arbeitsgruppe „Molekulargenetik“ von
Prof. Karin Breunig

11/2008 - 08/2009 Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Titel: „Funktionelle Analysen des
potentiellen GTP/GDP-Austauschfaktors Kti13 in *Saccharomyces cerevisiae*“
am Institut für Biologie in der Arbeitsgruppe „Molekulargenetik“ von
Prof. Karin Breunig

10/2003 - 08/2009 Studium der Biologie (Diplom) an der Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg

bis 06/2003 Allgemeine Hochschulreife am Friedrich-Ludwig-Jahn-Gymnasium in
Salzwedel

Publikation:

M. Arnold, V. Durairaj, E. Mundt, K. Schulze, K. D. Breunig, and S.-E. Behrens, “Protective vaccination against infectious bursal disease virus with whole recombinant *Kluyveromyces lactis* yeast expressing the viral VP2 subunit.” *PloS one*, vol. 7, no. 9, p. e42870, Jan. 2012.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Ferner erkläre ich, die Dissertation ausschließlich der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt zu haben und ich mich an keiner anderen Hochschule um die Erlangung eines Doktorgrades beworben habe.

Potsdam, den 5.10.2013