

Aus dem Institut für Virologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Jörg Timm

Analyse der SARS-CoV-2 spezifischen Immunantwort nach Impfung
mit rekombinanten, Spike- bzw. Nukleokapsidprotein
produzierenden MVA-Vektoren

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Jana Esser

2025

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Ingo Drexler

Zweitgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Stefanie Scheu

„Nur wer seinen eigenen Weg geht, kann von niemandem überholt werden.“

Marlon Brando

I. Zusammenfassung

Die *Coronavirus Disease 2019* (Covid-19)-Pandemie, die im März 2020 begann, stellte die Bevölkerung nicht nur vor medizinische, sondern auch vor soziale und wirtschaftliche Herausforderungen. Dank einer jahrelangen, intensiven Impfstoffforschung vor Beginn der Pandemie, auch im Zusammenhang mit dem Auftreten des *Severe Acute Respiratory Syndrom Coronavirus* (SARS-CoV) im Jahr 2002 und des *Middle East Respiratory Syndrom Coronavirus* (MERS-CoV) im Jahr 2012, konnten in rasanter Geschwindigkeit wirksame und sichere SARS-CoV-2 Impfstoffe auf den Markt gebracht werden. Trotz konsequent durchgeführter Impfungen und forcierter Maßnahmen des Infektionsschutzes, verursachte SARS-CoV-2 zahlreiche schwere Infektionsverläufe, Todesfälle und rekurrende Infektionswellen. Im Zuge der Entstehung weniger pathogener, dafür aber verstärkt transmissiver SARS-CoV-2 *Variants of Concern* (VOCs), hat das ursprünglich pandemische Infektionsgeschehen vielmehr einen endemischen Charakter erlangt, in dem seit Anfang 2022 die Omikron-Variante mit ihren zahlreichen Subtypen dominiert. Obwohl bei Immunkompetenten inzwischen überwiegend milde Infektionsverläufe beschrieben sind, werden Immunkompromittierte und ältere Menschen nach wie vor stark durch eine SARS-CoV-2 Infektion beeinträchtigt. Daher besteht nach wie vor die Nachfrage nach einem Impfstoff, der trotz der fortlaufend neu auftretenden Virusvarianten in der Lage ist, einen langfristigen Immunschutz zu bieten. Eines der größten Probleme besteht nach wie vor darin, dass eine Impfung eine Transmission des Virus auch bei einer asymptomatischen Infektion nicht verhindert, da eine initiale virale Vermehrung im oberen Respirationstrakt durch eine unzureichende mukosale Immunität und eine teilweise insuffiziente Antikörperantwort nicht gänzlich verhindert wird. Ein neuartiger *Modified Vacciniavirus Ankara* (MVA)-basierter SARS-CoV-2 Impfstoffkandidat könnte durch sein hohes Sicherheitsprofil und seine starke Immunogenität eine zukünftige Alternative darstellen. Die hohe Verpackungskapazität von MVA-Vektoren erlaubt darüber hinaus eine Produktion mehrerer rekombinanter Antigene. Dies bietet Vorteile im Hinblick auf eine über SARS-CoV-2 VOCs hinweg wirksame und langfristige Immunantwort. Ziel dieser Arbeit war es, rekombinante SARS-CoV-2 Spike (S)-/ bzw. Nukleokapsid (N) produzierende MVA-Vektoren als potentielle SARS-CoV-2 Impfstoffkandidaten im Mausmodell zu evaluieren. Dazu wurden C57BL/6 Mäuse und transgene HLA-A2.1/DR1 Mäuse mit den verschiedenen MVA-Vektoren geimpft und anschließend hinsichtlich der Induktion einer Antikörper- und einer HLA-A2.1/DR1 restringierten T-Zell-Antwort untersucht. Die Messung der Antikörperantwort erfolgte dabei quantitativ mittels eines laborinternen indirekten *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assays* (ELISA) und qualitativ über einen Neutralisationstest, in dem die Neutralisationskapazität der gebildeten Antikörper gegen den SARS-CoV-2 „Wildtyp“, die Alpha-, Beta-, Delta- und Omikron-Variante evaluiert wurde. Die T-Zell-Antwort wurde über eine Messung der Interferon γ (IFN γ)-Ausschüttung durch aktivierte, SARS-CoV-2 spezifische T-Zellen mittels Intrazellulärer Zytokinfärbung und einer anschließenden *Fluorescence Activated Cytometry* (FACS)-Analyse untersucht. Der Spike produzierende MVA-Vektor „MVA-Sc“ war dabei in der Lage, eine sehr hohe Antikörper-Antwort nach *Prime-Boost-Impfung* zu induzieren. Diese Antikörper zeigten außerdem ein ausgeprägtes Neutralisationsvermögen gegenüber verschiedenen VOCs, insbesondere gegenüber der Omikron-Variante. Der Nukleokapsid-produzierende MVA-Vektor „MVA-N“ konnte keine messbare Antikörper-Antwort induzieren. Ähnlich wie nach Impfung mit MVA-Sc, waren aber auch nach Impfung mit MVA-N potente SARS-CoV-2 spezifische T-Zell-Antworten messbar. Eine Kointegration des S-Proteins und des hochkonservierten, immunogenen N-Proteins in einen Impfvektor bietet, im Hinblick auf die hier gezeigten Ergebnisse im präklinischen Setting, ein hohes Potential als langfristig wirksamer, zukünftiger SARS-CoV-2 Impfstoffkandidat.

II. Summary

The Coronavirus Disease 2019 (Covid-19) pandemic, which began in March 2020, presented not only medical but also social and economic challenges to the population. Thanks to years of intensive vaccine research prior to the onset of the pandemic, including research about Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV), firstly described in 2002 and about Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) in 2012, effective and safe SARS-CoV-2 vaccines were brought to market at a rapid pace. Despite consistently implemented vaccination and enforced infection control measures, SARS-CoV-2 caused numerous severe courses of infection, deaths, and recurrent waves of infection. In the course of the emergence of less pathogenic but more transmissible SARS-CoV-2 “Variants of Concern” (VOCs), the originally pandemic infection event has instead acquired an endemic character, in which the Omicron variant with its numerous subtypes has dominated since early 2022. Although predominantly mild courses of infection have now been described in immunocompetent individuals, immunocompromised and elderly individuals continue to be severely impacted by SARS-CoV-2 infection. Therefore, there is still a demand for a vaccine which is capable of providing long-term immune protection despite the ongoing emergence of new viral variants. Still one of the major problems is that vaccination does not prevent transmission of the virus even in asymptomatic infection, because initial viral replication in the upper respiratory tract is not entirely prevented due to inadequate mucosal immunity and partially insufficient antibody response. A novel Modified Vaccinia virus Ankara (MVA)- based SARS-CoV-2 vaccine candidate may represent a future alternative due to its high safety profile and strong immunogenicity. Furthermore, the high packaging capacity of MVA vectors allows production of multiple recombinant antigens. This offers advantages in terms of a more effective and long-term immune response across SARS-CoV-2 VOCs. The aim of this work was to investigate recombinant SARS-CoV-2 Spike (S)- /or Nucleocapsid (N)- expressing MVA vectors as potential SARS-CoV-2 vaccine candidates in a mouse model. To this end, C57BL/6 mice and HLA-A2.1/DR1 transgenic mice were vaccinated with the different MVA vectors and subsequently examined with respect to the induction of an antibody and an HLA-A2.1/DR1 restricted T-cell response. The antibody response was measured quantitatively by an in-laboratory established indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and qualitatively by a neutralization assay, in which the neutralization capacity of the generated antibodies against the SARS-CoV-2 “Wildtype”, Alpha, Beta, Delta and Omicron variants was evaluated. The T cell response was evaluated by measuring IFN γ release by activated SARS-CoV-2 specific T cells using Intracellular Cytokine Staining followed by Fluorescence Activated Cytometry (FACS) analysis. The spike expressing MVA vector “MVA-Sc” was able to induce a very high antibody response after prime-boost vaccination. These antibodies also showed a pronounced neutralization capacity against various VOCs, especially against the Omicron variant. The nucleocapsid-expressing MVA vector “MVA-N” failed to induce a measurable antibody response. However, similar to vaccination with MVA-Sc, potent SARS-CoV-2 specific T cell responses were measurable after vaccination with MVA-N. In view of the promising results shown here in preclinical setting, coinjection of the S protein and the highly conserved and immunogenic N protein into a vaccine vector offers a high potential for a long-term effective future SARS-CoV-2 vaccine candidate.

III. Abkürzungsverzeichnis

ACE 2	<i>Angiotensin-Converting-Enzyme 2</i>	ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
Ak	Antikörper	FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> (hier <i>Fluorescence Activated Cytometry</i>)
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrom</i> (Akutes Atemnotsyndrom)	FBS	Fetales Bovines Serum (Fetales Kälberserum)
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>	FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
BSA	Bovines Serum Albumin	FP	Fusionspeptid
CD	<i>Cluster Of Differentiation</i>	GISAID	<i>Global Initiative on Sharing All Influenza Data</i>
CO₂	Kohlenstoffdioxid	HLA	Humanes Leukozyten Antigen
Covid-19	<i>Coronavirus Disease 2019</i>	HR	<i>Heptad Repeat Region</i>
CPE	<i>Cytopathic effect</i> (Zytopathischer Effekt)	IFN	Interferon
CT	<i>C-Tail</i>	i.m.	intramuskulär
CTD	C-Terminale Domäne	Ig	Immunglobulin
CVA	Chorioallantois Vaccinia Virus Ankara	IU	<i>Infectious Units</i> (Infektiöse Einheiten)
dH₂O	Destilliertes Wasser	kbp	Kilobasenpaare
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
DMSO	Dimethylsulfoxid	LPS	Lipopolysaccharid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)	M	Membran (SARS-CoV-2 Membranprotein)
E	<i>Envelope</i> (SARS-COV-2 Hüllprotein)	mAk	Monoklonaler Antikörper

MERS-COV	<i>Middle East Respiratory Syndrom Coronavirus</i>	RT	Raumtemperatur
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>	S	Spike
MOI	<i>Multiplicity Of Infection</i> (Infektionsdosis)	S3	Biologische Sicherheitsstufe 3
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>	SARS-CoV	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus</i>
MVA	<i>Modified Vaccinia Virus Ankara</i> (Modifiziertes Vaccinia Virus Ankara)	Sc	Spike Codonoptimiert
N	Nukleokapsid	STIKO	Ständige Impfkommission
NLS	<i>Nuclear Localization Sequence</i>	TCID50	<i>Tissue Culture Infection Dose 50</i>
NTD	N-Terminale Domäne	TCGF	<i>T Cell Growth Factor</i>
OD	Optische Dichte	Tfh	T- folliculäre Helferzelle
ORF	<i>Open Reading Frame</i>	UTR	<i>Untranslated Region</i>
P	Passage	WHO	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)
PBS	Phosphate-Buffered Saline	WT	Wildtyp
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)	ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben
PenStrep	Penicillin-Streptomycin		
PFA	Paraformaldehyd		
PH5	Modifizierter H5 Promotor		
PRR	Pattern Recognition Receptor		
pNPP	p-Nitrophenylphosphat		
RBD	Rezeptor Bindende Domäne		
RNA	Ribonucleic Acid		
rpm	<i>Rounds per minute</i>		
RPMI	<i>Rosewell Park Memorial Institute Medium</i>		

Einheiten

°C	Grad Celsius
cGy	Zentigray
cm	Zentimeter
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
µl	Mikroliter
ng	Nanogramm
pg	Pikogramm
kDa	Kilodalton

IV. Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	SARS-CoV-2	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Pathogenese und klinische Präsentation	2
1.1.3	SARS-COV-2 Eigenschaften.....	3
1.1.4	Virusvarianten.....	7
1.1.5	Bereits etablierte SARS-CoV-2 Impfstoffe	9
1.2	Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA)	10
1.2.1	Eigenschaften.....	11
1.2.2	MVA als Vektorimpfstoff	13
1.2.3	Bisherige Erprobung von MVA-Impfstoffen im Zusammenhang mit SARS-CoV-2	14
1.3	Ziele der Arbeit	14
2	Material und Methoden.....	17
2.1	Material.....	17
2.1.1	Geräte.....	17
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	18
2.1.3	Reagenzien	19
2.1.4	Pufferlösungen	21
2.1.5	Gebrauchsmedien	21
2.1.6	Zellen	22
2.1.7	Verwendete Tiere	23
2.1.8	Viren	25
2.1.9	Antikörper	26
2.1.10	Antigene	27
2.1.11	Peptide	27
2.1.12	Fluorochrome	30
2.1.13	Software/ Datenverarbeitung/ Statistik.....	30
2.2	Methoden.....	31
2.2.1	Mausimmunisierung	31
2.2.2	Blutabnahme und Serumgewinnung	32
2.2.3	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA).....	33
2.2.4	Etablierung eines laborinternen Anti-S /Anti-N-Antikörper ELISAs.....	34
2.2.5	Testung der Mausseren im S- bzw. N-ELISA	37
2.2.6	Neutralisationstest.....	38
2.2.7	Zellkultivierung, Zellzählung und Kryokonservierung.....	40
2.2.8	Infektion von Zellen	41
2.2.9	Splenektomie und Präparation muriner Splenozyten.....	42
2.2.10	Peptid-Screening Assay	42
2.2.11	Intrazelluläre Zytokinfärbung und <i>Fluorescence Activated Cytometry</i> (FACS).....	44
2.2.12	Etablierung zweier Spike-Peptidspezifischer CD8+ T-Zelllinien (S 417, S 976)....	46

2.2.13	T-Zell-Restimulation	47
2.2.14	T-Zell-Assay	49
2.2.15	Statistische Auswertung	50
3	Ergebnisse.....	51
3.1	Etablierung eines Anti-S-Antikörper-ELISAs und eines Anti-N-Antikörper-ELISAs zur Quantifizierung der Antikörperantwort nach Impfung.....	51
3.2	Antikörper-Antwort nach Impfung mit MVA-N/ MVA-Sc im Mausmodell.....	57
3.2.1	SARS-CoV-2 Nukleokapsid-Protein spezifische Antikörperantwort nach Impfung mit rekombinantem, SARS-CoV-2 Nukleokapsid produzierendem MVA (MVA-N)	58
3.2.2	SARS-CoV-2 Spike-Protein spezifische Antikörperantwort nach Impfung mit rekombinantem, SARS-CoV-2 Spike Protein produzierendem MVA (MVA-Sc)	59
3.3	SARS-CoV-2 Spike- und Nukleokapsid spezifische T-zelluläre Immunantwort im HHD/DR1 transgenen Mausmodell nach Immunisierung mit rekombinantem, SARS-CoV-2 Spike- bzw. Nukleokapsidprotein produzierendem MVA.....	61
3.3.1	<i>Ex vivo</i> Screening auf immunogene HLA A2.1 und HLA-DR1 restringierte Spike- und Nukleokapsid-Peptide hinsichtlich einer T-zellulären Immunantwort.....	61
3.3.2	<i>In vitro</i> Testung der Reaktivität SARS-CoV-2 S976 und S417 spezifischer muriner CD8+ T-Zellen mittels INF γ Ausschüttung auf endogen präsentierte Peptide durch HLA-A2.1 exprimierende Zellen.	65
4	Diskussion.....	69
4.1	Bedeutung einer präformierten Immunantwort durch eine Impfung im Zusammenhang mit SARS-CoV-2.....	69
4.2	Bedeutung der humoralen Immunantwort.....	70
4.2.1	MVA-Sc ist in der Lage, im Mausmodell Virusvarianten übergreifend neutralisierende Anti-S-Antikörper zu induzieren.....	70
4.2.2	MVA-N ist nicht in der Lage, eine im ELISA messbare Antikörperantwort im Mausmodell zu induzieren.....	73
4.3	Bedeutung der T-zellulären Immunantwort im Zusammenhang mit SARS-CoV-2	75
4.3.1	MVA-Sc und MVA-N sind in der Lage, im Mausmodell SARS-COV-2 S- bzw. N-spezifische T-Zellen zu induzieren	76
4.3.2	<i>In vitro</i> expandierte, SARS-CoV-2 Spike-spezifische murine CD8+ T-Zellen aus HHD/DR1 Mäusen werden durch MVA-Sc infizierte Zellen nicht reaktiviert.....	81
4.4	Potential neuer Impfstrategien und MVA-basierter SARS-CoV-2 Impfstoffkandidaten im Hinblick auf einen langfristigen Immunschutz	85
4.5	Fazit: Potential von MVA-Sc /MVA Sc-N als zukünftiger SARS-CoV-2 Impfstoffkandidat	88
5	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	90
6	Anhang.....	106
6.1	FACS Gating Strategie für den Peptide Screening Assay	106
6.1.1	Screening auf immunogene HLA-A2.1 restringierte Spike-Peptide	106
6.1.2	Screening auf immunogene HLA-A2.1 restringierte Nukleokapsid-Peptide	108
6.1.3	Screening auf immunogene HLA-DR1 restringierte Spike-Peptide	109
6.1.4	Screening auf immunogene HLA-DR1 restringierte Nukleokapsid-Peptide.....	110
6.2	FACS Gating Strategie für den T-Zell-Assay	111
6.2.1	Untersuchung der T-Zell-Reaktivität in T-Zell-Kulturen der Passage Eins	111
6.2.2	Untersuchung der T-Zell-Reaktivität der T-Zell-Kulturen in Passage Fünf	113

1 Einleitung

1.1 SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrom Coronavirus-2*) ist ein neuartiges Coronavirus, das erstmalig im Dezember 2019 in Wuhan, China auftrat und die Erkrankung COVID-19 (*Coronavirus Disease 2019*) verursachte [1]. Unmittelbar nach dem Auftreten der ersten Atemwegsinfektionen in China kam es zur raschen globalen Ausbreitung des Virus, sodass die *World Health Organisation* (WHO) am 30.01.2020 einen „Gesundheitsnotstand internationaler Tragweite“ ausrief und COVID-19 am 11.03.2020 als Pandemie einstufte [1]. Die Pandemie zog nicht nur verheerende gesundheitliche, sondern auch soziale und wirtschaftliche Konsequenzen nach sich [2]. Dank der steigenden Immunität der Bevölkerung durch wirksame Impfstoffe und durchgemachte Infektionen, sowie der Optimierung diagnostischer und therapeutischer Möglichkeiten, ist die Zahl schwer verlaufender Infektionen und die Notwendigkeit intensivmedizinischer Behandlungen im Verlauf der Zeit gesunken [3]. Unter dem aktuell stabilen Infektionsgeschehen, hat COVID-19 inzwischen vielmehr einen endemischen Charakter erlangt [4].

1.1.1 Epidemiologie

Nach wie vor ist der Ursprung des neuartigen Coronavirus nicht sicher geklärt. Wie bei dem Auftreten anderer neuartiger Coronaviren wie dem *Severe Acute Respiratory Syndrom Coronavirus* (SARS-CoV) und *Middle East Respiratory Syndrom Coronavirus* (MERS-CoV), liegt auch bei SARS-CoV-2 eine Herkunft aus dem Tierreich nahe [5, 6]. Das Virus wird in erster Linie über Tröpfchen von Mensch zu Mensch übertragen [7]. Darüber hinaus wird auch die Möglichkeit einer fäkal-oralen Übertragung [8] oder eine Übertragung über kontaminierte Oberflächen oder Aerosole diskutiert [9].

Aufgrund der Neuartigkeit des Virus und eines initial fehlenden Immunschutzes waren vor allem zu Beginn der Pandemie die Hospitalisierungsrate, die Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Versorgung und die Mortalität hoch [3, 4].

Seit Beginn der SARS-CoV-2 Pandemie verzeichnete die WHO insgesamt über 776 Millionen Infektionen und über 7 Millionen Todesfälle weltweit (Stand 31.08.2024) [10]. Für schwere und letale Infektionsverläufe prädisponieren vor allem ein höheres Lebensalter, das männliche Geschlecht und chronische Komorbiditäten [11].

Neben präventiven Maßnahmen des Infektionsschutzes, kam es zur raschen Entwicklung und Zulassung der ersten Impfstoffe im Dezember 2020 [12]. Zwar führten die Impfmaßnahmen zu einer Entspannung des Infektionsgeschehens, jedoch kam es auch im weiteren Verlauf unter dem Auftreten neuer Virusvarianten zu rekurrierenden Infektionswellen [13] und zu einer verminderten Wirksamkeit der bereits etablierten Impfstoffe [14].

Für Risikogruppen empfiehlt die Ständige Impfkommission (STIKO) entsprechend weiterhin eine regelmäßige *Booster*-Impfung mit an aktuell zirkulierende SARS-CoV-2 Varianten angepassten Impfstoffen [15].

1.1.2 Pathogenese und klinische Präsentation

Nach Aufnahme über den Respirationstrakt bindet SARS-CoV-2 zum Eintritt in die Wirtszelle an den Rezeptor des humanen *Angiotensin-Converting-Enzyme 2* (ACE2) [5, 16], der in hoher Dichte auf der Oberfläche von Zellen des respiratorischen Epithels der Nase exprimiert wird [17], sich jedoch auch in größerem Ausmaß in anderen Geweben wie u.a. dem Gastrointestinaltrakt, der Niere, dem Myokard, und den Testes findet [18]. Nach Rezeptorbindung und Membranfusion wird das Virusgenom in das Zytoplasma der Zelle entlassen und die Transkription und Translation von Virusproteinen, sowie die Replikation der viralen Ribonukleinsäure (RNA) beginnt [19]. Nach Detektion der viralen RNA durch zytoplasmatische *Pattern Recognition Receptors* (PRR's) kommt es regulär zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und zur Herstellung eines antiviralen Milieus [19]. SARS-CoV-2 jedoch, nimmt Einfluss auf zahlreiche Reaktionswege der zellulären Immunantwort [20]. Unter anderem wird auf mehreren Ebenen die Produktion, Ausschüttung und die Funktion von Interferonen gestört, sodass gerade in der initialen Phase der Infektion eine verminderte antivirale Immunantwort generiert wird [20]. Eine gleichzeitige Stimulation anderer proinflammatorischer Faktoren durch die virale Infektion resultiert in einer dysregulierten zellulären Immunantwort [20]. Über direkte pathogene Effekte des Virus, ebenso wie über die Hyperinflammation, kommt es zur Gewebeschädigung. Eine systemisch dysregulierte Immunantwort kann demzufolge eine Schädigung verschiedenster Organsysteme verursachen [20].

Je nach individueller Immunkompetenz, stellt sich das klinische Bild von COVID-19 entsprechend heterogen dar. Überwiegend sind milde bis moderate Verläufe mit Symptomen eines harmlosen respiratorischen Infektes wie Husten, Fieber,

Abgeschlagenheit, Myalgien und Cephalgien bis hin zu Pneumonien mit Dyspnoe beschrieben [21, 22]. Darüber hinaus können gastrointestinale Symptome wie Übelkeit oder Diarrhoe auftreten [23]. In anderen Fällen kann die Infektion auch asymptomatisch bleiben [24]. Vor allem im Zusammenhang mit einem zunehmendem Alter über 60 Jahren und chronischen Komorbiditäten wie Übergewicht, Diabetes mellitus, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, chronischer Niereninsuffizienz, chronischen Lungenerkrankungen, Tumorerkrankungen, einer Immunsuppression etc. kann SARS-CoV-2 schwere Infektionsverläufe mit einer hohen Mortalität verursachen [24]. Solche schweren Verläufe sind häufig mit einer systemischen Dysregulation der Immunantwort assoziiert [25]. Damit einhergehende Komplikationen sind, unter anderem, die Entstehung eines *Acute Respiratory Distress Syndrom* (ARDS) mit der Erforderlichkeit einer maschinellen Beatmung [26] und Komplikationen wie akutes Nierenversagen [27], eine Überaktivierung des Gerinnungssystems mit Entstehung von Thrombosen und Embolien [28] oder auch akute kardiale Ereignisse [29].

Neben der Akutsymptomatik kann eine SARS-CoV-2 Infektion außerdem im Sinne eines Long-Covid-Syndroms langfristig chronische Beschwerden verursachen. Die genaue Pathophysiologie ist ungeklärt und Gegenstand weiterer Forschung. Vermutet werden unter anderem autoimmune Prozesse, eine verlängerte Persistenz des Virus im Körper, eine anhaltende Dysregulation des Immunsystems und eine endotheliale Dysfunktion [30]. Die Symptome eines Long-Covid-Syndroms sind sehr vielschichtig. Häufig ist das Krankheitsbild geprägt von chronischer Fatigue und neurologischen Störungen neben zahlreichen weiteren, unspezifischen Symptomen [30].

1.1.3 SARS-CoV-2 Eigenschaften

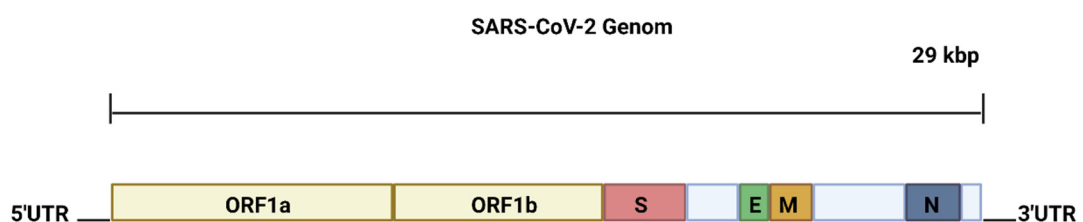


Abb. 1 SARS-CoV-2 Genom. Schematische Abbildung der SARS-CoV-2 Genomsstruktur. 5' UTR = 5' *Untranslated Region*, 3'UTR= 3' *Untranslated Region*, ORF 1a/1b= *Open reading frame 1a/b*, S= Spike , E= Envelope , M= Membran, N= Nukleokapsid. Kbp= Kilobasenpaare. Abbildung in Anlehnung an Zhou *et al.*, 2022 [14]. Erstellt mit BioRender.

SARS-CoV-2 gehört zur Familie der *Coronaviridae* und zum *Genus* der β -Coronaviren [31]. Das RNA-Virus ist 100-160 nm groß, umhüllt, und besitzt ein einzelsträngiges Genom von ca. 30 Kilobasenpaaren (kbp) Länge mit Plusstrangorientierung [1, 21]. Das Genom von Coronaviren besteht aus einer variablen Anzahl an *Open Reading Frames* (ORFs), wobei die am 5' Ende lokalisierten ORFs 1a/1b zwei Drittel des Genoms ausmachen und für den Replikations-/Transkriptionsapparat kodieren, während am 3' Ende vor allem die ORFs für die Strukturproteine lokalisiert sind [31]. Zu nennen sind hier das Spike-Protein (S), das Nukleokapsid-Protein (N), das Membran-Protein (M) und das Envelope-Protein (E) [31] (siehe **Abb.1**).

1.1.3.1 Spike-Protein

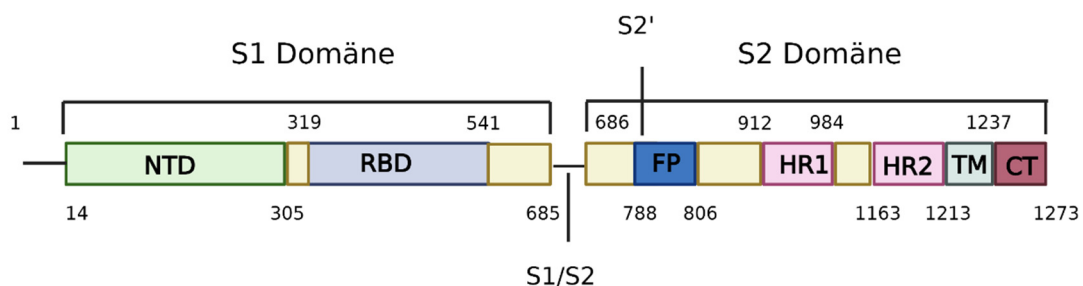


Abb. 2 Domänen des SARS-CoV-2 Spike-Proteins. Das monomere Spike (S)-Protein besitzt in seiner Gesamtheit 1273 Aminosäuren. Der Bereich an Aminosäuren, den die entsprechenden Domänen umfassen, sind hier mit Nummern gekennzeichnet. Das S-Protein besteht aus den zwei funktionellen Domänen S1 und S2, die nicht kovalent im Bereich der *Furin-Cleavage Site* S1/S2 miteinander verbunden sind. Eine weitere *Cleavage Site* befindet sich im Bereich der S2-Domäne (S2'). Die S1 Domäne umfasst die N-terminale Domäne (NTD) und die Rezeptor bindende Domäne (RBD). In der S2 Domäne ist das Fusionspeptid (FP), die *Heptad Repeat Region* 1 und 2 (HR1, HR2), die Transmembrandomäne (TM) und der *C-Tail* (CT) lokalisiert. Abbildung in Anlehnung an Huang *et al.*, 2020 [32]. Erstellt mit BioRender.

Besondere Funktion im Hinblick auf die Infektion der Wirtszelle hat das S-Protein, das als Homotrimer aus der Virusmembran ragt und verantwortlich für die namensgebende kronenartige Morphologie des Virus unter dem Elektronenmikroskop ist [14]. Das monomere S-Protein hat ein Molekulargewicht von ca. 180 Kilodalton (kDa) und besteht aus einer S1 und einer S2 Domäne [33] (siehe **Abb.2**). Die S1-Domäne, genauer gesagt die Rezeptorbindende Domäne (RBD), ist, ebenso wie bei SARS-CoV, zuständig für die Bindung des Virus an den Wirtszellrezeptor von ACE2 (siehe **Abb. 3**) [34]. Die S2-Domäne ist verantwortlich für die Virus-Zell-Fusion [35].

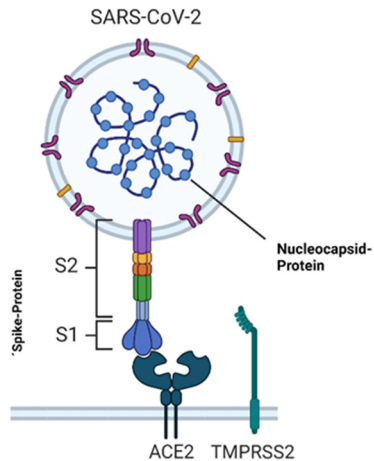


Abb. 3 Adhäsion von SARS-CoV-2 an den ACE2 Rezeptor. Schematische Abbildung eines SARS-CoV-2 Virions während der Adhäsion an den humanen ACE2-Rezeptor über das virale Spike-Protein. S1= S1 Domäne des Spike-Proteins, S2= S2-Domäne des Spike-Proteins, ACE2= *Angiotensin-Converting-Enzyme 2*, TMPRSS2= *Transmembrane Protease Serine Subtype 2*. Erstellt mit BioRender.

Nach Bindung des Virus an den zellulären Rezeptor kommt es zur Konformationsänderung im S-Protein. Die dadurch exponierte S2 Domäne wird über die zellmembranständige Protease *Transmembran Protease Serin Protease 2* (TMPRSS2) anschließend im Bereich S2' gespalten [35]. Eine ebenfalls für den Fusionsprozess erforderliche Spaltung im Bereich der S1/S2 *Furin Cleavage Site* erfolgt schon vor dem Angriff der Zielzelle während der Virusreifung [35]. Die durch die Spaltungen bedingten Konformationsänderungen im Protein führen zu einer Annäherung des Fusionspeptids der S2 Domäne an die Zellmembran, die anschließend mit der Virusmembran fusioniert, sodass die virale RNA ins Zytoplasma der Wirtszelle entlassen werden kann [35]. Bei unzureichender TMPRSS2 Dichte auf der Zelloberfläche kann das Virus alternativ als ACE2-Virus-Komplex endosomal aufgenommen und der Fusionsprozess durch die endolysosomale Protease Cathepsin L initiiert werden [35].

Durch die Lokalisation an der Virusoberfläche und seine Schlüsselfunktion bei Bindung und Eintritt in die Wirtszelle, stellt das S-Protein ein wichtiges Ziel für neutralisierende Antikörper dar, die einen Eintritt in die Zielzelle auf mehreren Ebenen verhindern können [36]. Ebenso ist das S-Protein in der Lage, protektive T-Zell-Antworten zu induzieren [36]. Im Rahmen der Impfstoffentwicklung wird das S-Protein daher als hoch relevantes Antigen zur Induktion eines wirksamen Immunschutzes eingestuft und hat bereits in zahlreichen Impfstoff-Formulierungen Anwendung gefunden [36].

Auf der anderen Seite ist das S-Protein als Oberflächenantigen und Hauptangriffspunkt neutralisierender Antikörper eine häufige Lokalisation neuauftretender Mutationen [37]. Zum verwandten SARS-CoV zeigt das S-Protein lediglich noch eine 76%ige Homologie [38]. Am häufigsten kommen Mutationen im Bereich der RBD der S1 Domäne vor und beeinflussen unter anderem die Rezeptoraffinität des Spike-Proteins und die Wirksamkeit neutralisierender Antikörper [37].

1.1.3.2 Nukleokapsid-Protein

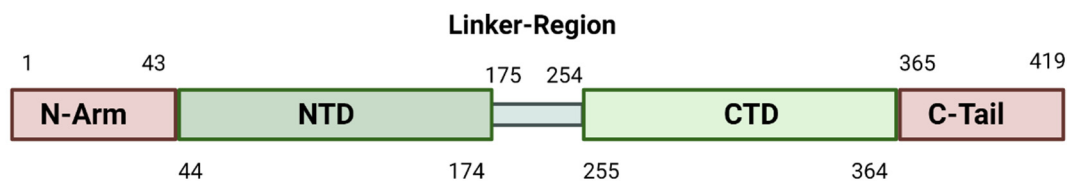


Abb. 4 Domänen des SARS-CoV-2 Nukleokapsid-Protein. Das Nukleokapsid-Protein (N-Protein) besteht in seiner Gesamtheit aus 419 Aminosäuren und umfasst mit der N-terminalen Domäne (NTD) und der C-terminalen Domäne (CTD) zwei funktionelle Bereiche, die an der Ribonukleinsäure (RNA)-Bindung beteiligt sind. Die CTD besitzt darüber hinaus dimerisierende Eigenschaften. Die NTD und CTD sind über eine Linker-Region miteinander verbunden und von einem N-Arm bzw. einem C-Tail flankiert. Abbildung in Anlehnung an Zhihua Bai *et al.*, 2021 [39]. Erstellt mit BioRender.

Im Gegensatz zu den anderen oben genannten Strukturproteinen, ist das N-Protein nicht in der Virusmembran lokalisiert, sondern mit der genomischen RNA assoziiert (siehe **Abb. 3**), erfüllt hier die Funktion der Genomverpackung und ist an der Replikation der viralen RNA beteiligt [40]. Durch die Assoziation mit der RNA und den strukturellen Proteinen der Virushülle, spielt es außerdem eine Rolle beim Virus *Assembly* [40]. Darüber hinaus nimmt es Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus der infizierten Zelle und auf die durch die virale Infektion induzierte Immunantwort [40].

Das N-Protein ist unter verschiedenen Coronaviren hinsichtlich seines modularen Aufbaus vergleichbar [41]. SARS-CoV-2 N hat ein Molekulargewicht von 45,6 kDa [42] und besteht aus zwei voneinander unabhängigen strukturellen Domänen, einer N-terminalen Domäne (NTD) und einer C-terminalen Domäne (CTD) [43]. Beide Domänen besitzen RNA-bindende, die CTD darüber hinaus RNA-dimerisierende Eigenschaften [41]. Die beiden Domänen sind über eine Linker-Region miteinander verbunden und jeweils von einem C-Tail und N-Arm flankiert [43] (siehe **Abb. 4**).

In infizierten Zellen wird das N-Protein in großer Menge synthetisiert [41]. Außerdem ist es sehr immunogen und in der Lage, sowohl spezifische Antikörper, als auch T-Zellen zu induzieren [44, 45].

Im Vergleich zum S-Protein ist das N-Protein über die bekannten Coronaviren hinweg hochkonserviert, sodass es evolutionär kaum genetischer Veränderung unterliegt und bis zu 90% Homologien mit SARS-CoV zeigt [38]. Auch im Laufe des Auftretens der SARS-CoV-2 VOCs scheint das N-Protein hinsichtlich der Erkennung durch spezifische T-Zellen keine relevante genetische Veränderung aufzuweisen und gilt damit ebenfalls als relevantes Antigen für zukünftige SARS-CoV-2 Impfstoffe [45].

1.1.4 Virusvarianten

Generell unterliegen RNA-Viren durch eine fehlende Korrekturlesefunktion der RNA-Polymerase einer hohen Frequenz an Mutationen über die Zeit [46]. Coronaviren dahingegen besitzen eine solche Korrekturlesefunktion [46]. Im Hinblick auf die Entstehung von Mutationen, die unter präformierter Immunität einen Selektionsvorteil bieten und eine entsprechende evolutionäre Entwicklung des Virus bedingen, scheint diese Korrekturlesefunktion jedoch keine relevante Auswirkung zu haben [47].

Das Auftreten neuer SARS-CoV-2 Varianten bietet eine Herausforderung und eine Gefahr für die Wirksamkeit bereits etablierter Impf- und Therapiemöglichkeiten. SARS-CoV-2 Varianten, die eine erhöhte Transmission zeigen, mit einer erhöhten Virulenz assoziiert sind, oder eine verminderte Wirksamkeit von Impfungen, diagnostischen oder therapeutischen Möglichkeiten bedingen und eine zunehmende Dominanz gegenüber anderen SARS-CoV-2 Varianten erlangen, werden von der WHO als VOC eingestuft [48]. Zu den in dieser Arbeit thematisierten, zum Zeitpunkt ihres Auftretens als VOC klassifizierte Varianten, gehören Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1), Delta (B.1.617.2) und Omikron (B.1.1.529) (siehe **Tabelle 1**) [49, 50]. Darüber hinaus gibt es zahlreiche *Variants Of Interest* (VOI), die durch die selben oben genannten Kriterien definiert sind, sich aber von den VOCs durch ihre geringere Bedrohlichkeit hinsichtlich der Krankheitsschwere, der suffizienten Verfügbarkeit medizinischer Ressourcen und eines entsprechend geringeren Interventionsbedarfes zur Sicherung der öffentlichen Gesundheit unterscheiden [48].

Tabelle 1 SARS-CoV-2 Variants of Concern (VOCs). Abgebildet sind die von der World Health Organisation (WHO) definierten VOCs (Stand Dezember 2021) mit entsprechender PANGO-Nomenklatur, Ort und Zeitpunkt des ersten dokumentierten Auftretens der Variante [49, 50]. Die PANGO-Nomenklatur beschreibt mittels Buchstaben und Ziffern die zeitliche Abfolge des Auftretens neuer Virusvarianten und die Abstammung von vorherigen Varianten (<https://www.pango.network>).

Virusvariante nach WHO Nomenklatur	Pango-Linie	Ort und Zeitpunkt der ersten Dokumentation
Alpha	B.1.1.7	Großbritannien, September 2020
Beta	B.1.351	Südafrika, Mai 2020
Gamma	P.1	Brasilien, November 2020
Delta	B.1.617.2	Indien, Oktober 2020
Omikron	B.1.1.529	Mehrere Länder, November 2021

Seit 2021 traten zahlreiche Omikron-Sublinien auf (BA.1- BA.5), die zeitweise die Infektionswellen dominierten und ebenfalls als VOCs unter der ursprünglichen Omikron-Variante subsummiert wurden [51, 52]. Weitere danach auftretende Sublinien galten nicht mehr als VOCs und wurden differenzierter als VOI oder als VUM (*Variant Under Monitoring*) charakterisiert [52]. Als VUM werden dabei Varianten definiert, die, aufgrund der Möglichkeit eines Wachstumsvorteils gegenüber herkömmlichen Varianten oder aufgrund einer raschen Transmission, einer intensiveren Überwachung bedürfen [48]. Nach wie vor als VOI klassifiziert werden die Linien XBB.1.5, XBB.1.16, EG.5 und BA.2.86 [52]. Die seit Dezember 2023 global dominierende Variante mit aktuell ca. 95% der in der *Global Initiative on Sharing All Influenza Data* (GISAID) verzeichneten viralen Sequenzen ist die Omikron-Linie JN.1, die ebenfalls als VOI eingestuft wurde [52]. Die ursprüngliche Omikron-Variante trat erstmalig im November 2021 auf und wurde am 26.11.2021 von der WHO als VOC definiert [50]. Mit allein bis zu 32 Mutationen im S-Protein ist sie bisher die Variante mit der größten genomischen Veränderung [53] und zeigt mit dem Auftreten neuer Sublinien einen fortschreitenden Verlust der Wirksamkeit der durch Impfung oder Infektion präformierten humoralen Immunantwort [53, 54].

Als Selektionsfaktor scheint beim Auftreten neuer Varianten in erster Linie die verminderte Wirksamkeit neutralisierender Antikörper eine Rolle zu spielen [37]. Allerdings ist ein Auftreten von Mutationen auch unabhängig von einem natürlichem Selektionsdruck durch eine präformierte Immunität möglich, wie sie beispielweise bei der Omikron-Variante beschrieben wurde, die erstmalig bei einem immunkompromittiertem Patienten unter prolongierter Infektion isoliert wurde [37, 55].

1.1.5 Bereits etablierte SARS-CoV-2 Impfstoffe

In rasanter Geschwindigkeit wurden unmittelbar nach Beginn der COVID-19 Pandemie im Dezember 2020 und Januar 2021 die ersten SARS-CoV-2 Impfstoffe zugelassen (siehe **Tabelle 2**). Dabei handelte es sich zunächst vor allem um neuartige *messenger*-RNA (mRNA)-basierte Impfstoffe auf der Basis des S-Proteins von BioNTech und Moderna [12, 56]. Anfang 2021 folgten dann S-Protein produzierende adenovirale Vektorimpfstoffe der Hersteller AstraZeneca und Janssen-Cilag [12, 56]. Im weiteren Verlauf wurden proteinbasierte Impfstoffe und ein Impfstoff auf Basis des inaktivierten Virus zugelassen [12, 56]. Aufgrund zunehmender Wirksamkeitsminderung im Zuge neu auftretender SARS-CoV-2 Varianten wurden die mRNA Impfstoffe Comirnaty und Spikevax bereits mehrmals an veränderte S-Protein Varianten angepasst [12, 53, 54] (siehe **Tabelle 2**).

Tabelle 2 SARS-CoV-2 Impfstoffe. Dargestellt sind die zu Beginn der Pandemie und aktuell (Stand November 2024) in Anwendung am Menschen befindlichen Impfstoffe mit Angaben zum Hersteller und zur Art des Impfstoffes [12, 56].

Name	Hersteller	Art des Impfstoffes
Comirnaty Comirnaty Original/Omicron BA.1 Comirnaty Original/Omicron BA.4-5 Comirnaty Omicron XBB.1.5 Comirnaty JN.1 Cormirnaty KP.2	BioNTech Manufacturing GmbH	mRNA*
Spikevax (COVID-19 Vaccine Moderna) Spikevax bivalent Original/Omicron BA.1 Spikevax bivalent Original/Omicron BA.4-5 Spikevax XBB.1.5 Spikevax JN.1	Moderna Biontech Spain, S.L.	mRNA*
Vaxzevria (COVID-19 Vaccine AstraZeneca)	AstraZeneca AB, Schweden	Vektorimpfstoff
Jcovden (COVID-19 Vaccine Janssen)	Janssen-Cilag International NV	Vektor- Impfstoff
Nuvaxovid (NVX-CoV2373) Nuvaxovid XBB.1.5 Nuvavoxid JN.1	Novavax CZ a.s	Proteinbasiert
COVID-19 Vaccine (inactivated, adjuvanted) Valneva	Valneva Austria GmbH	Virusimpfstoff, inaktiviert, adjuvantiert
VidPrevtyn Beta	Sanofi Pasteur, Frankreich	Proteinbasiert, rekombinant, adjuvantiert
Bimervax	HIPRA Human Health, S.L.U., Spanien	Proteinbasiert, rekombinant, adjuvantiert

* mRNA: *messenger* Ribonukleinsäure

1.2 Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA)

Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) entstammt dem Vacciniavirus (VACV) Stamm Ankara, der im Rahmen von Pockenimpfkampagnen 1953 nach München gebracht und dort zunächst in Chorioallantoismembranen embryonierter Hühnereier kultiviert wurde (CVA= *Chorioallantois Vaccinia Virus Ankara*) [57] (zitiert nach [58]) . Nach über 500 seriellen Passagen von CVA in Hühnerembryofibroblasten verlor das Virus aufgrund

zahlreicher Genomveränderungen, unter anderem sechs größerer Genomdeletionen, die Fähigkeit, effektiv in Säugetierzellen replizieren zu können [58, 59]. Zwar ist die Replikation des Virusgenoms und die Synthese von Virusproteinen durch den Genverlust nicht beeinträchtigt, jedoch kommt es zu keiner Formation infektiöser Viruspartikel in den meisten Säugerzellen, u.a. auch nicht in menschlichen (siehe **Abb. 5**) [58].

Als Impfstoff kam MVA erstmals 1977 im Rahmen der Pockeneradikationskampagne der WHO zum Einsatz [58]. Im Vergleich zum vorher verwendeten VACV Stamm zeigten sich nach Impfung mit MVA lediglich milde lokale Hautreaktionen und leichte systemische Reaktionen, jedoch keine schweren Nebenwirkungen im Sinne von schweren Hautläsionen, Enzephalitiden oder Todesfällen, wie sie im Falle von VACV Impfungen beschrieben wurden [60, 61]

Durch seine hohe Sicherheit und sein hoch immunogenes Potential ist MVA im Laufe der Zeit zum vielseitig erprobten Vektorimpfstoff gegen zahlreiche Infektionskrankheiten geworden [58]. Auch im Zusammenhang mit anderen Coronaviren wie SARS-CoV und MERS-CoV wurde bereits präklinische und klinische Forschung zu MVA-basierten Impfstoffen betrieben [62-64].

1.2.1 Eigenschaften

MVA, bzw. das dem zugrundeliegende VACV, gehört zur Familie der *Poxviridae* und zum *Genus* der Orthopoxviren [65]. Das Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Virus besitzt ein lineares, doppelsträngiges Genom, das, im Falle von MVA, einer Größe von 178 kbp entspricht [66]. Als einziges DNA-Virus ist das Pockenvirus in der Lage, im Zytoplasma der Wirtszelle zu replizieren (siehe **Abb. 5**) und ist in der initialen Phase der Infektion nicht auf die Ausstattung der Wirtszelle mit entsprechenden Enzymen angewiesen, sondern bringt seinen eigenen Replikations-/Transkriptionsapparat mit [67].

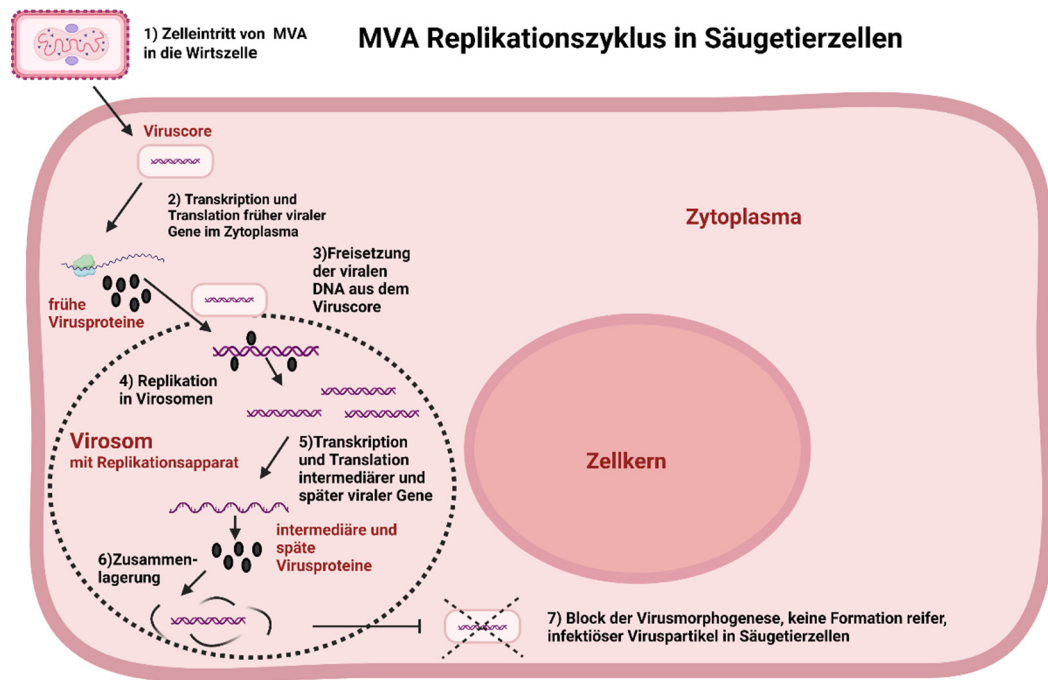


Abb. 5 Schematische Abbildung des Replikationszyklus von MVA in Säugetierzellen.

Abgebildet ist der Replikationszyklus von *Modified Vaccinia Virus Ankara* (MVA) vom Eintritt in die Wirtszelle bis zum Stopp der Virusmorphogenese aufgrund der Replikationsdefizienz von MVA in den meisten Säugetierzellen. 1) Nach Eintritt von MVA in die Wirtszelle kommt es zur 2) Transkription früher viraler Gene im *Viruscore* und deren Translation im Zytoplasma der Wirtszelle. Diese frühen viralen Gene codieren unter anderem für Proteine des Replikationsapparates. Nach Transkription der frühen viralen Gene kommt es zur 3) Freisetzung der viralen Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus dem *Viruscore* und zur Formation von Virusfabriken, sogenannten „Virusomen“, in denen die 4) Replikation des Virus und die 5) Transkription intermediärer und später Gene stattfindet. 6) Zwar lagern sich virale Bestandteile zusammen, jedoch kommt es durch Ausbleiben der Verpackung der viralen DNA zu keiner Formation reifer, infektiöser Viruspartikel, die die Wirtszelle verlassen und weitere Zellen infizieren können. Abbildung in Anlehnung an Modrow *et al.*, 2010 und Volz, Sutter, 2017 [58, 68]. Erstellt mit BioRender.

Für den Zelleintritt scheint kein spezifischer Rezeptor notwendig zu sein [69], entsprechend breit ist das Spektrum an Wirtszellen, die das Virus infizieren kann [65]. Nachdem das *Viruscore* ins Zytoplasma der Zielzelle gelangt ist, beginnt die Transkription der frühen viralen Gene, die, unter anderem, für den Replikationsapparat kodieren [67]. Diese frühen Transkripte werden im Zytoplasma organisiert und dort translatiert [70]. Anschließend erfolgt eine Freisetzung des Virusgenoms aus dem *Viruscore* für die anschließende Genomreplikation [71]. Die Genomreplikation, sowie die Transkription und Translation von intermediären und späten viralen Genen findet in sogenannten Virusfabriken statt [72, 73], deren Membranen aus dem endoplasmatischen Retikulum hervorgehen [74]. Die Transkripte der späten Gene

kodieren vor allem für Proteine, die der DNA-Prozessierung und Verpackung dienen [75].

Die Benennung der ORFs im MVA Genom orientiert sich an der Nomenklatur des Vaccinia Virus Stamm Copenhagen [76]. Diese beruht auf einer Spaltung des MVA-Genoms durch das Restriktionsenzym *HindIII* in 15 Fragmente [65]. Diese werden, der Größe entsprechend, absteigend mit A bis O betitelt [65]. Die ORFs in den Fragmenten werden von links nach rechts mit Nummern versehen, außerdem wird durch ein „R“ für rechts bzw. „L“ für links die Leserichtung angegeben [65]. Den ORFs entsprechend werden auch die in dieser Arbeit verwendeten MVA Peptide benannt.

1.2.2 MVA als Vektorimpfstoff

Als Vektorimpfstoff bietet MVA zahlreiche Alleinstellungsmerkmale. Durch seine hohe Verpackungskapazität für Fremd-DNA von ca. 25 Kb ist es möglich, eine Synthese von gleich mehreren antigenen Strukturen durch einen Impfstoff zu gewährleisten und damit eine breitere Immunantwort gegen das Ziel-Pathogen zu induzieren [60]. Trotz seiner Replikationsdefizienz in Säugetierzellen ist eine uneingeschränkte Genexpression möglich, sodass neben der hohen Sicherheit, eine Induktion einer Immunantwort ermöglicht wird, die der einer natürlichen Infektion entspricht [58]. Neben einer höheren Sicherheit bedingen die genomischen Deletionen in MVA darüber hinaus eine Steigerung des immunogenen Potentials [77], da auch virale Proteine wie Chemokinanaloge und lösliche Rezeptoren für Interferone (IFN) und Tumornekrosefaktoren (TNF) nicht mehr produziert werden, die im ursprünglichen VACV Stamm zur Suppression der antiviralen Immunantwort des Wirtes führten [78].

Im Tiermodell zeigt MVA, sogar unter partieller Immundefizienz, eine sichere und verlässliche Induktion einer protektiven Immunantwort [79]. Ein ebenso vielversprechendes Potential könnte der Einsatz von MVA auch bei älteren und immunkompromittierten Patienten bieten [58]. Wirtschaftlich und logistisch betrachtet, stellt sich der Einsatz von MVA als Vektorimpfstoff unkompliziert dar, da die Herstellung, die Lagerung und der Transport keine besonderen Bedingungen erfordern und die Handhabung unter Bedingungen der Biologischen Schutzstufe 1 erfolgen kann [60, 77]. Bedenken bezüglich einer Wiedererlangung der Replikationskompetenz erwiesen sich bisher als unbegründet [80]. Eine oftmals diskutierte vorbestehende Vektorimmunogenität durch vorausgegangene Impfungen mit VACV-Impfstoffen oder mit rekombinanten MVA-Impfstoffen, mit der Konsequenz einer verminderten

Immunreaktion auf ein durch MVA produziertes Fremd-Antigen, erscheint ebenfalls wenig relevant und könnte durch den Einsatz von heterologen Impfschemata umgangen werden [60].

1.2.3 Bisherige Erprobung von MVA-Impfstoffen im Zusammenhang mit SARS-CoV-2

Auch im Zusammenhang mit SARS-CoV-2 sind bereits zahlreiche verschiedene MVA-basierte Impfstoffformulierungen in präklinischer und klinischer Testung. Dabei basieren die meisten, so wie die bereits zugelassenen SARS-CoV-2 Impfstoffe, auf dem S-Antigen als Ziel-Antigen [81-84]. Darüber hinaus erproben Chiuppesi *et al.* einen synthetischen, multiantigenen Impfstoff, der das S- und das N-Gen koexprimiert [85]. Zwei dieser MVA-basierten SARS-CoV-2 Impfstoffe, MVA-SARS-CoV-2-ST und der multiantigene Impfstoff COH04S1, befinden sich außerdem bereits in Phase I (NCT05226390, NCT04895449) bzw. Phase II (NCT 04977024) Studien (ClinicalTrials.gov). COH04S1 zeigte dabei, sowohl hinsichtlich der Sicherheit, als auch im Hinblick auf eine starke Immunreaktion, sogar unter Immunsuppression, bereits vielversprechende Ergebnisse [86, 87].

1.3 Ziele der Arbeit

Zwar sind bereits wirksame SARS-CoV-2 Impfstoffe etabliert und in klinischer Anwendung, jedoch besteht unter der hohen Dynamik neu auftretender Virusvarianten nach wie vor die Nachfrage nach einem Impfstoffkandidaten, der in der Lage ist, auch über zukünftig auftretende Virusvarianten hinweg, einen langfristigen Immunschutz zu bieten. Trotz rasanter Immunisierung der Bevölkerung, kam es seit Beginn der COVID-19 Pandemie zu rekurrierenden Infektionswellen unter neuauftretenden Virusvarianten. Der Impfschutz und die durchgemachten Infektionen waren in der Lage, ein Immungedächtnis zu etablieren, das, neben anderen Faktoren, mit der Zeit die Zahl schwerer Erkrankungsverläufe reduzieren konnte [88]. Jedoch zeigte sich eine kontinuierliche Abnahme der Wirksamkeit des präformierten Immunschutzes gegenüber neu auftretenden Virusvarianten, insbesondere gegenüber der Omikron-Variante und ihren Sublinien [14, 53, 54].

Eine Methode, um diesem Wirksamkeitsverlust entgegenzuwirken, besteht, wie bereits praktiziert, in einer fortlaufenden Anpassung der bereits etablierten Impfstoffe an aktuelle Virusvarianten (siehe **Tabelle 2**).

Eine langfristige Lösung könnte ein Impfstoff bieten, der, wie der von Chiuppesi *et al.* etablierte synthetische, multiantigene MVA-basierte Impfstoff [85], neben dem meist verwendeten S-Protein, auch das hochkonservierte N-Protein produziert, durch welches das durch die Impfung induzierte Immungedächtnis resilienter gegenüber Mutationen im S-Protein werden könnte. Einen großen Benefit würde darüber hinaus ein Impfstoff bieten, der eine ohnehin starke, VOC übergreifend wirksame, neutralisierende Antikörperantwort induzieren kann und so die Frequenz erforderlicher *Booster*-Impfungen reduziert. Neben dem Ziel der Induktion einer starken T-Zell-Antwort, könnte eine zukünftig noch stärkere Fokussierung auf eine potente neutralisierende Antikörperantwort von großem gesellschaftlichen Nutzen sein. Denn nach wie vor birgt die fortbestehende Übertragung von replikationskompetentem Virus durch asymptomatisch Infizierte an Menschen, die selbst keinen suffizienten Immunschutz ausbilden können, ein Risiko für schwere Infektionsverläufe.

Durch seine hohe Verpackungskapazität für Fremd-DNA, durch seine Immunogenität und sein hohes Sicherheitsprofil, bietet MVA als Vektor in diesem Zusammenhang ein großes Potential als zukünftiger SARS-CoV-2 Impfstoffkandidat.

Ziel dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, ob rekombinante S- bzw. N-Protein produzierende MVA-Vektoren als potentielle SARS-CoV-2 Impfstoffkandidaten fähig sind, im Mausmodell SARS-CoV-2 spezifische, VOC übergreifend wirksame Antikörper und T-Zellen zu induzieren.

Dazu wurden durch die AG Drexler zunächst die drei MVA-Vektoren „MVA-Sc“, „MVA-N“ und „MVA-N_Sc“ generiert, indem die SARS-CoV-2 Gene, die für das S- und das N-Protein codieren, über homologe Rekombination unter Kontrolle des starken, synthetisch modifizierten „*Early/Late*“-Promotors PH5 [89] in die Deletion VI des MVA-Genoms kloniert wurden. Anstelle des ursprünglichen S-Gens wurde eine codonoptimierte Variante genutzt, die, im Gegensatz zum ursprünglichen S-Gen, keine MVA-spezifische Stoppssequenz enthält, und somit eine uneingeschränkte Genexpression ermöglicht [90]. Des Weiteren sind die Sequenzen für die eukaryotische Expression, sowie die Translation am Ribosom, optimiert. Anschließend wurden die MVA-Vektoren, unter anderem, hinsichtlich ihrer Stabilität, ihrer Replikationskapazität und der Effizienz ihrer Genexpression *in vitro* charakterisiert [90]. Dabei ergaben sich Probleme im Kontext der Koexpression des S- und N-Gens im

Vektor MVA-N_Sc. Da keine uneingeschränkte Genexpression in diesem Konstrukt möglich war, ergab sich zunächst die Notwendigkeit einer entsprechenden Optimierung des Vektors [90].

In diesem Projekt erfolgt daher lediglich die präklinische Evaluation der Immunogenität der Vektoren MVA-Sc und MVA-N *in vivo*. Langfristiges Ziel auf Basis der Erkenntnisse dieser Untersuchungen ist eine Entwicklung eines rekombinanten MVA-Vektors, der beide Gene koexprimiert und somit eine potente und langanhaltende Immunantwort gegenüber SARS-CoV-2 induzieren könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 3 Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Pipetten Pipetman®	Gilson
12-Kanal Pipette	Eppendorf
Pipettierhelfer accu-jet® pro	BRAND
Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer	Thermo Scientific
ThermoMixer® C	Eppendorf
Megafuge™ 16 Universalzentrifuge -Rotor 75003624 -Rotor 75003629	Thermo Scientific
Centrifuge 5424R	Eppendorf
Vortex-Genie™ 2	Scientific Industries
SONOPULS HD 2070 Ultraschall Homogenisator	BANDELIN
Schüttel-Wasserbad 1083	GFL
Heracell 240i CO2 Inkubator	Thermo Scientific
Gammacell 1000 Elite	Nordion International INC.
FACSCanto II Flow Cytometer	BD Biosciences
Mikroskop CKX41	Olympus

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
10/20 µl XL TipOne® Filter Pipettenspitze, graduert (steril)	Starlab
20 µl konische TipOne® Filter Pipettenspitze, graduert (steril)	Starlab
100 µl konische TipOne® Filter Pipettenspitze, graduert (steril)	Starlab
200 µl TipOne® Filter Pipettenspitze, graduert (steril)	Starlab
1000 µl XL TipOne® Filter Pipettenspitze, graduert (steril)	Starlab
200 µl TipOne® Pipettenspitze, Stack rack	Starlab
Pipette 5 ml, Graduierung 1/10 ml, steril	Greiner Bio-One
Pipette 10 ml, Graduierung 1/10 ml, steril	Greiner Bio-One
Pipette 25 ml, Graduierung 2/1 0ml, steril	Greiner Bio-One
0,2 ml 8er PCR Gefäßstreifen mit Deckeln	VWR
1,5 ml Safe-Seal Reagiergefäß	Sarstedt
2,0 ml Safe-Lock Tubes	Eppendorf
1,8 ml NUNC™ CryoTube™ Vials	Thermo Scientific
Titertube® Micro Test Tubes	BIO-RAD
Röhrchen 15 ml, konischer Boden, CELLSTAR®	Greiner Bio-One
Röhrchen 50 ml, konischer Boden, CELLSTAR®	Greiner Bio-One
VWR® Zellkulturschalen, TC-behandelt, ø 60 mm	VWR
VWR® 6 Well-Zellkulturplatten, flacher Boden, TC-behandelt, sterile	VWR
VWR® 24 Well-Zellkulturplatten, flacher Boden, TC-behandelt, sterile	VWR
NUNC™ EasYFlask 75 cm ² Zellkulturkolben mit Filter	Thermo Scientific

VWR® Zellkulturflaschen 182,5cm ² , TC-behandelt, belüftet	VWR
NUNC™ MaxiSorp 96-Well Platten für die Immunologie aus Polystyrol mit rundem Boden, nicht steril	Thermo Scientific
NUNC™ 96-Well MicroWell™ Platten aus Polystyrol mit konischem Boden, unbehandelt, nicht steril	Thermo Scientific
NUNC™ Mikrotiterplattendeckel	Thermo Scientific
50 ml Reagent Reservoir	Biotix
VWR® Zellsieb, Porengröße 70 µm	VWR
Injekt® 5ml	BBRAUN
BD Micro-Fine™ 0,5ml Insulinspritzen	BD Medical
Omnifix®-F, Feindosierungsspritzen 1mL	BBRAUN
Sterican® Insulinkanüle 26G x ½"/ ø 0,45 x 12 mm, braun	BBRAUN
Mikrohämatokrit-Kapillaren, nicht heparinisiert	BRAND GmbH

2.1.3 Reagenzien

Tabelle 5 Verwendete Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
UltraPure™ DNase/RNase freies Destilliertes Wasser	Invitrogen
DPBS (1X) -CaCl ₂ - MgCl ₂	Gibco
DMEM	Gibco
RPMI Medium 1640 (1X) + GlutaMax™-I + 25mM HEPES	Gibco
FBS Supreme	PAN-Biotech
β-Mercaptoethanol (100%)	Carl Roth
Geneticin™ selektives Antibiotikum (G-418 Sulfat) 50mg/ml	Gibco
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	Gibco
LPS	Biosynthan
Dextransulfat	Biosynthan

BD Pharm™ Lyse Lyse-Puffer	BD Biosciences
Trypan Blue Stain (0,4%)	Gibco
Essigsäure	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxide (DMSO), Hybri-Max™, sterile-filtered	Sigma-Aldrich
Isofluran	Piramal
PNPP Substrattabletten	Thermo Scientific
Pierce™ Diethanolamin-Substratpuffer, 5x	Thermo Scientific
Bovines Serumalbumin (BSA) Fraktion V, NZ-Origin, IgG frei	Carl Roth
Tween® 20, for synthesis	Sigma-Aldrich
Potassium Chloride (KCl) EMSURE®, for analysis	Merck
Sodium hydrogen carbonate (NaHCO ₃) EMSURE®, for analysis	Merck
di-Sodium hydrogen phosphate dodecanhydrate (Na ₂ HPO ₄ x12xH ₂ O) EMSURE®, for analysis	Merck
Potassium dihydrogen phosphate (KH ₂ PO ₄) EMSURE®, for analysis	Merck
di-Sodium carbonate (Na ₂ CO ₃) EMSURE®, for analysis	Merck
Sodium chloride (NaCl) EMSURE®, for analysis	Merck
Glycerin ROTIPURAN®, wasserfrei	Carl Roth
Ethanol 80% (V/V)	Otto Fischar
Bovines Serumalbumin (BSA) Fraktion V, NZ-Origin	Carl Roth
Natriumazid	Sigma-Aldrich
BD Cytifix™ Fixation Buffer	BD Biosciences
BD Perm/Wash™ Perm/Wash Buffer (10x solution)	BD Biosciences

2.1.4 Pufferlösungen

Tabelle 6 Verwendete Pufferlösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
FACS Puffer	500 ml DPBS +5 g BSA (1%) +500 µl Natriumazid
ELISA Coating Puffer	5,88 g NaHCO ₃ [70 mM] 3,18 g Na ₂ CO ₃ [30 mM] Mit dH ₂ O auf 1L auffüllen Ziel-pH: 9,6
ELISA Blocking Puffer	6 g BSA (3%) 100 µl Tween® 20 (0,05%) Mit DPBS auf 200 ml auffüllen
ELISA Verdünnungspuffer	2 g BSA (1%) 100 µl Tween® 20 (0,05%) Mit DPBS auf 200 ml auffüllen
ELISA Waschpuffer	40,03 g NaCl [137 mM] 1 g KH ₂ O ₄ [1,47 mM] 14,5 g Na ₂ HPO ₄ ·12xH ₂ O [8,1 mM] 1,01 g KCl [2,7 mM] 2,5 ml Tween® 20 (0,05%) Mit dH ₂ O auf 5 L auffüllen

2.1.5 Gebrauchsmedien

Tabelle 7 Verwendete Gebrauchsmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
RPMI 10%	500 ml RPMI Medium 1640 + 10% FBS Supreme
M1 Medium	500 ml RPMI Medium 1640 + 10% FBS Supreme + 28 µl β-Mercaptoethanol + 3,08 ml Geneticin
M2 Medium	500 ml RPMI Medium 1640 + 10% FBS Supreme + 28 µl β-Mercaptoethanol
Ground Medium	500 ml RPMI Medium 1640 + 10% FBS Supreme + 28 µl β-Mercaptoethanol (0,05%) + 5,5 ml PenStrep (1%)

Washing Medium	500 ml RPMI Medium 1640 + 2% FBS Supreme + 26 µl β-Mercaptoethanol (0,05%) + 5,1 ml PenStrep (1%)
LPS-Medium	98,9 ml Ground Medium + 1 ml LPS (100x) + 100 µl Dextransulfat (1000X)
Vero-Zell-Medium	DMEM+ 2% FBS+ 1% PenStrep
Einfriermedium	FBS+ 10% DMSO
TCGF 5% in M2 Medium	TCGF entstammt aus dem Überstand von Ratten Splenozyten, die mit Concanavalin A stimuliert wurden. Die Herstellung erfolgt entsprechend der Beschreibung nach Beeton und Chandy [91].

2.1.6 Zellen

Tabelle 8 Verwendete Zellen

Bezeichnung	Typ/Charakteristika/Herkunft	Nährmedium
SY-9287	B-Lymphoblasten, human, endogene Expression von HLA-A*0201, Robert Drillien, Universität von Straßbourg, Frankreich	RPMI 10%
JA2.1	Jurkat Zellen, T-Lymphoblasten, immortal, human, transfiziert mit HLA-A*0201, Matthias Theobald, Universität Mainz	M1 Medium
Vero	Nierenzellen von Grünen Meerkatzen, Expression von ACE2-Rezeptoren, CCL- 81	Vero-Zell-Medium

2.1.7 Verwendete Tiere

Tabelle 9 Verwendete Tiere

Mauslinie	Herkunft	Alter, Geschlecht	Verwendung
C57BL/6J	Janvier, Frankreich	8-10 Wochen, ♀	ELISA-Etablierung, Antikörperantwort
HHD/DR1 [92]	ZETT	8-10 Wochen, ♀, ♂	T-Zell-Antwort: Peptid-Screening Assay, Generierung von T-Zell- Kulturen
		7 Monate, ♀	LPS-Blasten
HHD [93]	ZETT	Variabel, ♀, ♂	T-Zell-Restimulation

Bei den für die Evaluation der Antikörperantwort verwendeten Tieren handelt es sich um C57BL/6 Mäuse, die von Janvier, Frankreich bezogen wurden.

Für die T-Zell-Antworten betreffenden Experimente wurde eine transgene Mauslinie (HHD/DR1) verwendet, die die Analyse humanisierter Immunantworten erlaubt, welche MHC Klasse I (HLA-A2.1) und MHC Klasse II (HLA-DR1) restringiert sind (vgl. **Abb. 6**). Diese Mäuse stammen aus der hauseigenen Zucht der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben, Düsseldorf (ZETT). Zur Verifizierung des gewünschten Genotyps erfolgte vor Verwendung der HHD/DR1 Mäuse eine Polymerasekettenreaktion (PCR)-Analyse aus Ohrstanzen im Alter von ca. drei Wochen.

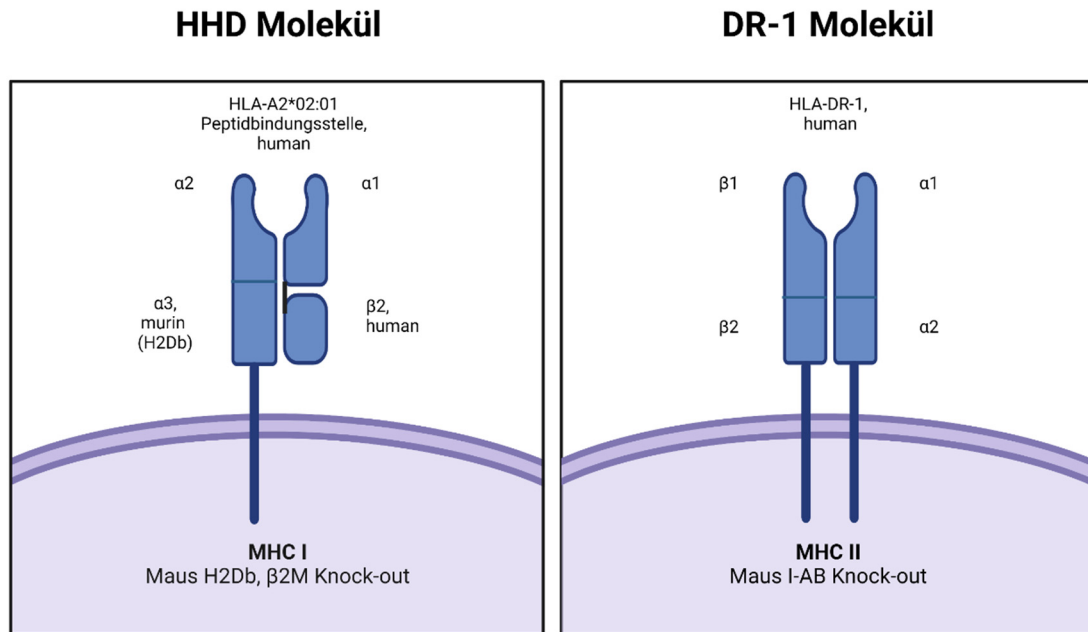


Abb. 6 Transgenes HHD/DR1 Mausmodell. Schematische Abbildung der MHC I und MHC II Moleküle auf Zellen transgener HHD/DR1 Mäuse. Die Mäuse haben einen C57BL/6 Hintergrund und exprimieren statt des MHC Klasse I Moleküls der Maus (H-2Db) ein chimeres MHC Klasse I Molekül (HHD), dessen α1 und α2 Domäne denen des humanen HLA-A*0201 Moleküls entsprechen. Die transmembrane / zytoplasmatische α3 Domäne entspricht dem H-2Db der Maus. Das humane β2-Mikroglobulin ist über eine 15 Aminosäuren lange Peptidbrücke kovalent an das NH₂-Ende der schweren Kette gebunden. Ein murines β2 Mikroglobulin ist nicht mehr vorhanden, sodass auch das H-2Kb Molekül der Maus nicht mehr stabil an der Oberfläche exprimiert wird. Außerdem tragen die Zellen ein humanes MHC Klasse II Molekül, das dem Haplotyp HLA-DR1 entspricht, und weisen einen *Knock-Out* für das murine MHC Klasse II Molekül I-AB auf. Abbildung in Anlehnung an Pajot *et al.* und Pascolo *et al.* [92, 93]. Erstellt mit BioRender.

Bezüglich der tierexperimentellen Untersuchungen liegt eine Genehmigung des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) für das Impfprojekt an Mäusen mit dem Aktenzeichen AZ 81-02.04.2020.A460 vor (Antragsteller: Prof. Dr. Ingo Drexler).

Für tierexperimentelle Untersuchungen, die mit einer Organentnahme einhergehen, wurde von der ZETT die Projektnummer O119/11 vergeben (Antragsteller: Prof. Dr. Ingo Drexler).

Das *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA)-Zertifikat über die erfolgreiche Teilnahme am Tierversuchskunde- Kurs liegt vor (2021), ebenso wie eine durch die Tierschutzbeauftragte der ZETT (Fr. Dr. Engelhardt) abgenommene Einweisung in Eingriffe am Tier im Sinne einer zwanzigmaligen Durchführung erforderlicher Eingriffe unter Betreuung und Anweisung durch fachkundiges Personal.

2.1.8 Viren

Tabelle 10 zeigt den in dieser Arbeit verwendeten MVA-Stamm und die von ihm abgeleiteten rekombinanten MVA-Vektoren. Die Generierung von rekombinantem, SARS-CoV-2 S bzw. N produzierendem MVA erfolgte durch homologe Rekombination in die Deletion VI des originären MVA-F6 Stammes mittels *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC)-Technologie. In beiden MVA-Vektoren steht die Expression der Fremdgene unter Kontrolle des synthetisch modifizierten „*Early/Late*“ MVA-Promotors PH5 [89]. Die Codon-Optimierung der S-Sequenz erfolgte neben der verbesserten eukaryotischen Transkription und ribosomalen Translation aufgrund einer in der Original S-Sequenz enthaltenen MVA-spezifischen Stopp-Sequenz, die eine Vollängen-Genexpression verhindert [90]. Die codonoptimierte Variante des S-Gens wurde erstellt durch Johannes Ptok (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Institut für Virologie, AG Schaal). Alle Viren wurden aliquotiert bei -80°C gelagert.

Tabelle 10 Verwendeter MVA-Stamm und abgeleitete rekombinante MVA-Vektoren

Bezeichnung	Eigenschaften	Herkunft
MVA-F6	Original MVA Stamm (Klon F6)	Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen, Ludwig-Maximilians-Universität, München
MVA-WT	MVA, das auf Basis des Original MVA-F6 Stammes mittels BAC System (<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>) generiert wurde. WT= „Wildtyp“.	
MVA-Sc	Rekombinantes, SARS-CoV-2 Spike-Protein produzierendes MVA. Das Spike-Protein entspricht der Wuhan-Hu-1 Variante, die DNA-Sequenz ist codon-optimiert (Sc).	Generiert von Ronny Tao
MVA-N	Rekombinantes, SARS-CoV-2 Nukleokapsid-Protein produzierendes MVA. Das Nukleokapsid-Protein entspricht der Wuhan-Hu-1 Variante.	

Die in dieser Arbeit verwendeten SARS-CoV-2 Virusisolate „Wildtyp“ (D614G), „Alpha“, „Beta“, „Delta“ und „Omikron“ wurden aus nasopharyngealen Abstrichen durch Inokulation von Vero-Zellen gewonnen [94]. Mittels „*Endpoint-Dilution-Assay*“ auf Vero-Zellen erfolgte eine Virus-Titerbestimmung [94]. Die Herstellung der Virusisolate erfolgte durch Philipp Niklas Ostermann (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Institut für Virologie, AG Schaal).

2.1.9 Antikörper

Tabelle 11 Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Hersteller, Katalognummer/Klon	Eigenschaften, Handhabung
SARS-CoV-2 Spike Antikörper	antibodies-online.com, ABIN6972682/ Klon AM002414 (414-2)	Maus, monoklonal, unkonjugiert Stock Konzentration: 1 mg/ml, Lagerung aliquotiert bei -20°C
SARS-CoV-2 Nukleokapsid Antikörper	antibodies-online.com, ABIN6952435 / Klon 1C7	Maus, monoklonal, unkonjugiert Stock Konzentration: 1 mg/ml, Lagerung aliquotiert bei -20°C
AlkalinePhosphatase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG+IgM (H+L)	JacksonImmunoResearch Laboratories, INC., 115-055-068	Ziege, polyklonal, konjugiert mit Alkalischer Phosphatase Stock-Konzentration: 0,3 mg/ml (rehydriert mit 1 ml dH ₂ O, versetzt mit 1 ml Glycerol), Lagerung aliquotiert bei -20°C
BD Pharmingen™ Purified Hamster Anti-Mouse CD 3e	BD Biosciences, 553238/ Klon 500A2	Syrischer Hamster, monoklonal, unkonjugiert Stock-Konzentration: 0,5 mg/ml Lagerung bei 4°C

2.1.10 Antigene

Tabelle 12 Verwendete Antigene

Bezeichnung	Hersteller, Katalognummer	Eigenschaften, Handhabung
SARS-CoV-2 Nucleocapsid protein, His Tag	Acro Biosystems, NUN-C5227	Stock-Konzentration: 400 µg/ml; Lagerung aliquotiert bei -80°C
SARS-CoV-2 S protein, His Tag, Super stable trimer (MALS verified)	Acro Biosystems, SPN-C52H7	Stock-Konzentration: 2000 µg/ml; Lagerung aliquotiert bei -80°C

2.1.11 Peptide

Alle Peptide wurden von der Peptides & Elephants GmbH bezogen. Die Stockkonzentration beträgt 1 mg/ml. Die Peptide wurden aliquotiert bei -80°C gelagert.

Tabelle 13 Verwendete Peptide

Bezeichnung	Aminosäuren	Sequenz	Spezifität	Protein
Nuc 221	221-230	LLLLDRLNQL	HLA-A2.1	N
Nuc 262	262-270	RTATKAYNV	HLA-A2.1	N
Nuc 130	130-138	IIWVATEGA	HLA-A2.1	N
Nuc 330	330-339	WLTYTGAIKL	HLA-A2.1	N
Nuc 112	112-121	YLGTGPEAGL	HLA-A2.1	N
Nuc 218	218-227	ALALLLLDRL	HLA-A2.1	N
Nuc 219	219-227	LALLLLDRL	HLA-A2.1	N
Nuc 351	351-359	ILLNKHIDA	HLA-A2.1	N
Nuc 222	222-230	LLLDRLNQL	HLA-A2.1	N
Nuc 316	316-324	GMSRIGMEV	HLA-A2.1	N
S 995	995-1004	RLITGRLQSL	HLA-A2.1	S
S 202	202-210	KIYSKHTPI	HLA-A2.1	S
S 857	857-865	GLTVLPPLL	HLA-A2.1	S
S 821	821-829	LLFNKVTLA	HLA-A2.1	S

S 1060	1060-1068	VVFLHVTYV	HLA-A2.1	S
S 109	109-117	TLDSKTQSL	HLA-A2.1	S
S 915	915-923	VLYENQKLI	HLA-A2.1	S
S 1047	1047-1056	YHLMSFPQSA	HLA-A2.1	S
S 417	417-425	KIADYNYKL	HLA-A2.1	S
S 976	976-984	VLNDILSRL	HLA-A2.1	S
S 269	269-277	YLQPRTFLL	HLA-A2.1	S
S 386	386-395	KLNDLCFTNV	HLA-A2.1	S
S 424	424-433	KLPDDFTGCV	HLA-A2.1	S
S 515	515-524	FELLHAPATV	HLA-A2.1	S
S 691	691-699	SIIAYTMSL	HLA-A2.1	S
S 958	958-966	ALNTLVKQL	HLA-A2.1	S
S 983	983-991	RLDKVEAEV	HLA-A2.1	S
S 996	996-1004	LITGRLQSL	HLA-A2.1	S
S 1000	1000-1008	RLQSLQTYV	HLA-A2.1	S
S 1048	1048-1056	HLMSFPQSA	HLA-A2.1	S
S 1185	1185-1193	RLNEVAKNL	HLA-A2.1	S
S 1192	1192-1200	NLNESLIDL	HLA-A2.1	S
S 1220	1220-1228	FIAGLIAIV	HLA-A2.1	S
VV B22R	79-87	CLTEYILWV	HLA-A2.1	MVA
VV H3L	184-192	SLSAYIIRV	HLA-A2.1	MVA
VV I1L	211-219	RLYDYFTRV	HLA-A2.1	MVA
VV A6L	6-14	VLYDEFVT	HLA-A2.1	MVA
Flu-M1	58-66	GILGFVFTL	HLA-A2.1	Influenza
Nuc 127	127-141	KDGIWVATEGALNT	HLA-DR1	N
Nuc 328	328-342	GTWLTYTGAIKLDDK	HLA-DR1	N
Nuc 107	107-121	RWYFYLLGTGPEAGL	HLA-DR1	N

Nuc 50	50-64	ASWFTALTQHGKEDL	HLA-DR1	N
Nuc 311	311-325	ASAFFGMSRIGMEVT	HLA-DR1	N
Nuc 84	84-98	IGYYRRATRRIRGGD	HLA-DR1	N
Nuc 221	221-235	LLLLDRLNQLESKMS	HLA-DR1	N
Nuc 326	326-340	PSGTWLTYTGAIKLD	HLA-DR1	N
Nuc 351	351-365	ILLNKHIDAYKTFPP	HLA-DR1	N
Nuc 301	301-315	WPQIAQFAPSASAFF	HLA-DR1	N
Nuc 346	346-360	FKDQVILLNKHIDAY	HLA-DR1	N
S 235	235-249	ITRFQTLALHRSYL	HLA-DR1	S
S 855	855-869	FNGLTVLPPLTDEM	HLA-DR1	S
S 166	166-180	CTFEYVSQPFLMDLE	HLA-DR1	S
S 196	196-210	NIDGYFKIYSKHTPI	HLA-DR1	S
S 801	801-815	NFSQILPDPSKPSKR	HLA-DR1	S
S 211	211-225	NLVRDLPQGFSALEP	HLA-DR1	S
S 346	346-360	RFASVYAWNRRKRISN	HLA-DR1	S
S 176	176-190	LMDLEGKQGNFKNLR	HLA-DR1	S
S 161	161-175	SSANNCTFEYVSQPF	HLA-DR1	S
VV D6R	157-171	KIPFLLLSGSPITNT	HLA-DR1	MVA
VV A10L	293-307	SMRYQSLIPRLVEFF	HLA-DR1	MVA
VV I6L	338-352	IYTYRIIKSSFPVPT	HLA-DR1	MVA
VV D1R	401-421	QTANVVFRYMSSEPIIF GESS	HLA-DR1	MVA
VV A24R	166-186	WPKFRVVKPNSFTF	HLA-DR1	MVA
Flu-M1	17-30	SGPLKAEIAQRLED	HLA-DR1	Influenza
Flu-NP	302-314	DPFRLLQNSQVFS	HLA-DR1	Influenza
Flu-HA	306-318	PKYVKQNTLKLAT	HLA-DR1	Influenza

2.1.12 Fluorochrome

Tabelle 14 Verwendete Fluorochrome

Bezeichnung, Klon	Hersteller, Katalognummer
Anti-Mo CD8aPB (eFluor 450), Klon 53-6.7	Invitrogen, 48-0081-82
Anti-Mo CD4 PB (eFluor 450), Klon GK1.5	Invitrogen, 48-0041-82
Anti-Mo CD16/CD32, Klon 93	Invitrogen, 14-0161-85
FITC Rat Anti-Mouse IFN- γ , Klon XMG1.2	BD Pharmingen, 554411
Anti-CD62L (L-Selectin) Pe-Cy7, Klon MEL-14	Invitrogen, 25-0621-82
Anti-IFN γ -APC, Klon XMG1.2	Invitrogen, 17-7311-82
Fixierbarer Vitalitätsfarbstoff eFluor™ 660 (APC)	Invitrogen, 65-0864-14
Fixierbarer Vitalitätsfarbstoff eFluor™ 506 (Amcyan)	Invitrogen, 65-0866-18

2.1.13 Software/ Datenverarbeitung/ Statistik

Tabelle 15 Verwendete Software

Bezeichnung	Firma	Verwendung
Microsoft 365 (Word, Excel)	Microsoft	Verschriftlichung der Dissertation, Zwischenspeicherung von Daten
EndNote™20	Clarivate Analytics	Literaturverwaltung
FlowJo™ (Version 9.4.10)	BD Biosciences	Auswertung der FACS Daten
GraphPad Prism Version 9.0.0	Graphpad	Verarbeitung der experimentellen Daten, bildliche Darstellung, statistische Auswertung
BioRender	BioRender	Erstellen von Abbildungen

2.2 Methoden

2.2.1 Mausimmunisierung

Zur Immunisierung der Mäuse mit MVA wurden die hier verwendeten Viren zunächst im Wasserbad zügig aufgetaut, mittels Vortex-Mischer und einminütiger Ultraschall-Behandlung homogenisiert und unter sterilen Bedingungen, der gewünschten Viruskonzentration von 10^8 Infektiösen Einheiten (IU) entsprechend, mit *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) verdünnt. Die Virusverdünnungen wurden in Kryovials auf Eis folgender Berechnung nach vorbereitet:

$$\frac{\text{Anzahl zu impfender Mäuse} \times 10^8 \text{ IU}}{\text{Virusstockkonzentration} \left(\frac{\text{IU}}{\text{ml}} \right)} = \text{benötigtes Volumen des Virusstocks}$$

Jede Maus wurde mit einem Volumen von 200 µl geimpft. Dementsprechend erfolgte die Verdünnung des Virusstocks mit folgendem Volumen PBS:

$$(n(\text{Mäuse}) \times 200 \text{ µl}) - \text{Volumen des Virusstocks} = \text{benötigtes Volumen PBS}$$

Unmittelbar vor Impfung der Mäuse wurde die Virusverdünnung nochmals mittels Vortex-Mischer durchmischt und dann mittels 0,5 ml Insulinspritzen aufgezogen. Die Immunisierung der Mäuse erfolgte auf intraperitonealem Weg.

Im Rahmen der Antikörper- und der T-Zell-Experimente wurden unterschiedliche Impfschemata angewandt (siehe **Abb. 7**).

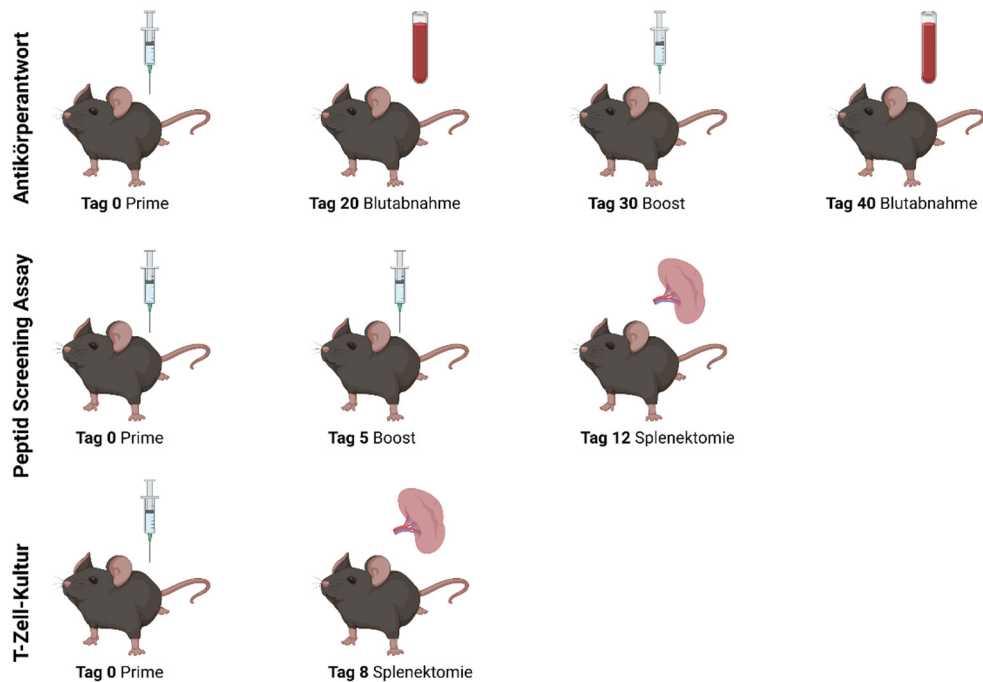


Abb. 7 Impfschemata zur Untersuchung der Antikörper- und T-Zell-Antwort im Mausmodell. Zur Untersuchung der Antikörper-Antwort wurden die Mäuse in einem „*Prime-Boost*“ Schema geimpft. Die *Prime*-Impfung erfolgte an Tag 0, die *Booster*-Impfung an Tag 30. An Tag 20 und 40 erfolgte jeweils eine Blutabnahme zur Messung der Antikörperantwort nach *Prime*- und nach *Booster*-Impfung. Im Rahmen des Peptid-Screening Assays wurde ein „*Short Prime-Boost*“- Schema angewandt. Hier erhielten die Mäuse die *Prime*-Impfung an Tag 0 und die *Booster*-Impfung an Tag 5, der Assay erfolgte an Tag 12. Für die Generierung von T-Zell-Kulturen wurden die Mäuse nur einmalig geimpft und an Tag 8 splenektomiert. Abbildung erstellt mit BioRender.

2.2.2 Blutabnahme und Serumgewinnung

Für die Messung der Antikörperantwort erfolgte jeweils eine Blutabnahme an Tag 20 nach *Prime*- und eine nach *Booster*-Impfung an Tag 40 (siehe **Abb. 7**). Die Blutabnahme erfolgte über den Retroorbitalsinus der Maus mittels Mikro-Hämatokrit-Kapillaren unter Isofluran-Narkose.

Das entnommene Blut wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Innerhalb einer Wartezeit von einer Stunde bei Raumtemperatur kommt es zur Gerinnung des Blutes, sodass durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 2000 g, 4°C das Serum separiert werden konnte. Anschließend wurde das Serum vorsichtig entnommen, in Einzelgebrauchsmengen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.3 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Als sehr sensitives und einfaches Verfahren ermöglicht der ELISA den Nachweis von spezifischen Antigenen oder Antikörpern in einer Probe. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete indirekte ELISA (vgl. **Abb. 8**) diente dem semiquantitativen Nachweis spezifischer SARS-CoV-2 S- bzw. N-Antikörper im Mausserum.

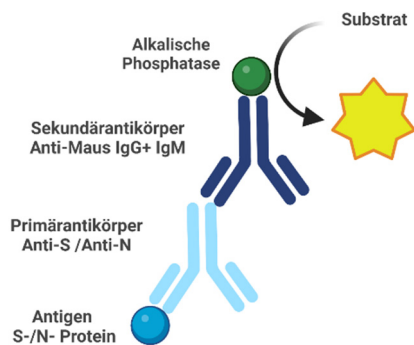


Abb. 8 Prinzip des indirekten ELISAs zum Nachweis SARS-CoV-2 S-/N- spezifischer Antikörper im Mausserum. Das Spike (S) - bzw. Nukleokapsid (N) -Protein ist an die Plattenoberfläche gebunden. Falls spezifische Antikörper im Mausserum vorhanden sind, binden diese an ihr Antigen. Diese gebundenen Antikörper können wiederum durch einen Anti-Maus-IgG/IgM Sekundärantikörper gebunden werden, an den eine Alkalische Phosphatase konjugiert ist. Durch einen enzymatischen Umsatz eines hinzugefügten chromogenen Substrates durch die Alkalische Phosphatase kann die Bindung SARS-CoV-2 S-/N- spezifischer Antikörper indirekt nachgewiesen werden. Abbildung erstellt mit BioRender.

Beim ELISA macht man sich die proteinbindenden Eigenschaften bestimmter Materialien, wie zum Beispiel Polystyrol oder der hier verwendeten modifizierten Polymer-Oberflächen in 96 Well-Mikrotiterplatten, zunutze. Im ersten Schritt erfolgt die Adsorption eines definierten Ziel-Antigens (S-/N-Protein) an die entsprechende Oberfläche in den Wells („Coating“) [95]. Dies geschieht passiv über hydrophobe oder hydrophile Interaktionen zwischen der Plattenoberfläche und den Proteinseitenketten [95]. Nach mehrmaligem Waschen der Platten mit Waschpuffer, wird die nicht mit Antigen gesättigte Oberfläche des Wells mit einem für die Immunreaktion irrelevantem Protein, in diesem Fall Bovinem Serum Albumin (BSA), beladen, um eine unspezifische Bindung von Serumproteinen bzw. Antikörpern an die Plattenoberfläche und dementsprechende Hintergrundsignale zu reduzieren („Blocking“) [95]. Nach erneutem Waschen der Platte, wird die Platte mit Serum inkubiert, sodass gegebenenfalls vorhandene spezifische Serumantikörper an das Antigen auf der Plattenoberfläche binden können. Ein weiterer Waschschrift dient dazu, alle ungebundenen Antikörper aus dem Well zu entfernen, sodass diese in folgenden Schritten den Nachweis gebundener Antikörper nicht stören können. Dann wird ein

Sekundärantikörper hinzugefügt, der speziesspezifisch und gegen den Fc-Teil der Primärantikörper aus dem Serum gerichtet ist und diese auf der Platte bindet (hier Anti-Maus IgG+IgM) (vgl. **Abb. 8**). Überschüssige, ungebundene Sekundärantikörper werden in weiteren Waschschritten wiederum entfernt. An den Sekundärantikörper ist ein Enzym, in diesem Fall die alkalische Phosphatase, konjugiert, die in der Lage ist, ein im letzten Schritt hinzugefügtes Substrat (p-Nitrophenylphosphat, pNPP) umzusetzen, was zu einer Farbreaktion führt. Die Farbtintensität ist dabei proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern im Well und photometrisch über die optische Dichte (OD) messbar. Über die Definition eines *Cutoffs*, kann dann die Menge an Antikörpern im Serum semiquantitativ als Endpunkttiter bestimmt werden. Der Endpunkttiter entspricht der letzten Serumverdünnung, in der ein Substratumsatz messbar ist, das heißt in der noch spezifische Antikörper nachweisbar sind.

2.2.4 Etablierung eines laborinternen Anti-S /Anti-N-Antikörper ELISAs

Zur ELISA-Etablierung wurde bezüglich der genutzten Puffer, Volumina der zugegebenen Komponenten und der Inkubationszeiten zunächst nach einem schon vorher im Labor genutzten Protokoll (siehe **Tabelle 16**) verfahren.

Tabelle 16 ELISA Protokoll. Dargestellt sind die durchgeführten Schritte im Rahmen des Anti-S und Anti-N-Antikörper ELISAs.

Schritt	Puffer/Komponenten	Volumen	Temperatur	Inkubationszeit
1. Coating	Antigen in <i>Coating</i> Puffer	100 µl	4°C	Über Nacht
2. Waschen	Waschpuffer	3x		
3. Blocking	<i>Blocking</i> Puffer	200 µl		1 Stunde
4. Waschen	Waschpuffer	3x		
5. Primär-antikörper	Serum in Verdünnungspuffer	50 µl	Raum-Temperatur	2 Stunden
6. Waschen	Waschpuffer	4x		
7. Sekundär-antikörper	Anti-Mouse IgG+IgM in Verdünnungspuffer	50 µl		1 Stunde im Dunkeln
8. Waschen	Waschpuffer	4x		

9. Substrat	2 pNPP Tabletten in 8 100 µl ml dH ₂ O+ 2 ml Diethanolamin- Substratpuffer	30 Minuten im Dunkeln
--------------------	---	--------------------------

10. Messung Messung der optischen Dichte bei 405 nm im Photometer

Im ersten Versuch wurde die Platte mit Antigen (SARS-CoV-2 S- bzw. N- Protein) in einer Konzentration von 1 µg/ml *gecoatet*. Als Primärantikörper wurde ein für das jeweilige Antigen spezifischer monoklonaler Antikörper (SARS-CoV-2 S-/N- Antikörper) verwendet und in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben. Der Sekundärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 genutzt. Dieser erste Schritt diente der Sicherstellung der Funktionsfähigkeit aller Komponenten im Testsystem und der Auswahl einer geeigneten Verdünnung des monoklonalen Antikörpers als spätere Positivkontrolle.

Zur Etablierung der ELISAs wurden im weiteren Verlauf Mausseren verwendet. Die Mäuse wurden dazu, wie in **Abb. 7** beschrieben, mit MVA-Sc, MVA-N, MVA-WT und PBS geimpft, ihnen wurde Blut entnommen und daraus Serum gewonnen. Das Serum wurde unmittelbar vor Verwendung bei 56°C für 30 Minuten hitzeinaktiviert.

Die Konzentrationen von erforderlichem Antigen, Mausserum und Sekundärantikörper wurden über eine „Schachbrett-Titration“ [96] hinsichtlich einer möglichst hohen Sensitivität bei gleichzeitig hoher Spezifität und einem adäquatem Materialverbrauch optimiert. Durch das oben genannte Titrationsprinzip werden die verschiedenen Verdünnungen jeweils zweier Testkomponenten auf einer Mikrotiterplatte in sämtlichen Kombinationen miteinander getestet [96].

In der ersten Phase der ELISA-Etablierung erfolgte eine Testung verschiedener Konzentrationen des jeweiligen Antigens, das zum *Coating* der Platten genutzt wurde. Dazu wurden verschiedene Verdünnungen des Antigens gegen verschiedene Serumverdünnungen titriert (siehe **Abb. 9**). Die Verdünnungen der beiden Komponenten wurden dabei auf separaten Mikrotiterplatten vorbereitet. Dieser Versuch wurde sowohl mit Serum MVA-Sc (S-ELISA) bzw. MVA-N (N-ELISA) geimpfter Mäuse durchgeführt, als auch mit Serum MVA-WT und DPBS geimpfter Mäuse. Die Testung von Seren ohne spezifische Antikörper diente dazu, auch das Ausmaß unspezifischer Hintergrundaktivität in verschiedenen Serumverdünnungen im Zusammenhang verschiedener Antigenkonzentrationen erfassen zu können.

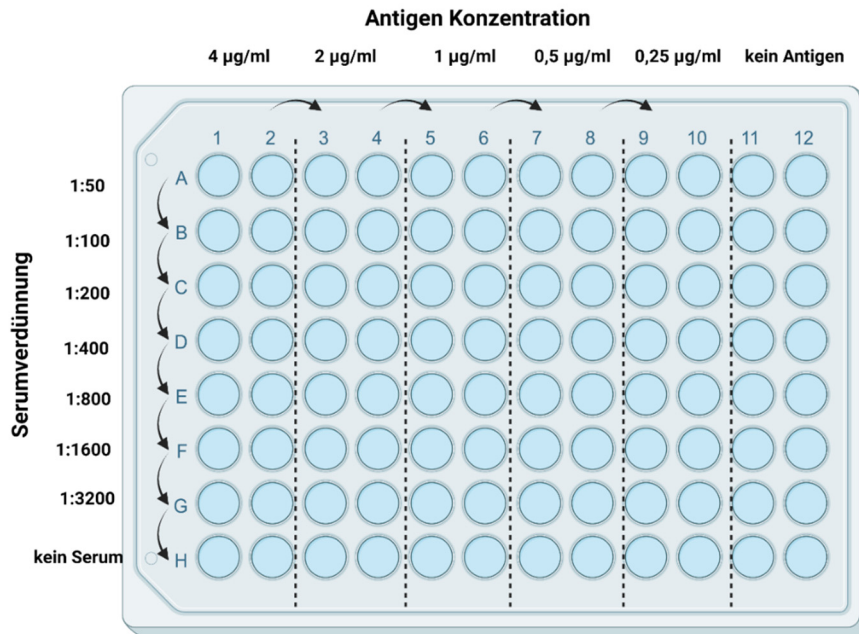


Abb. 9 Schachbrettitration von Antigen und Serum. Im ersten Schritt der ELISA-Etablierung wurden auf einer Mikrotiterplatte unterschiedliche Konzentrationen an Antigen gegen unterschiedliche Serumverdünnungen, nach dem hier abgebildeten Schema, gegeneinander titriert. Die Verdünnung des Sekundärantikörpers wurde dabei konstant gehalten. Jede Kombination wurde in Doppelbestimmung getestet. Die Testung von Serumverdünnungen ohne Antigen „kein Antigen“ diente der Erfassung des Ausmaßes unspezifischer Bindung von Serumbestandteilen an die Platte, unabhängig vom verwendeten Antigen, in unterschiedlichen Serumverdünnungen. Die Testung von Antigen in unterschiedlichen Konzentrationen ohne Serum („kein Serum“) diente der Messung der unspezifischen Bindung von Sekundärantikörper an die Platte in Abhängigkeit unterschiedlicher Antigenkonzentrationen. Das abgebildete Titrationsschema [96] wurde, teilweise in von der Abbildung abweichenden Serumverdünnungen, sowohl mit Serum MVA-Sc bzw. MVA-N immunisierter Mäuse durchgeführt, als auch mit Serum MVA-WT bzw. PBS geimpfter Mäuse. MVA= *Modified Vaccinia Virus Ankara*, Sc= Spike codonoptimiert, N= Nukleokapsid, WT= Wildtyp. PBS= *Phosphate-Buffered Saline*, µg= Mikrogramm, ml= Milliliter. Abbildung erstellt mit BioRender.

In der zweiten Phase der ELISA-Etablierung wurde die vorher definierte optimale Antigenkonzentration in allen Wells verwendet. Über eine Titration des Sekundärantikörpers gegen verschiedene Serumverdünnungen sollte nun die Konzentration dieser Testkomponenten weiter optimiert werden (vgl. **Abb. 10**). Ziel war es auch hier, ein hohes Maß an Sensitivität zu erreichen, während unspezifische Hintergrundsignale minimiert werden.

Getestet wurde nach diesem Schema ebenfalls MVA-S (S-ELISA) bzw. MVA-N Serum (N-ELISA) und Serum MVA-WT und DPBS geimpfter Mäuse.

Außerdem konnte so die endgültige Start- Serumverdünnung festgelegt werden, mit der eine Endpunkt titration möglich ist. Endpunkt titration bedeutet, dass das Mausserum so weit verdünnt wird, dass über einen vorher definierten Grenzwert ein Titer bestimmt

werden kann, der gerade noch einen Rest an Antikörper-Aktivität aufweist. Über die Höhe der Verdünnung kann so indirekt eine Aussage über die Antikörpermenge im Serum getroffen werden.

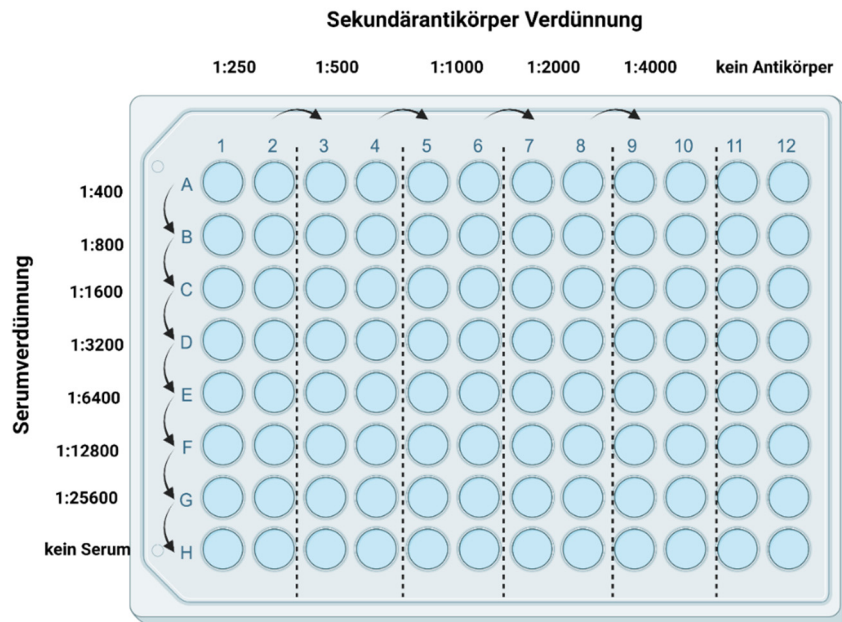


Abb. 10 Schachbrett-Titration von Sekundärantikörper und Serum. Im zweiten Schritt der ELISA-Etablierung wurden alle Wells der Mikrotiterplatte mit der in Schritt eins definierten optimalen Antigenkonzentration *gecoated*, während unterschiedliche Konzentrationen von Sekundärantikörper gegen unterschiedliche Serumverdünnungen, nach dem hier abgebildetem Schema, titriert wurden. Jede Kombination wurde in Doppelbestimmung getestet. Die Testung von Serumverdünnungen ohne Sekundärantikörper „kein Antikörper“ diente der Erfassung des Ausmaßes unspezifischer Hintergrundsignale in verschiedenen Serumverdünnungen ohne einen, durch das Enzym katalysierten, Substratumsatz. Die Testung von Sekundärantikörper in unterschiedlichen Konzentrationen ohne Serum („kein Serum“) diente der Erfassung des Ausmaßes unspezifischer Bindungen des Sekundärantikörpers an die Plattenoberfläche in unterschiedlichen Antikörper-Konzentrationen. Die abgebildete Titration [96] wurde, teilweise in von der Abbildung abweichenden Serumverdünnungen, sowohl mit Serum MVA-Sc bzw. MVA-N immunisierter Mäuse durchgeführt, als auch mit Serum MVA-WT bzw. PBS geimpfter Mäuse. MVA= Modified Vaccinia Virus Ankara, Sc= Spike codonoptimiert, N= Nukleokapsid, WT= Wildtyp. PBS= Phosphate-Buffered Saline Abbildung erstellt mit BioRender.

2.2.5 Testung der Mausseren im S- bzw. N-ELISA

Nach Optimierung der Konzentration der Testkomponenten wurde jeweils ein finales Protokoll für den S- und den N- ELISA erstellt, das hinsichtlich des Testablaufes Tabelle 16 entspricht.

Für das *Coating* wurde eine Antigenkonzentration von jeweils 0,5 µg/ml S- bzw. N-Protein verwendet. Dazu wurde das Antigen in einem Verhältnis von 1:4000 (S-Protein) bzw. 1:800 (N-Protein) mit *Coating* Puffer in einem Röhrchen verdünnt und aus einem Reagenzien-Reservoir mittels Multikanal-Pipette auf die Mikrotiterplatte überführt.

Alle Mausseren wurden unmittelbar vor Verwendung bei 56°C für 30 Minuten hitzeinaktiviert. Die Serumverdünnungen wurden auf einer separaten Mikrotiterplatte vorbereitet. Dazu wurde eine Startverdünnung des Serums von 1:800 (S-ELISA) bzw. 1:50 (N-ELISA) in Verdünnungspuffer hergestellt. Davon wurden 200 µl in die erste Reihe der Mikrotiterplatte pipettiert. In die restlichen Wells der Mikrotiterplatte wurden jeweils 100 µl Verdünnungspuffer vorgelegt. Von der ersten Reihe wurden jeweils 100 µl in die zweite Reihe pipettiert und mit dem vorgelegten Verdünnungspuffer gemischt. Nach Resuspension wurden wiederum 100 µl aus der zweiten Reihe in die dritte Reihe überführt und erneut mit dem vorgelegten Verdünnungspuffer gemischt. Nach diesem Prinzip wurde bis zur letzten Reihe der Mikrotiterplatte verfahren, die 100 µl der letzten Reihe wurden verworfen. Anschließend wurde von jeder Serumverdünnung 50 µl auf die Testplatte überführt. Jedes Mausserum wurde in Doppelbestimmung angesetzt.

Der Sekundärantikörper wurde in einem Röhrchen in einem Verhältnis von 1:2000 mit Verdünnungspuffer verdünnt und ebenfalls aus einem Reagenzien-Reservoir mittels Multikanal-Pipette auf die Mikrotiterplatte überführt.

Zur späteren Auswertung der gemessenen Daten wurde über eine Messung der Seren MVA-WT geimpfter Mäuse ein OD-Grenzwert definiert, über dem eine Messung als positiv gewertet wird. Dazu wurden alle MVA-WT Seren nach dem hier beschriebenen Protokoll jeweils im S-Antikörper-ELISA und im N-Antikörper-ELISA getestet. Zur Berechnung eines Grenzwertes wurde der Mittelwert der OD's der Serumverdünnungen gebildet, die als Startverdünnungen im ELISA verwendet werden sollen (1:800 im S-ELISA, 1:50 im N-ELISA). Anschließend wurde die entsprechende Standardabweichung berechnet. Der Grenzwert wurde dann definiert über:

$$OD \text{ Grenzwert} = OD \text{ Mittelwert} + 3 \times \text{Standardabweichung}$$

Zur Bestimmung des Endpunkttiters wurde der Mittelwert der OD's der Doppeltestung jedes Mausserums berechnet. Als Endpunkttiter wurde die letzten Serumverdünnung definiert, deren OD-Mittelwert gerade noch über dem Grenzwert liegt.

2.2.6 Neutralisationstest

Um nicht nur eine Aussage über die Quantität, sondern auch die Qualität der gebildeten Antikörper treffen zu können, wurde im Biologische Sicherheitsstufe 3 (S3)-Labor ein Neutralisationstest mit den oben genannten SARS-CoV-2 Virusisolaten durchgeführt. Die Zellkultivierung und Testvorbereitung erfolgte durch Philipp Niklas

Ostermann und Yvonne Dickschen (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Institut für Virologie, AG Schaal). Die Testdurchführung und die Auswertung zusätzlich in meinem Beisein.

Zunächst wurden die zu testenden Serumproben bei 56°C für 30 Minuten hitzeinaktiviert. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe des Serums in Vero-Zell-Medium von 1:10 bis 1:5120 auf einer Mikrotiterplatte mit flachem Boden im Doppelansatz hergestellt. Das Volumen an Serumverdünnung betrug 50 µl pro Well. Negativkontrollen (Serum MVA-WT und MVA-N geimpfter Mäuse) wurden als Einzeltestung in gleicher Verdünnungsreihe mitgeführt. Als Positivkontrolle dienten bereits getestete Patientenseren mit bekanntem hohen bzw. niedrigem Titer, die ebenfalls in Einzeltestung mitgeführt wurden.

Anschließend wurde für die verschiedenen SARS-CoV-2 Varianten „Wildtyp“, „Alpha“, „Beta“, „Delta“ und „Omikron“ die Menge an Virus berechnet, die es für eine 50% *Tissue culture infectious dose* (TCID₅₀) von 2×10^5 benötigt. Die jeweiligen Virustiter wurden vorher mittels Titration auf Vero-Zellen über den zytopathischen Effekt (CPE) definiert. Im Neutralisationstest wurde Virus mit einer TCID₅₀ von 2×10^5 in einer Verdünnung von 1:50 mit Vero-Zell-Medium verwendet. Von der Virusverdünnungen wurden je 50 µl in die Wells mit den Serumverdünnungen pipettiert. Die Inkubation von Serumverdünnung und Virus erfolgte für 1 h bei 37°C, 5% CO₂.

Zuletzt erfolgte die Zugabe von 100 µl Vero-Zellen (70000 Zellen/ml) und die Platten wurden 4 (SARS-CoV-2 WT) bzw. 7 Tage (SARS-CoV-2 VOC's) bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert.

Als zusätzliche Kontrolle wurde außerdem eine „Zellwachstums-Kontrolle“ (nur Zellen) mitgeführt, um die Vitalität und ein reguläres Wachstum der verwendeten Zellen sicherzustellen. Eine „Viruskontrolle“ (nur Zellen und Virus) diente der Kontrolle der Fähigkeit verwendeter Viren, einen zytopathischen Effekt zu verursachen. Für die Viruskontrolle wurde Virus einer TCID₅₀ von 2×10^5 in einer Verdünnung von 1:10 genutzt.

Die Auswertung des Testes erfolgte mikroskopisch über den CPE. Der Neutralisationstiter ist definiert, als die letzte Serumverdünnung, bei der kein CPE sichtbar ist.

2.2.7 Zellkultivierung, Zellzählung und Kryokonservierung

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Zellen (siehe **Tabelle 8**) handelt es sich um nicht-adhärenzte Zelllinien, die bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert wurden. Die Zellen wurden in der Regel zwei Mal wöchentlich passagiert und mit frischem Nährmedium versetzt. Dies erfolgte unter sterilen Bedingungen. Dazu wurden die Zellen zunächst in der Zellkulturflasche resuspendiert, in 50 ml Röhrchen überführt und bei 1500 *rounds per minute* (rpm) für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen, das Zellpellet in 10 ml frischem Nährmedium resuspendiert und im Sinne eines Waschschruttes erneut für 5 Minuten bei 1500rpm zentrifugiert. Dann wurde wiederum der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 ml resuspendiert.

Anschließend erfolgte eine Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer in Trypan-Blau-Lösung in einem Verhältnis von 1:2 (50 µl Trypanblau+ 50 µl Zellsuspension). Die Menge vitaler Zellen wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl in zwei großen Eckquadraten}}{2} \times 10^4 / \text{ml} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumen Zellsuspension (ml)}$$

= Gesamtzellzahl in der Suspension

Entsprechend der berechneten Zellzahl und der erforderlichen Zellmenge für Experimente in darauffolgenden Tagen, wurden ein bestimmtes Volumen der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit einer adäquaten Menge Nährmedium (0,125 x 10⁶- 0,25 x 10⁶ Zellen/ml) versetzt. Die Zellkulturflasche wurde in vertikaler Position gelagert.

Zur langfristigen Lagerung wurden Zellen früher Passagen eingefroren. Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben gewaschen, gezählt und in gewünschter Menge (5-10 x 10⁶ Zellen/ ml Einfriermedium (10% DMSO in FBS)) resuspendiert und in Kryovials bei -80°C gelagert. Zur gleichmäßigen Temperaturreduktion wurden die Kryovials in einer Zellkultur-Einfrierhilfe eingefroren.

Um eingefrorene Zellen zu verwenden, wurden diese im Wasserbad gleichmäßig und zügig aufgetaut, in ein mit 10 ml Nährmedium gefülltes Röhrchen pipettiert und wie oben beschrieben zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in Nährmedium resuspendiert und in adäquatem Volumen in eine Zellkulturflasche überführt.

2.2.8 Infektion von Zellen

Im Rahmen der T-Zell-Experimente erfolgte auch eine Untersuchung der T-Zell-Antwort auf endogen prozessierte Peptide. Dazu wurden SY-9782 Zellen mit MVA-Sc und MVA- WT infiziert. Zur Infektion wurden diese zwei Tage vor Beginn des Experimentes, wie oben beschrieben, aus der Zellkulturflasche nach Resuspension in ein 50 ml Röhrchen überführt, zentrifugiert und der Zellkulturüberstand wurde verworfen. Anschließend erfolgte eine Resuspension in 10 ml Medium und eine Zellzählung. Eine ausreichende Menge an Zellen wurden auf $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml adjustiert und so bis zum nächsten Tag bei 37°C , 5% CO_2 kultiviert. Am Vorabend des Experiments wurden die Zellen erneut, wie oben beschrieben, prozessiert, gezählt und in gewünschter Menge jeweils in ein 50 ml Röhrchen für die Infektion mit MVA-WT und MVA-Sc überführt. Es erfolgte wiederum eine Zentrifugation. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden anschließend in einem kleinen Volumen von je 300 μl Nährmedium resuspendiert, in dem eine Infektion der Zellen gewährleistet ist.

Die Viren wurden für die Infektion wie in 2.2.1 beschrieben ausgefroren. Vom Virus-Stock wurde jeweils eine Virusverdünnung in Arbeitskonzentration von 1×10^9 mit RPMI 10% hergestellt. Die Infektion erfolgte mit einer *Multiplicity of Infection* (MOI) von 10. Berechnet wurde die notwendige Menge an Virus ausgehend von der Arbeitskonzentration wie folgt:

$$\frac{(\text{Zu infizierende Zellzahl} \times 10)}{1 \times 10^9/\text{ml (Arbeitskonzentration)}} = \text{benötigtes Volumen der Virusverdünnung (ml)}$$

Das berechnete Volumen an Virusverdünnung wurde in das 50ml Röhrchen mit den Zellen pipettiert und durch Resuspension mit den Zellen durchmischt. Das Röhrchen wurde nur unvollständig verschlossen und unter Durchmischen in einem 15-minütigem Intervall für eine Stunde bei 37°C , 5% CO_2 inkubiert. Nach einer Stunde wurden die Zellsuspension mit Medium auf je 2-3 ml aufgefüllt (einer Zellzahl von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml entsprechend), in eine 6-Well-Platte überführt und so bis zum nächsten Tag kultiviert. Auf die gleiche Weise wurde mit nicht infizierten Zellen („mock“) verfahren.

Am Tag des Experimentes wurden die Zellen mit dem entsprechenden Gebrauchsmedium gewaschen, gezählt und auf die gewünschte Menge adjustiert.

2.2.9 Splenektomie und Präparation muriner Splenozyten

Für die Untersuchung der T-Zell-Antworten wurden Mäuse, wie in **Abb. 7** beschrieben, immunisiert und splenektomiert. Für die Splenektomie erfolgte zunächst eine kraniozervikale Dislokation, dann wurde die Maus auf die rechte Körperseite gelegt und zur Desinfektion mit Ethanol benetzt. Unter sterilen Bedingungen erfolgte eine Eröffnung der Haut im Bereich der Milzloge. Nach erneuter Desinfektion des Präparationsbesteckes und einer Desinfektion der zu eröffnenden Muskelschicht mit Ethanol wurde die Milz freigelegt. Nach wiederholter Desinfektion von Schere und Pinzette wurde die Milz vorsichtig unter Lösen umgebener Strukturen herauspräpariert und in ein mit 5 ml M2 Medium (Peptid-Screening Assay) bzw. mit *Ground Medium* (T-Zell-Restimulation, LPS-Blasten, Primärkultur) vorbereitetes 50 ml Röhrchen gelegt. Anschließend wurde das Medium, mitsamt der Milz, in eine 6 cm Zellkulturschale überführt. Durch Druck und kreisende Bewegungen wurde die Milz auf einem Metallsieb mit Hilfe eines Spritzenkolbens zerkleinert, sodass Splenozyten vereinzelt wurden. Die Splenozyten wurden wieder in das 50 ml Röhrchen überführt. Das Metallsieb wurde mit 10 ml Medium erneut gespült und in der Zellkulturschale verbliebene Zellen so ebenfalls in das Röhrchen überführt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation, wie unter 2.2.7 beschrieben. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet wurde, um störende Erythrozyten zu entfernen, in 5 ml Lyse-Puffer (1:10 Verdünnung mit destilliertem Wasser (dH₂O)) resuspendiert, und nach 1 Minute mit 45 ml Medium aufgefüllt. Dann wurde das Röhrchen erneut, wie oben beschrieben, zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in 10 ml Medium resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Vor Verwendung der Splenozyten wurden diese mittels Neubauer-Zählkammer gezählt. Dazu wurden 10 µl der Splenozytensuspension im Verhältnis 1:10 mit Medium verdünnt. Davon wurden 50 µl dann in 50 µl Trypanblau und 100 µl 4% Essigsäure überführt und gemischt, sodass eine Endverdünnung im Verhältnis 1:40 vorlag. Die Menge an Splenozyten wurde, wie unter 2.2.7 beschrieben, berechnet und die Zellsuspension anschließend auf die gewünschte Zellzahl adjustiert.

2.2.10 Peptid-Screening Assay

Zur Erfassung der CD8⁺ und CD4⁺ T-Zell-Antwort nach Impfung mit MVA-Sc/ MVA-N diente zunächst ein Screening auf immunogene T-Zell-Epitope des S- und N-Proteins, die in der Lage waren, im Rahmen der Impfung, *in vivo* spezifische T-Zellen zu

induzieren. Dazu wurden murine Splenozyten *ex vivo* erneut mit verschiedenen S-/N-Peptiden stimuliert. Im Falle einer Erkennung ihres Peptidepitops im MHC-Peptid-Komplex, wird in aktivierten, spezifischen T-Zellen eine Zytokinausschüttung (u.a. IFN γ) stimuliert. Durch die Zugabe des intrazellulären Protein-Transportinhibitors Brefeldin A wird verhindert, dass gebildete Zytokine die Zelle verlassen, sodass sie anschließend intrazellulär angefärbt werden können.

Getestet wurden die in **Tabelle 13** aufgeführten, HLA-A2.1 bzw. HLA-DR1 restringierten Peptide. Die getesteten MHC Klasse I restringierten S-Peptide wurden durch Prof. Dr. A. Dilthey (HHU Düsseldorf, Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene) mittels *netMHCpan-4.1 prediction tool* als HLA-A2.1 bindend klassifiziert [90]. Viele dieser Peptide finden sich ebenfalls in zahlreichen Studien wieder, wo sie in der Lage waren, im Rahmen einer SARS-CoV-2 Infektion spezifische CD8⁺ T-Zell-Reaktionen zu induzieren. Entsprechende Studien wurden im Rahmen einer Übersichtsarbeit von Grifoni *et al.* tabellarisch zusammengefasst [97].

Die Auswahl verwendeter HLA-A2.1 restringierter N-Peptide basierte auf der Studie von Nelde *et al.* und vor allem auf den von Jin *et al.* getesteten, über *in silico* Bindungsmodelle vorhergesagten, SARS-CoV-2 N-Peptiden [98, 99]. In der Studie von Jin *et al.* wurden jedoch hinsichtlich der Induktion von CD8⁺ T-Zellen nur die Peptide N222, N316 und N330 in einem humanisierten Mausmodell weiter untersucht. Dort konnten messbare CD8⁺ T-Zell-Reaktionen induziert werden [99]. Darüber hinaus wurden einige dieser N-Peptide aber auch im Rahmen anderer Studien getestet und gingen dort ebenfalls mit dem Nachweis spezifischer CD8⁺ T-Zell-Reaktionen einher [97].

Der Auswahl der getesteten MHC Klasse II restringierten N- und S- Peptide lagen die Studien von Nelde *et al.*, Tarke *et al.* und Peng *et al.* zugrunde, in denen eine entsprechende peptidspezifische CD4⁺ T-Zell-Reaktivität in SARS-CoV-2 Rekonvaleszenten nachgewiesen werden konnte [98, 100, 101].

Zunächst wurden jeweils 2 Mäuse der HHD/DR1-Linie mit MVA-Sc und MVA-N in einem „*Short-Prime-Boost*“ Schema immunisiert (siehe **Abb. 7**). An Tag 12 wurden die Splenozyten, wie unter 2.2.9 beschrieben, extrahiert, für die jeweilige Kondition (MVA-Sc /MVA-N) *gepoolt* und auf je 20 Millionen Zellen/ml adjustiert. Von der Splenozytensuspension wurden für jedes zu testende Peptid jeweils 100 μ l/Well auf eine 96-Well V-Platte pipettiert. Eine Platte diente der Testung HLA-A2.1 restringierter S-/N-Peptide, eine andere der Testung HLA-DR1 restringierter S-/N-Peptide.

Anschließend erfolgte die Vorbereitung der Peptidverdünnungen in M2 Medium, von denen 50 µl in die entsprechenden Wells pipettiert wurden. Die Peptidkonzentration betrug 10^{-7} molar. Zuletzt erfolgte eine Zugabe von 50 µl Brefeldin A pro Well in einer Verdünnung von 1:1250.

Als Impferfolgskontrollen wurden jeweils HLA-A2.1 und HLA-DR1 restringierte VACV-Peptide, d.h. vektorspezifische Peptide, verwendet. Als Positivkontrolle diente ein CD3-Antikörper (1:400 Endverdünnung), der über die Induktion einer unspezifischen IFN γ Ausschüttung die Gesamtheit aktivierbarer T-Zellen anzeigt.

Als Negativkontrollen dienten HLA-A2.1 und HLA-DR1 restringierte Influenza-Peptide, gegenüber denen die Mäuse immun-naiv sind. Eine „mock“-Kontrolle, das heißt Splenozyten ohne Peptidzugabe, wurden zur Definition eines *Cutoffs* herangezogen.

Die Mikrotiterplatte für die HLA-A2.1-restringierten Peptide zur Untersuchung der CD8⁺ T-Zell-Antwort wurde für 4 h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert, die Platte mit den HLA-DR1 restringierten Peptiden zur Untersuchung der CD4⁺ T-Zell-Antwort für 15 h bei 37°C, 5% CO₂.

2.2.11 Intrazelluläre Zytokinfärbung und *Fluorescence Activated Cytometry* (FACS)

Für die spätere Detektion aktivierter, peptidspezifischer T-Zellen in einer Probe, wurden diese, mitsamt ihrer gebildeten Zytokine, zunächst mittels Fluorochrom-markierter Antikörper angefärbt. Dazu wurden die Mikrotiterplatten nach Ablauf der Inkubationszeit zunächst auf 4°C heruntergekühlt und 2 min bei 1400 rpm in 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 180 µl DPBS pro Well resuspendiert und gewaschen und wiederum bei 1400 rpm in 4°C für 2 min zentrifugiert.

Um die Population nicht mehr vitaler Zellen aus der Auswertung zu exkludieren, wurden die Zellen für 20 Minuten mit 100 µl Amcyan (Fixierbarer Vitalitätsfarbstoff eFluor™ 506) pro Well (1:600 Verdünnung in DPBS) im Dunkeln auf Eis inkubiert. Amcyan ist in der Lage, nicht mehr intakte Zellmembranen zu passieren und entsprechend permeable Zellen anzufärben.

Vor der Färbung der Oberflächenantigene wurden die Zellen wiederum zweimal mit FACS Puffer gewaschen und 20 Minuten mit 50 µl Anti-Mo CD16/CD32 pro Well (1:200 in FACS Puffer) im Dunkeln auf Eis inkubiert, um die Fc-Rezeptoren der Immunzellen

des Milzgewebes zu blockieren und ein unspezifisches Abfangen der in den Folgeschritten zugegebenen Antikörper zu verhindern.

Erneut erfolgten zwei Waschschrte mit FACS Puffer. Für die anschließende Färbung der Zellen, die CD4 bzw. CD8 exprimieren, wurden ein jeweils Pacific Blue konjugierter Anti-CD4 bzw. Anti-CD8 Antikörper (1:300 in FACS Puffer) verwendet. Zur Exklusion CD62L positiver, naiver T-Zellen, wurden die Zellen im Peptid Screening Assay außerdem zeitgleich mit Anti-CD62L-PeCy7 (1:300 in FACS Puffer) gefärbt. Die Färbung erfolgte in einem Volumen von 50 µl pro Well und einer Inkubationszeit von 30 Minuten auf Eis im Dunkeln.

Nach erneutem zweimaligen Waschen mit FACS Puffer erfolgte die Fixierung der Antikörper auf der Zelloberfläche mit 100 µl Cytofix pro Well in einer Inkubationszeit von 15 Minuten. Danach wurden die Zellen mit Permash (1:10 in dH₂O verdünnt) gewaschen, um die Zellwände permeabel für die Zytokinfärbung zu machen.

Anschließend wurde intrazelluläres IFN γ mit Anti-IFN γ -APC (1:300 in Permash) in einem Volumen von 50 µl pro Well für 30 Minuten angefärbt. Nach der Zytokinfärbung erfolgten nochmals zwei Waschschrte mit Permash. Anschließend wurden die Zellen zur Fixierung in 150 µl 2% Paraformaldehyd (PFA) resuspendiert und in FACS Tubes mit jeweils 150 µl vorgelegtem FACS Puffer überführt.

Die Messung des Anteils IFN γ - produzierender spezifischer T-Zellen an der Gesamtheit aller aktivierten T-Zellen in einer Probe erfolgte über eine anschließende FACS-Analyse (siehe **Abb. 11**). Beim FACS werden Zellen einer Probe einzeln durch eine Messvorrichtung geleitet und mit einem Laserstrahl „beschossen“. Über eine unterschiedliche Streuung des Lichtes können verschiedene Zelltypen durch ihre unterschiedliche Größe und Beschaffenheit differenziert werden. Dabei detektierte T-Zellen können durch eine Expression bestimmter Oberflächenmarker weiter differenziert werden. Dazu werden, wie oben beschrieben, Fluorochrom-markierte Antikörper genutzt, die für diese Oberflächenmarker spezifisch sind und über ihre unterschiedlichen Fluoreszenzsignale im Rahmen der FACS-Analyse differenziert werden können. Über eine Verwendung Fluorochrom-markierter Antikörper erfolgte auch eine Anfärbung intrazellulärer Zytokine.

Mittels einer geeigneten Software (hier FlowJo) können FACS-Daten anschließend über ein *Gating* ausgewertet werden (siehe Anhang). Dabei wird die T-Zell-Population über verschiedene „Kanäle“ hinsichtlich ihrer Farbsignale weiter differenziert, sodass zuletzt der Anteil IFN γ produzierender T-Zellen prozentual von allen vitalen, CD62L negativen, CD4/CD8 positiven Zellen in einer Probe errechnet werden kann.

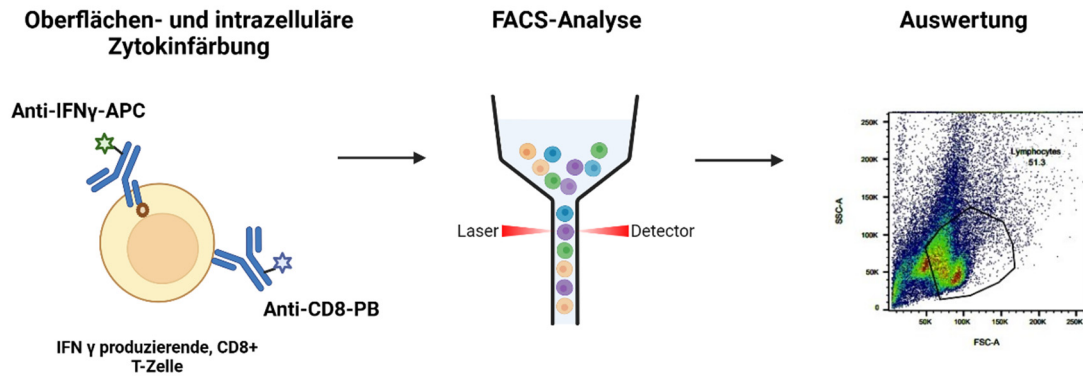


Abb. 11 Detektion der *in vivo* induzierten, spezifischen T-Zellen mittels Intrazellulärer Zytokinfärbung und Fluorescence Activated Cytometry (FACS)-Analyse. *In vivo* induzierte T-Zellen werden *ex vivo* durch erneute Stimulation durch ihr spezifisches Peptid zur IFN γ (Interferon Gamma) Ausschüttung angeregt. Solche aktivierten spezifischen T-Zellen können über eine Anfärbung von Oberflächenmarkern (hier CD8+ (*Cluster of Differentiation*)) und intrazellulären Zytokinen über Fluorochrom-markierte Antikörper mit einer anschließenden FACS-Analyse detektiert und differenziert werden. Eine Differenzierung verschiedener Zellpopulationen erfolgt über eine unterschiedliche Streuung des Lichtes und über verschiedene ausgesendete Fluoreszenzsignale. Die Auswertung der FACS Daten erfolgt über eine Erfassung der gewünschten T-Zell-Populationen mittels *Gating*. Anti-IFN γ -APC= APC markierter Anti-IFN γ -Antikörper, Anti-CD8-PB= Pacific Blue-markierter Anti-CD8-Antikörper. Abbildung erstellt mit BioRender.

2.2.12 Etablierung zweier Spike-Peptidspezifischer CD8+ T-Zelllinien (S 417, S 976)

Die Isolation und *in vitro* Expansion peptidspezifischer T-Zellen nach Maus-Immunisierung diente der Evaluation der Reaktivität spezifischer T-Zellen nach endogener Peptidpräsentation durch MVA-Sc infizierte Zellen *in vitro*.

Die im Peptide Screening Assay als immunogensten identifizierten Peptide (S976, S417) wurden ausgewählt, um T-Zell-Linien *in vitro* zu generieren. Zur Kontrolle wurde zusätzlich eine MVA-spezifische T-Zell-Linie generiert (B22R).

Zunächst erfolgte die Immunisierung zweier Mäuse der HHD/DR1-Linie, im Folgenden „Responder“ genannt, wie unter 2.2.1 beschrieben, mit MVA-Sc. Diese wurden an Tag 8 nach Impfung splenektomiert und für die Primärkulturpräparation verwendet.

Drei Tage vor Beginn der Primärkulturpräparation wurde eine ungeimpfte Maus der HHD/DR1-Linie splenektomiert, um Lipopolysaccharid-Blasten (LPS-Blasten) zu generieren, die den T-Zellen der geimpften Mäuse in der Primärkultur als Stimulator-Zellen dienen sollten.

Zur Splenozytenextraktion (vgl. **2.2.9**) wurde *Ground Medium* verwendet. Für den Waschschrift nach Erythrozytenlyse wurde *Washing Medium* verwendet. Anschließend wurden die Splenozyten in 3 ml LPS-Medium resuspendiert.

In einer Neubauer-Zählkammer erfolgte eine Zählung der Splenozyten wie unter **2.2.7** beschrieben. Die Zellen wurden auf 40 Millionen Zellen/ml adjustiert. Von dieser Zellsuspension wurde jeweils 1 ml pro T75 Zellkulturflasche verwendet und auf 40 ml Gesamtvolumen mit LPS-Medium aufgefüllt, sodass die Zellzahl 1 Million/ml betrug. Die Zellkulturflaschen wurden vertikal für drei Tage bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert.

Am Tag der Primärkulturpräparation wurden die LPS-Blasten mit frischem Medium versetzt und zunächst mit einer Dosis von 3000 Zentigray (cGy) bestrahlt, um deren Teilungsfähigkeit zu hemmen. Anschließend wurde die Zellsuspension auf 50 ml Röhrrchen entsprechend der intendierten Anzahl an T-Zell-Linien verteilt. Die Röhrrchen wurden wie unter **2.2.7** beschrieben zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml reinem RPMI Medium resuspendiert. Dann wurden 5 µl des jeweiligen Peptids (1 mg/ml Peptid in DMSO) hinzugefügt. Die Inkubationszeit für die Peptidbeladung betrug 40 Minuten im Wasserbad bei 37°C, 5% CO₂ im unvollständig verschlossenen Röhrrchen.

Nach Inkubation erfolgte ein Wasch-Schritt mit 10 ml *Ground Medium*, eine anschließende Resuspension in frischem *Ground Medium* und eine Zellzählung (siehe **2.2.7**). Die Zellen wurden auf eine Zellzahl von 3 Millionen Zellen/ml adjustiert und während der Präparation der „*Responder*“-Zellen auf Eis gelegt.

Die „*Responder*“-Splenozyten Präparation entspricht der Splenozytenpräparation für die LPS-Blasten, jedoch entfiel hier der Schritt der Erythrozytenlyse und die darauffolgenden Wasch-Schritte mit *Washing Medium*. Die „*Responder*“-Splenozyten wurden nach Resuspension in *Ground Medium* auf 7 Millionen Zellen/ml adjustiert.

Final wurde jeweils 1 ml der LPS-Blasten pro Well in eine 24 Well Platte pipettiert, anschließend wurde jeweils 1 ml der „*Responder*“-Splenozyten hinzugefügt. Die Primärkultur wurde bis zur ersten Restimulation nach einer Woche in 37°C bei 5% CO₂ inkubiert.

2.2.13 T-Zell-Restimulation

Zur Aufrechterhaltung und Proliferation der spezifischen CD8+ T-Zellen in einer Kultur erfolgte eine wöchentliche Restimulation mit dem entsprechenden spezifischen Peptid.

Als peptidpräsentierende Stimulatorzellen wurden transfizierte, HLA-A2.1 exprimierende JA 2.1 Zellen genutzt. Diese wurden zur Aufrechterhaltung ihrer Transfektion in M1 Medium kultiviert und einen Tag vor Restimulation mit M2 Medium versetzt. Am Tag der Restimulation wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und zunächst bei 20000 cGy bestrahlt. Danach wurde die Zellsuspension auf Röhrchen, der Anzahl der Peptide entsprechend, verteilt. Die Röhrchen wurden zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden nochmals mit 10 ml reinem RPMI gewaschen (5 min, 5000 rpm) und jeweils in 1 ml RPMI resuspendiert. Anschließend wurde jeweils 5 µl Peptid (1 mg/ml DMSO) hinzugefügt. Es erfolgte eine 40 minütige Inkubation mit Peptid bei 37°C und 5% CO₂ bei unvollständig geschlossenem Röhrchen. Die Inkubation wurde durch Waschen mit 10 ml *Ground Medium* beendet. Anschließend erfolgte eine Resuspension der Zellen in 10 ml *Ground Medium*, eine Zellzählung, wie unter **2.2.7** beschrieben, und eine Adjustierung der Zellzahl auf 1 Million Zellen/ml.

Parallel erfolgte die Präparation von Splenozyten der HHD Mauslinie als „Füll-Zellen“. Diese dienten dazu, in der Kultur ein optimales Milieu für das T-Zell-Wachstum zu schaffen. Die Splenozytenextraktion erfolgte mit *Ground Medium* nach demselben Prinzip wie unter **2.2.9** beschrieben. Anschließend erfolgte ebenfalls eine Bestrahlung der Splenozyten mit einer Dosis von 3000 cGy. Nach Bestrahlung wurden die Splenozyten einmal gewaschen, in 10 ml *Ground Medium* resuspendiert und nach Zellzählung auf 12 Millionen Zellen/ml adjustiert.

Vor Präparation der T-Zellen wurden sterile 24 Well Platten wie folgt vorbereitet: Pro Well erfolgte eine Zugabe von 0,5 ml Splenozyten (6 Millionen Zellen pro Well), 0,5 ml JA 2.1 Zellen (0,5 Millionen Zellen/ Well) und 0,5 ml *T-Cell Growth Factor* (TCGF) 20%.

Die zu restimulierenden T-Zellen der vorherigen Zellpassage wurden in ihren Wells resuspendiert, in einem 15 ml Röhrchen gepoolt, und anschließend bei 5000 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Der Zellkulturüberstand wurde verworfen. Anschließend wurden sie in *Ground Medium* resuspendiert, wobei die Menge an Medium von der intendierten Anzahl der Wells abhängig war (0,5 ml pro Well). Das gewöhnliche Split-Verhältnis betrug, je nach Dichte der T-Zellen im Well, 1:2- 1:4.

Anschließend wurden 0,5 ml T-Zellen pro Well zu den Splenozyten, JA 2.1- Zellen und TCGF hinzugefügt. Restliche leere Wells wurden mit je 1 ml Medium gefüllt, um das Wachstumsmilieu durch die Umgebung auf der Platte zu optimieren. Bis zur nächsten Restimulation verweilten die T-Zellen bei 37°C und 5 % CO₂ im Inkubator.

2.2.14 T-Zell-Assay

Die wöchentliche Restimulation und die damit einhergehende Expansion der spezifischen T-Zellen erlaubte eine Untersuchung der Qualität der T-Zellen hinsichtlich ihrer Reaktivität auf eine Präsentation endogen prozessierter Peptide durch MVA-Sc infizierte Zellen *in vitro*. Daneben wurde erneut auch eine Reaktivität auf Zellen evaluiert, die von exogen mit Peptid beladen wurden. Die Testung erfolgte, ebenso wie im Peptid Screening Assay, über eine Quantifizierung des Anteils IFN γ -ausschüttender T-Zellen mittels Intrazellulärer Zytokinfärbung und anschließender FACS-Analyse.

Als peptidpräsentierende Zellen wurden HLA-A2.1 exprimierende SY9287- Zellen verwendet, die wie in **2.2.7** beschrieben kultiviert und wie in **2.2.8** beschrieben mit MVA-Sc /MVA-WT infiziert wurden. Am Tag des Experimentes wurden die infizierten Zellen in ihrem Well resuspendiert, jeweils in ein Röhrchen für MVA-Sc, MVA- WT und „mock“ überführt, zentrifugiert, in frischem M2 Medium resuspendiert, gezählt und auf die gewünschte Zellzahl von 2 Millionen Zellen/ml adjustiert. Von der Zellsuspension wurden jeweils 100 μ l in die Wells einer 96 Well (V)-Platte pipettiert.

Die Platte wurde bei 1400 rpm für 2 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die nicht infizierten Zellen wurden in jeweils 200 μ l Peptidverdünnung resuspendiert. Dazu wurden aus dem Peptidstock (1 mg/ml DMSO) Lösungen in verschiedenen Konzentrationen von 10^{-7} molar (Verdünnung 1:1x 10^2) bis 10^{-10} molar (Verdünnung 1:1x 10^5) hergestellt. Als Negativkontrolle wurden Zellen mit Influenza-Peptid in einer Konzentration von 10^{-7} molar beladen. Die infizierten Zellen wurden erneut in M2 Medium resuspendiert, ebenso die nicht infizierte, nicht peptidbeladene Kontrolle „mock“. Die Zellen wurden auf der Platte für 40 min bei 37 °C, 5 % CO $_2$ inkubiert.

Währenddessen wurden die T-Zellen vorbereitet. Zunächst wurden sie in ihren Wells resuspendiert, in ein Röhrchen überführt, zentrifugiert, in 10 ml frischem M2 Medium resuspendiert, gezählt und auf eine Menge von 2 Millionen/ ml adjustiert.

Nach Ende der Peptid-Inkubationszeit wurde die Platte mit den peptidbeladenen Zellen erneut bei 1400 rpm 2 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 100 μ l M2 resuspendiert. Dann wurden 100 μ l der T-Zell-Suspension jeweils in die entsprechenden Wells pipettiert. Zuletzt erfolgte die Zugabe von 50 μ l Brefelidin A (in einer Verdünnung von 1:1250) pro Well. Anschließend wurde die Platte für 4 h bei 37°C und 5 % CO $_2$ inkubiert.

Die Färbung mittels Fluorochrom-markierter Antikörper und die FACS-Analyse der Proben entspricht dem unter **2.2.11** beschriebenen Vorgehen. Allerdings wurde hier kein CD62L- Antikörper verwendet. Darüber hinaus wurde beim T-Zell-Assay der Passage 1 ein anderes Färbeprotokoll verwendet. Statt Amcyan (Fixierbarer Vitalitätsfarbstoff eFluor™ 506) wurde zur Anfärbung der avitalen Zellen hier APC (Fixierbarer Vitalitätsfarbstoff eFluor™ 660) (1:2000 in DPBS) verwendet, für die Zytokinfärbung Anti-IFN γ -FITC (1:300 in PermWash). Davon abgesehen gleichen die Färbeprotokolle einander.

2.2.15 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels GraphPad Prism Version 9.0.0. Zum Vergleich der Antikörper-Antwort nach *Prime* und *Prime-Boost*-Impfung mit MVA-N/ MVA-Sc wurde ein *nested t-test* durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse des Neutralisationstestes nach *Prime* und nach *Prime-Boost*-Impfung mit MVA-Sc erfolgte mittels *Welch's t-test*.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung eines Anti-S-Antikörper-ELISAs und eines Anti-N-Antikörper-ELISAs zur Quantifizierung der Antikörperantwort nach Impfung

Um eine Antikörper-Bildung nach Impfung mit MVA-Sc/ MVA-N erfassen zu können, erfolgte die Etablierung eines laborinternen Anti-S- bzw. Anti-N-Antikörper ELISAs. Dies erfolgte in mehreren Schritten, in denen die Konzentrationen der verwendeten Komponenten im Hinblick auf eine bestmögliche Sensitivität und Spezifität des ELISAs optimiert wurden.

Zur Sicherstellung der generellen Funktionsfähigkeit des Testsystems und seiner Komponenten erfolgte zunächst die Testung eines monoklonalen Anti-S bzw. Anti-N-Antikörpers in verschiedenen Verdünnungen (vgl. **Abb. 12**) nach einem schon vorher im Labor verwendeten Protokoll (siehe **Tabelle 16**). Außerdem ließ sich so ein Eindruck gewinnen, in welchem Verdünnungsbereich der monoklonale Antikörper im späteren ELISA als Positivkontrolle verwendet werden sollte.

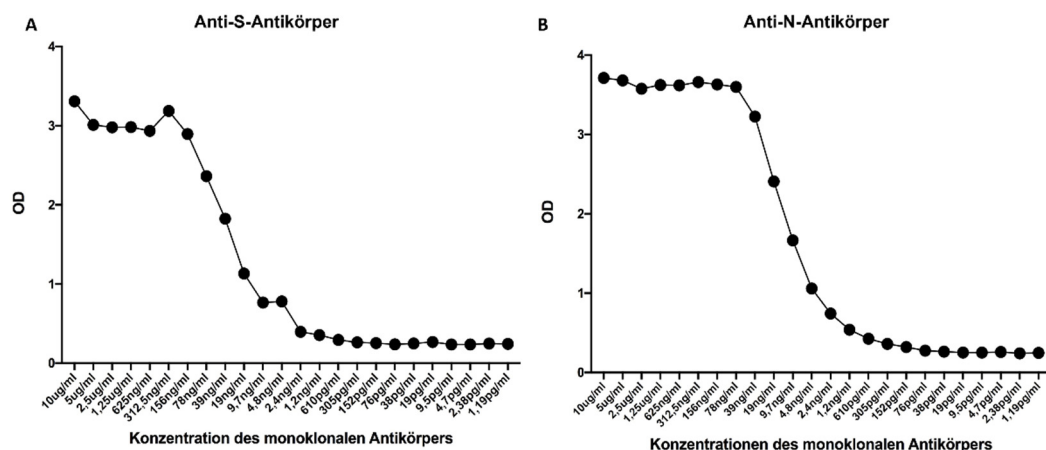


Abb. 12 Titration des monoklonalen Anti-Spike- (A) und Anti-Nukleokapsid-Antikörpers (B) mittels ELISA. Dargestellt ist die gemessene optische Dichte (OD) in Abhängigkeit der verwendeten Konzentrationen des monoklonalen Anti-Spike (S) (A) bzw. Anti-Nukleokapsid (N)-Antikörpers (B). Als Antigenkonzentration wurden 1 µg/ml S- (A) bzw. N-Protein (B) und als Sekundärantikörperverdünnung eine Verdünnung von 1:1000 verwendet. Jede Antikörper-Konzentration wurde im technischen Replikat gemessen und ist hier als Mittelwert abgebildet. µg= Mikrogramm, ng= Nanogramm, pg= Pikogramm, ml= Milliliter.

Eine generelle Funktionsfähigkeit des Testsystems, unter den gewählten Bedingungen, ist sowohl für den S- als auch für den N-ELISA gewährleistet. Sichtbar ist ein initialer Sättigungsbereich bei hohen Antikörperkonzentrationen bis zu 156 ng/ml (1:3200) im S-ELISA (**Abb. 12 A**) und bis zu 78 ng/ml (1:6400) im N-ELISA (**Abb. 12 B**). Für spätere Messungen sollten Antikörper-Verdünnungen im linearen Bereich der Kurve verwendet werden, weil sich hier Konzentrationsveränderungen am sensitivsten erfassen lassen.

Im ersten Schritt der ELISA-Etablierung erfolgte eine Titration verschiedener Antigenkonzentrationen gegen verschiedene Serumverdünnungen geimpfter Mäuse (**Abb. 13**). Dieser erste Schritt hatte zum Ziel, eine optimale Antigenkonzentration zu finden und einen Eindruck zu gewinnen, welche Serumverdünnung benötigt wird, um die unspezifische Hintergrundaktivität gering zu halten, aber gleichzeitig eine ausreichend hohe Sensitivität für die Detektion spezifischer Antikörper zu gewährleisten.

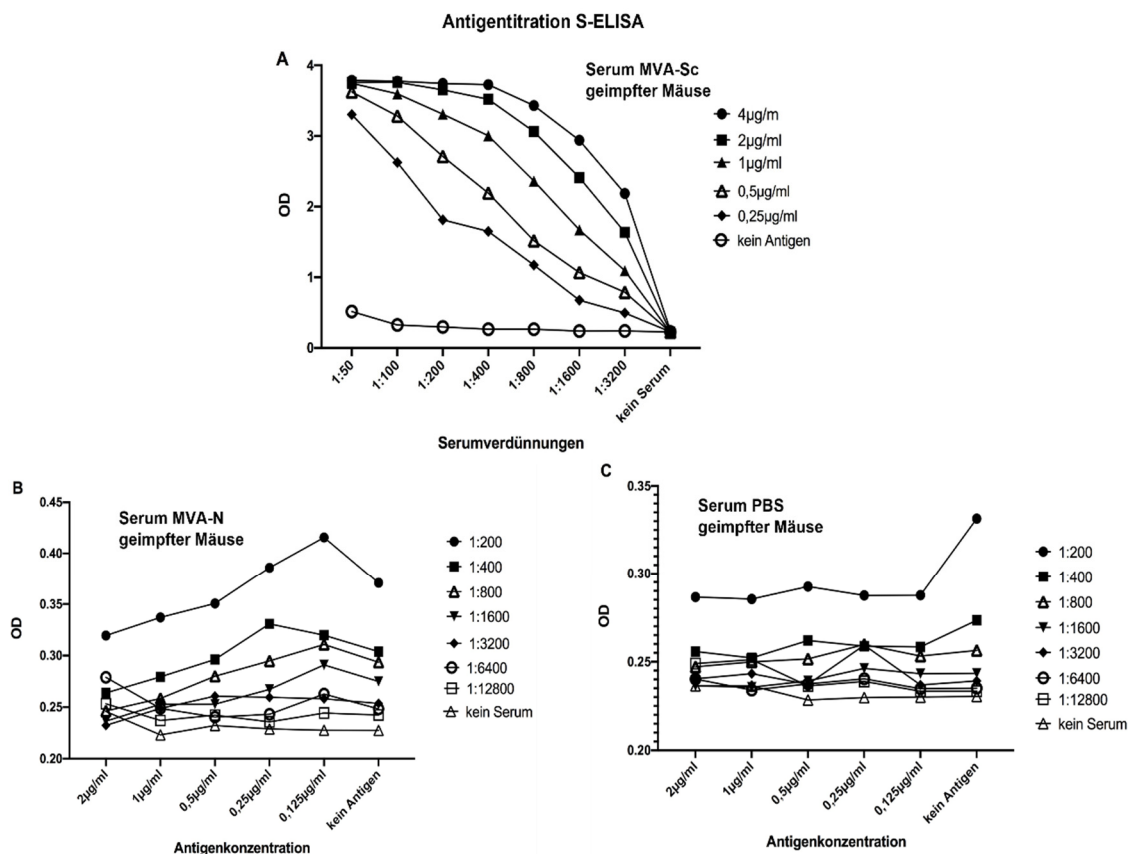


Abb. 13 Titration des Spike (S)-Proteins gegen verschiedene Serumverdünnungen im ersten Schritt der S-ELISA-Etablierung. Das verwendete Serum wurde nach *Prime*-Impfung mit MVA-Sc (A), MVA-N (B) und PBS (C) gewonnen. Dargestellt ist das Verhalten der optischen Dichte (OD) in Abhängigkeit verschiedener Antigenkonzentrationen und Serumverdünnungen. Jede Antigenkonzentration wurde mit jeder Serumverdünnung im technischen Replikat gemessen. Dargestellt ist hier jeweils der Mittelwert beider gemessenen OD-Werte. Die Kurven in A repräsentieren jeweils eine Antigenkonzentration und das Verhalten der gemessenen OD

bei Testung verschiedener Serumverdünnungen MVA-Sc geimpfter Mäuse unter dieser Antigenkonzentration. Die Kurven in B und C repräsentieren jeweils eine getestete Serumverdünnung und das Verhalten der gemessenen OD bei unterschiedlichen Antigenkonzentrationen hinsichtlich der unspezifischen Hintergrundaktivität in unterschiedlichen Serumkonzentrationen. Der Sekundärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. MVA= *Modified Vaccinia Virus Ankara*, Sc= Spike codonoptimiert, N= Nukleokapsid, PBS= *Phosphate-Buffered Saline*, µg= Mikrogramm, ml= Milliliter.

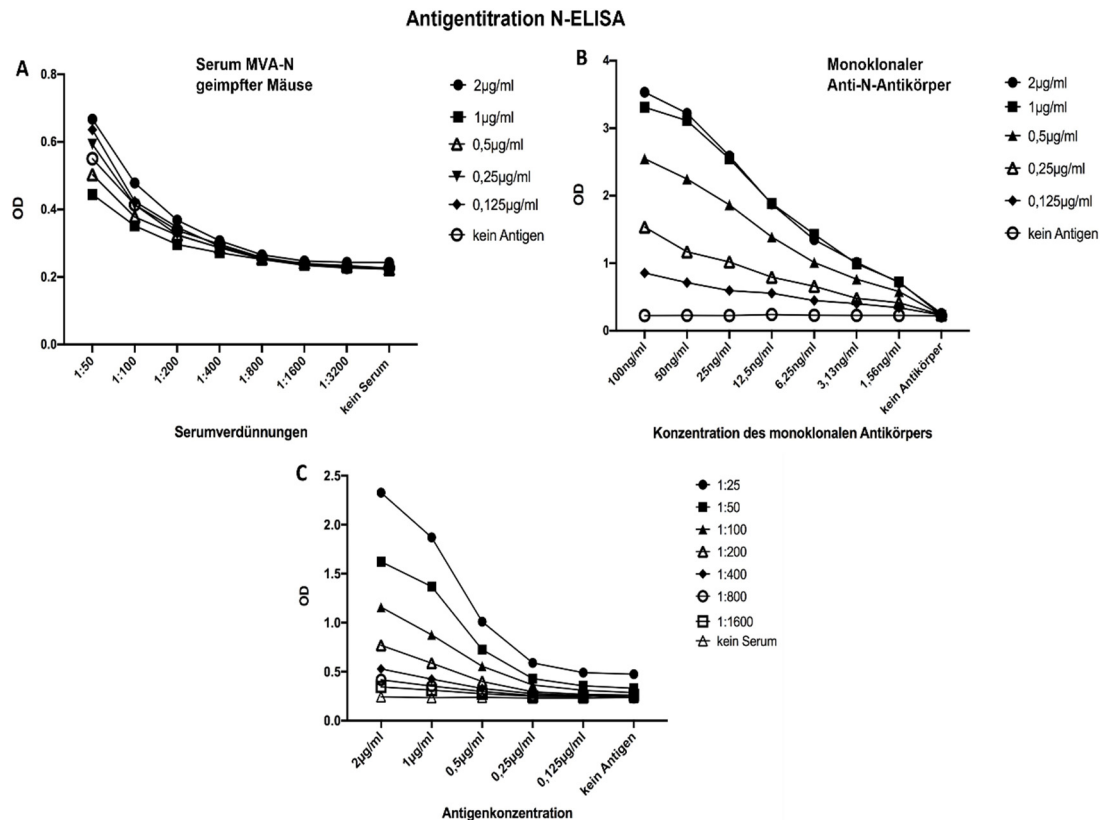


Abb. 14 Titration des Nukleokapsid (N)-Proteins gegen verschiedene Serumverdünnungen und gegen verschiedene Konzentrationen des monoklonalen Anti-N-Antikörpers im ersten Schritt der N-ELISA-Etablierung. Das verwendete Serum wurde nach *Prime-Boost*-Impfung mit MVA-N (A) bzw. MVA-WT(C) gewonnen. (B) zeigt die Antigentitration mit einem monoklonalen Anti-N-Antikörper. Dargestellt ist das Verhalten der optischen Dichte (OD) in Abhängigkeit verschiedener Antigenkonzentrationen und Serumverdünnungen bzw. Konzentrationen des monoklonalen Anti-N-Antikörpers. Jede Antigenkonzentration wurde mit jeder Serumverdünnung bzw. mit jeder Konzentration des monoklonalen Antikörpers im technischen Replikate gemessen. Dargestellt ist hier jeweils der Mittelwert beider gemessenen OD-Werte. Die Kurven in A und B repräsentieren jeweils eine Antigenkonzentration und das Verhalten der gemessenen OD bei Testung verschiedener Serumverdünnungen MVA-N geimpfter Mäuse bzw. verschiedener Konzentrationen des monoklonalen Anti-N-Antikörpers unter dieser Antigenkonzentration. Die Kurven in C repräsentieren jeweils eine getestete Serumverdünnung und das Verhalten der gemessenen OD bei unterschiedlichen Antigenkonzentrationen hinsichtlich der unspezifischen Hintergrundaktivität in unterschiedlichen Serumkonzentrationen. Der Sekundärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. MVA= *Modified Vaccinia Virus Ankara*, N= Nukleokapsid, WT= Wildtyp, µg= Mikrogramm, ml= Milliliter.

Als finale Antigenkonzentration wurden schließlich 0,5 µg/ml S-Protein für den S-ELISA und ebenfalls 0,5 µg/ml N-Protein für den N-ELISA gewählt. Hier zeigt die Kurve über

die getesteten Serumverdünnungen (**Abb. 13 A**) bzw. Konzentrationen des monoklonalen Anti-N-Antikörpers hinweg (**Abb. 14 B**) die beste Linearität, sodass bei dieser Antigenkonzentration von einer guten Sensitivität für die Antikörper-Detektion ausgegangen werden kann. Höhere Antigenkonzentrationen hingegen zeigen einen breiten Sättigungsbereich und erlauben so, vor allem in niedrigeren Serumverdünnungen, keine gute Diskriminierung zwischen den unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen. Niedrigere Antigenkonzentrationen ab 0,125 µg/ml führen zu einem flacheren Kurvenverlauf und könnten aufgrund einer zu geringen Antigendichte Einbußen an Sensitivität mit sich bringen. Ebenso wie zu hohe Antigenkonzentrationen führen auch zu geringe Antigenkonzentrationen zu einer schlechteren Diskriminierung zwischen den Antikörperkonzentrationen der unterschiedlichen Serumverdünnungen (vgl. **Abb. 13**, **Abb. 14**).

Abb. 13 B und **13 C** zeigen, dass das Ausmaß an unspezifischer Hintergrundaktivität im S-ELISA vor allem bei Verwendung hoher Serumverdünnungen über 1:200 gering ist und nicht nennenswert in Abhängigkeit der Antigenkonzentration variiert.

Im N-ELISA (vgl. **Abb. 14 C**) zeigt sich eine sehr hohe unspezifische Bindung von Serumkomponenten bei höheren Antigenkonzentrationen über 0,5µg/ml, vor allem bei der Verwendung geringer Serumverdünnungen (1:25- 1:200). Dahingegen lassen sich im N-ELISA auch in geringen Serumverdünnungen keine spezifischen Antikörper nachweisen (**Abb. 14 A**). Die Signalstärke entspricht hier der mit Serum MVA-WT geimpfter Mäuse ermittelten. Zur Etablierung des N-ELISAs wurde daher statt des Mausserums ein monoklonaler Anti-N-Antikörper verwendet (**Abb. 14 B**).

In einem zweiten Schritt der ELISA-Etablierung erfolgte eine Titration verschiedener Sekundärantikörperverdünnungen gegen verschiedene Serumverdünnungen bzw. verschiedene Konzentrationen des monoklonalen Anti-N-Antikörpers. Dieser Schritt diente dazu, auch die verwendete Sekundärantikörperkonzentration im Hinblick auf eine bestmögliche Sensitivität zu optimieren. Außerdem konnte hier die verwendete Serum-Startverdünnung nochmals angepasst werden.

Sekundärantikörpertitration S-ELISA

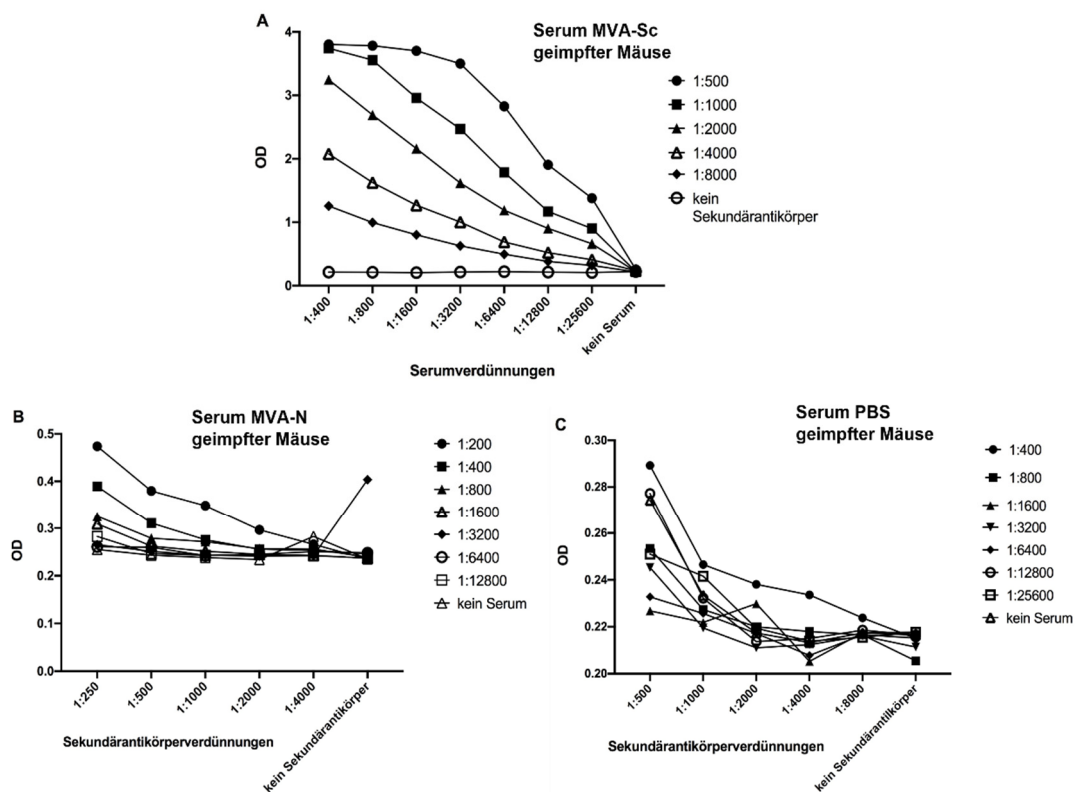


Abb. 15 Titration des Sekundärantikörpers gegen verschiedene Serumverdünnungen im zweiten Schritt der S-ELISA-Etablierung. Das verwendete Serum wurde nach *Prime-Boost*-Impfung mit MVA-Sc (A), MVA- N (B) oder PBS (C) gewonnen. Dargestellt ist das Verhalten der optischen Dichte (OD) in Abhängigkeit verschiedener Sekundärantikörperverdünnungen und Serumverdünnungen. Jede Verdünnung des Sekundärantikörpers wurde mit jeder Serumverdünnung im technischen Replikate gemessen. Dargestellt ist hier jeweils der Mittelwert beider gemessenen OD-Werte. Die Kurven in A präsentieren jeweils eine Sekundärantikörperverdünnung und das Verhalten der gemessenen OD bei Testung verschiedener Serumverdünnungen MVA-Sc geimpfter Mäuse unter dieser Sekundärantikörperverdünnung. Die Kurven in B und C repräsentieren jeweils eine getestete Serumverdünnung und das Verhalten der gemessenen OD bei unterschiedlichen Sekundärantikörperverdünnungen hinsichtlich der unspezifischen Hintergrundaktivität in unterschiedlichen Serumverdünnungen. Als Antigenkonzentration wurde die in Schritt eins als optimal definierte Konzentration von 0,5 µg/ml S-Protein verwendet. MVA= *Modified Vaccinia Virus Ankara*, Sc= *Spike codonoptimiert*, N= *Nukleokapsid*, PBS= *Phosphate-Buffered Saline*

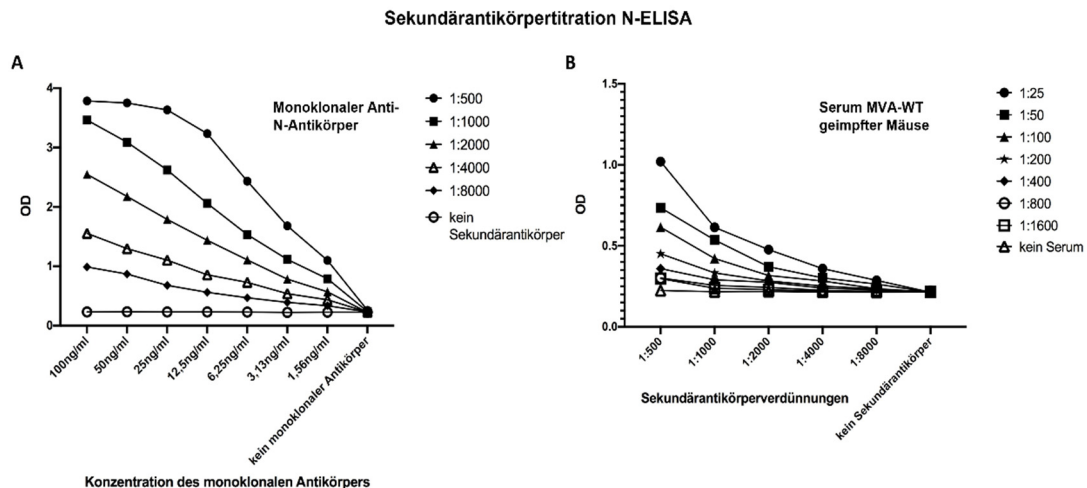


Abb. 16 Titration des Sekundärantikörpers gegen verschiedene Konzentrationen des monoklonalen Anti-Nukleokapsid (N)-Antikörpers (A) bzw. gegen verschiedene Serumverdünnungen MVA-WT geimpfter Mäuse (B) im zweiten Schritt der N-ELISA-Etablierung. Das verwendete Serum wurde nach *Prime-Boost*-Impfung mit MVA-WT gewonnen. Dargestellt ist das Verhalten der optischen Dichte (OD) in Abhängigkeit verschiedener Sekundärantikörpervedünnungen und verschiedener Konzentrationen des monoklonalen Anti-N-Antikörpers (A) bzw. verschiedener Serumverdünnungen MVA-WT geimpfter Mäuse (B). Jede Verdünnung des Sekundärantikörpers wurde mit jeder Serumverdünnung im technischen Replikат gemessen. Dargestellt ist hier jeweils der Mittelwert beider gemessenen OD-Werte. Die Kurven in A präsentieren jeweils eine Sekundärantikörpervedünnung und das Verhalten der gemessenen OD bei Testung verschiedener Konzentrationen des monoklonalen Anti-N-Antikörpers unter dieser Sekundärantikörpervedünnung. Die Kurven in B repräsentieren jeweils eine getestete Serumverdünnung und das Verhalten der gemessenen OD bei unterschiedlichen Sekundärantikörpervedünnungen hinsichtlich der unspezifischen Hintergrundaktivität in unterschiedlichen Serumverdünnungen. Als Antigenkonzentration wurde konstant die in Schritt eins als optimal definierte Konzentration von 0,5 µg/ml N-Protein verwendet. MVA= *Modified Vaccinia Virus Ankara*, N= Nukleokapsid, WT= Wildtyp, ng= Nanogramm, ml= Milliliter.

Als Sekundärantikörpervedünnung wurde sowohl für den S- als auch für den N-ELISA eine 1:2000 Verdünnung gewählt. Die 1:2000 Verdünnung gewährleistet eine gute Linearität, während niedrigere Verdünnungen (1:500-1:1000) einen breiten Sättigungsbereich bzw. einen sehr steilen Kurvenverlauf zeigen. Höhere Sekundärantikörpervedünnungen präsentieren sich in einem sehr flachen Kurvenverlauf (vgl. **Abb. 15 A, Abb. 16 A**). Beides würde, wie oben beschrieben, Einbußen in der Sensitivität mit sich bringen. Darüber hinaus führen niedrigere Sekundärantikörpervedünnungen zu höherer unspezifischer Bindung, wie sich im Serum MVA-N und PBS geimpfter Mäuse im S-ELISA (**Abb. 15 B, C**) bzw. MVA-WT geimpfter Mäuse im N-ELISA (**Abb. 16 B**), vor allem bei Verwendung geringer Serumverdünnungen, zeigt.

Um eine Endpunkttitration erreichen zu können, wurde für den S-ELISA eine Serum-Startverdünnung von 1:800 für zukünftige Messungen festgelegt. Niedrigere

Startkonzentrationen könnten bei sehr hohen Serumantikörperkonzentrationen eine Endpunkttitration verhindern. Die hohe Signalintensität bei einer Serumverdünnung von 1:800 spricht für eine hohe Sensitivität des Testsystems. Zugleich ist eine Erzeugung von unspezifischen Hintergrundsignalen durch Serumkomponenten bei entsprechenden Verdünnungsbereichen vernachlässigbar gering.

Im Anti-N-ELISA hingegen sind im Serum MVA-N geimpfter Mäuse bisher keine Antikörperantworten messbar. Dementsprechend wurde hier für die Messung der Seren eine sehr niedrige Startverdünnung von 1:50 gewählt, um möglicherweise auch geringe Antikörpermengen detektieren zu können. Bei einer Verwendung noch niedrigerer Serumverdünnungen sind lediglich steigende unspezifische Hintergrundsignale zu erwarten, die ohnehin im Vergleich zum Anti-S-ELISA deutlich höher liegen. Die Messungen unter Verwendung des monoklonalen Anti-N-Antikörpers sprechen jedoch für eine generell gute Sensitivität des N-ELISAS.

3.2 Antikörper-Antwort nach Impfung mit MVA-N/ MVA-Sc im Mausmodell

Nach Etablierung der Anti-S und Anti-N-Antikörper-ELISA Tests wurden diese genutzt, um MVA-Sc/MVA-N geimpfte Mäuse auf eine Bildung S-/N-spezifischer Antikörper testen zu können. Getestet wurden die Mausseren nach *Prime*- und nach *Prime-Boost*-Impfung. Es erfolgte eine semiquantitative Bestimmung der Antikörpermenge über eine Endpunkttitration. Die Mikrotiterplatten für beide Testsysteme wurden jeweils mit einer Antigenkonzentration von 0,5 µg/ml *gecoatet*. Als Serumstartverdünnung wurde für den S-ELISA eine Verdünnung von 1:800 gewählt, für den N-ELISA eine Verdünnung von 1:50. Der Sekundärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:2000 genutzt. Als Negativkontrolle dienten Seren MVA-WT geimpfter Mäuse.

3.2.1 SARS-CoV-2 Nukleokapsid-Protein spezifische Antikörperantwort nach Impfung mit rekombinantem, SARS-CoV-2 Nukleokapsid produzierendem MVA (MVA-N)

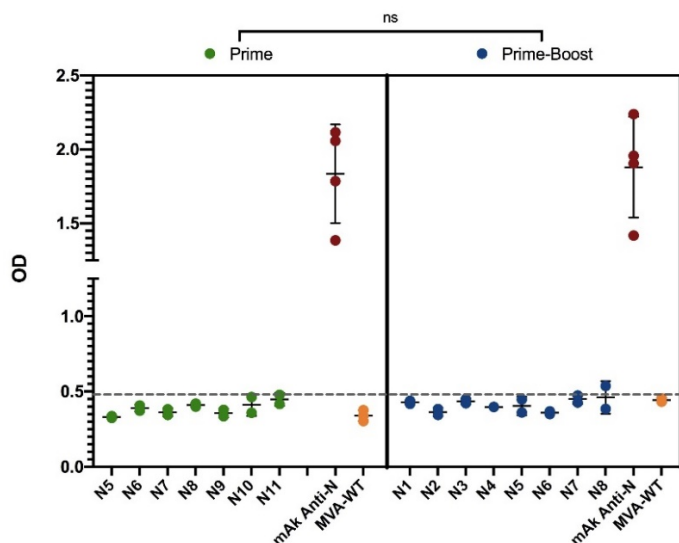


Abb. 17 MVA-N ist nicht in der Lage, eine im ELISA messbare Antikörperantwort im Mausmodell zu induzieren. Die Testung des Mausserums erfolgte an Tag 20 nach *Prime*-Impfung („*Prime*“) und an Tag 40 nach an Tag 30 erhaltener *Booster*-Impfung („*Prime-Boost*“). Dargestellt sind die gemessenen optische Dichte (OD) -Werte der niedrigsten getesteten Serumverdünnung (1:50) in einem laborinternen SARS-CoV-2 Anti-N-Antikörper ELISA. N1-N11 sind biologische Replikate, die Punkte deren technische Replikate. Die Seren wurden jeweils in zwei unabhängig voneinander durchgeführten ELISAs getestet. Die Linien repräsentieren den Mittelwert und die Standardabweichung der technischen Replikate. Als Positivkontrolle wurde ein monoklonaler Anti-N-Antikörper (mAk) in einer Konzentration von 50 ng/ml mitgeführt, als Negativkontrolle diente Serum MVA-WT geimpfter Mäuse. Die *Cutoff* OD von 0,47 entspricht dem OD-Mittelwert plus dreifacher Standardabweichung von allen Seren MVA-WT geimpfter Mäuse, die im ELISA in einer Serumverdünnung von 1:50 getestet wurden. Eine statistische Auswertung erfolgte mittels *nested t-test*. MVA= *Modified Vaccinia Virus Ankara*, N= Nukleokapsid, WT= Wildtyp, ns= nicht signifikant.

Sowohl nach *Prime*- als auch nach *Booster*-Impfung mit MVA-N sind in einer Serumverdünnung von 1:50 keine Anti-N-Antikörper im ELISA nachweisbar. Lediglich ein Messwert nach *Booster*-Impfung liegt oberhalb der *Cutoff*-OD (**Abb. 17**). Dieser liegt aber bei der Zweitestung desselben Serums unterhalb der *Cutoff*-Grenze und ist dementsprechend eher auf einen Messfehler als auf das Vorhandensein geringer Antikörpermengen zurückzuführen. Die OD-Werte des Serums MVA-WT geimpfter Mäuse als Negativkontrolle liegen regelrecht unterhalb der *Cutoff*-Grenze. Der Mittelwert der OD des monoklonalen Anti-N-Antikörpers liegt bei allen Testabläufen in einem ähnlichen Bereich, sodass hier von einer Konstanz im Messverfahren und von einer Funktionsfähigkeit des ELISAs ausgegangen werden kann.

3.2.2 SARS-CoV-2 Spike-Protein spezifische Antikörperantwort nach Impfung mit rekombinantem, SARS-CoV-2 Spike Protein produzierendem MVA (MVA-Sc)

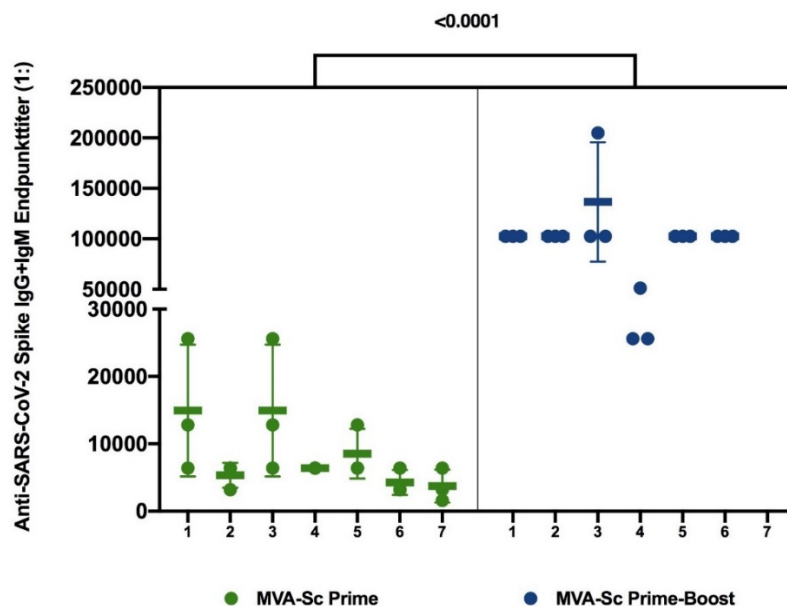


Abb. 18 MVA-Sc ist in der Lage, nach *Prime-Boost*-Impfung im Mausmodell hochtitrige Anti-S-Antikörper zu induzieren. Die Testung der Mausseren erfolgte an Tag 20 nach *Prime*-Impfung („*Prime*“) und an Tag 40 nach an Tag 30 erhaltener *Booster*-Impfung („*Prime-Boost*“). Dargestellt sind die Anti-SARS-CoV2-Spike IgG+IgM Titer. Diese wurden definiert über eine serielle Verdünnungstestung von Mausserum in einem laborinternen SARS-CoV2-Spike-Antikörper ELISA und sind dargestellt als Endpunktter, das heißt als höchste Serumverdünnung, in der noch Antikörper nachweisbar sind. Die Spalten 1-7 repräsentieren biologische Replikate, die einzelnen Punkte deren technische Replikate. Die Seren wurden jeweils in drei unabhängig voneinander durchgeführten ELISAs getestet. Die Linien repräsentieren den entsprechenden Mittelwert mit Standardabweichung. Als Negativkontrollen dienten Seren MVA-WT und PBS geimpfter Mäuse. Der *Cutoff* zur Definierung einer Endpunkttiterung entspricht dem Optische Dichte (OD)-Mittelwert plus dreifacher Standardabweichung von allen Seren MVA-WT geimpfter Mäuse in der niedrigsten verwendeten Serumverdünnung (1:800). Eine statistische Auswertung erfolgte mittels *nested t-test*. MVA= *Modified Vaccinia Virus Ankara*, Sc= Spike codonoptimiert, WT= Wildtyp, PBS= *Phosphate-Buffered Saline*, Ig=Immunglobulin.

Im S-ELISA zeigen sich bereits nach einmaliger Impfung („*Prime*“) mit MVA-Sc über die getesteten Mausseren hinweg hochtitrige Antikörperantworten, die nach *Booster*-Impfung („*Prime-Boost*“) nochmals signifikant bis zu Titern von 1:204800 ansteigen (vgl. **Abb. 18**). Dabei fallen die Endpunkttiter nach *Prime*-Impfung leicht heterogener aus als nach *Booster*-Impfung, in der nahezu alle getesteten Mausseren einen Titer von 1:102400 aufweisen.

Um auch eine Funktionsfähigkeit der nach Impfung mit MVA-Sc gebildeten Antikörper sicherzustellen, wurde ein Neutralisationstest mit verschiedenen SARS-CoV-2 Varianten durchgeführt. Hier wurden die Mausseren hinsichtlich ihres

Neutralisationsvermögens gegenüber dem SARS-CoV-2 „Wildtyp“ und den SARS-CoV-2 VOCs „Alpha“, „Beta“, „Delta“ und „Omikron“ getestet. Als Negativkontrollen wurden Seren MVA-WT und PBS geimpfter Mäuse mitgeführt. Als Positivkontrollen dienten Humanseren mit bekannten SARS-CoV-2 „Wildtyp“- Neutralisationstitern.

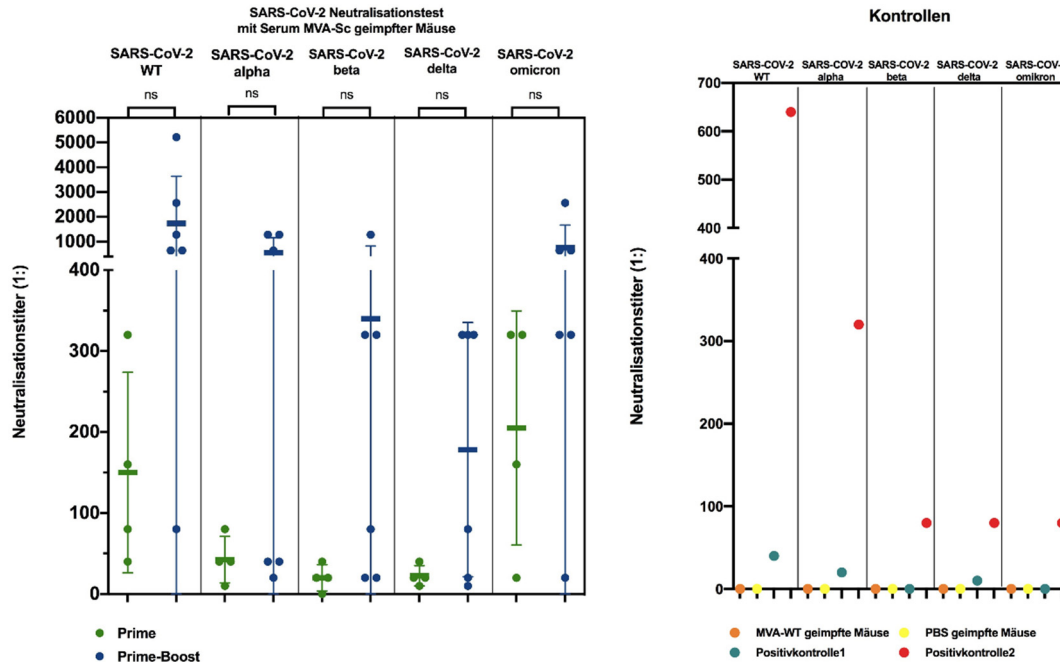


Abb. 19 MVA-Sc ist in der Lage, nach *Prime-Boost*-Impfung im Mausmodell Virusvarianten übergreifend neutralisierende Anti-S-Antikörper zu induzieren. Die Testung des Mausserums erfolgte an Tag 20 nach *Prime*-Impfung („*Prime*“) und an Tag 40 nach an Tag 30 erhaltener *Booster*-Impfung („*Prime-Boost*“). Dargestellt ist die Neutralisationskapazität der Spike-Antikörper gegenüber SARS-CoV-2 B.1 („Wildtyp“), SARS-CoV-2 B.1.1.7 („Alpha“), SARS-CoV-2 B.1.351 („Beta“), SARS-CoV-2 B.1.617.2 („Delta“) und SARS-CoV-2 B.1.1.529 („Omikron“). Diese wurde definiert über eine serielle Verdünnungsreihentestung von Mausserum mit SARS-CoV-2 Viren auf Vero-Zellen mittels zytopathischem Effekt (CPE). Die Neutralisationskapazität ist dargestellt als Neutralisations-Endpunkttiter, das heißt als die höchste Antikörperverdünnung, in der noch kein CPE sichtbar ist. Die einzelnen Punkte repräsentieren biologische Replikate. Die Testung erfolgte für jedes Serum einmalig und ohne technische Replikate. Dargestellt ist hier der Mittelwert der Neutralisationstiter der biologischen Replikate mit Standardabweichung. Als Positivkontrollen wurden zwei Humanseren mit bekanntem SARS-CoV-2 „Wildtyp“-Neutralisationstiter von 1:40 bzw. 1:640 verwendet. Als Negativkontrollen wurden Seren MVA-WT und PBS geimpfter Mäuse mitgeführt. Um die Vitalität und ein regelrechtes Wachstum verwendeter Zellen zu gewährleisten, wurde eine Zellwachstumskontrolle (nur Zellen) mitgeführt. Eine Viruskontrolle (Zellen und Virus) diente der Sicherstellung der Verursachung eines CPE durch das Virus in Abwesenheit von Antikörpern. Eine statistische Auswertung erfolgte mittels *Welch's t-test*. MVA= *Modified Vaccinia Virus Ankara*, Sc= Spike codonoptimiert, WT= Wildtyp, PBS= *Phosphate-Buffered Saline*.

Im Neutralisationstest zeigt sich im Vergleich zu den Ergebnissen des ELISAs ein deutlich heterogeneres Bild (vgl. **Abb.19**). Bereits nach der „*Prime*“-Impfung zeigen gebildete Antikörper eine durchweg nennenswerte neutralisierende Funktion, besonders gegenüber dem SARS-CoV-2 „Wildtyp“. Die Fähigkeit, das Virus zu

neutralisieren, sinkt gegenüber den SARS-CoV-2 Varianten „Alpha“, „Beta“ und „Delta“ deutlich ab, während die Neutralisationskapazität gegenüber „Omikron“ der „Wildtyp“-Neutralisationskapazität vergleichbar ist.

Ein ähnliches Verhalten zeigen Humanseren, die als Positivkontrolle mitgeführt wurden. Die Neutralisationstiter gegenüber dem SARS-CoV-2 „Wildtyp“ entsprechen den bereits vorab getesteten Titern. Gegenüber den SARS-CoV-2 Varianten nimmt die Neutralisationskapazität auch bei den Humanseren ab. Im Vergleich zu den Mausseren sinkt bei den Humanseren jedoch auch die Neutralisationskapazität gegenüber „Omikron“ auf ein den Varianten „Beta“ und „Delta“ vergleichbares Niveau.

Die *Booster*-Impfung steigert die Funktionalität der Antikörper hinsichtlich der Neutralisationskapazität gegenüber dem „Wildtyp“ und „Omikron“ in den meisten Mausseren. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Die Neutralisationskapazität gegenüber „Alpha“, „Beta“ und „Delta“ steigt nur bei der Hälfte der getesteten Mäuse an und bleibt bei den restlichen Tieren nahezu unverändert auf dem Level nach der *Prime*-Impfung.

Somit lassen sich für die hier getesteten Mausseren, auch virusvariantenübergreifend hohe Neutralisationskapazitäten gegenüber SARS-CoV-2 aufzeigen, jedoch scheint eine *Booster*-Impfung hinsichtlich der Neutralisationskapazität nicht allen Individuen einen signifikanten Vorteil zu bieten.

3.3 SARS-CoV-2 Spike- und Nukleokapsid spezifische T-zelluläre Immunantwort im HHD/DR1 transgenen Mausmodell nach Immunisierung mit rekombinantem, SARS-CoV-2 Spike- bzw. Nukleokapsidprotein produzierendem MVA

Für die Evaluation der T-zellulären Antwort nach Impfung mit MVA-Sc/ MVA-N wurde ein transgenes, HLA-A2.1 und HLA-DR1 basiertes Mausmodell verwendet, um humane HLA-A2.1 und HLA-DR1 restringierte T-Zell-Antworten abbilden zu können.

3.3.1 ***Ex vivo* Screening auf immunogene HLA A2.1 und HLA-DR1 restringierte Spike- und Nukleokapsid-Peptide hinsichtlich einer T-zellulären Immunantwort**

Zunächst wurde ein Screening auf S-/N-Peptide durchgeführt, die in der Lage waren, in diesem Mausmodell nach Impfung mit MVA-Sc /MVA-N spezifische T-Zellen zu induzieren. Dazu wurden Mäuse nach „*Prime-Boost*“- Impfung splenektomiert. Die

murinen Splenozyten wurden *ex vivo* mit verschiedenen SARS-CoV-2 S-/N-Peptiden koinkubiert. *In vivo* durch die Impfung aktivierte spezifische T-Zellen wurden dabei durch die Erkennung ihres Peptid epitops in MHC-Peptid-Komplexen zur Zytokinausschüttung stimuliert. Eine Zytokinausschüttung durch spezifische T-Zellen wurde anschließend über eine intrazelluläre Zytokinfärbung und FACS-Analyse detektiert. Die Ergebnisse der T-Zell-Antwort nach Impfung mit MVA-Sc und MVA-N sind in **Abb. 20** und **Abb. 21** gezeigt.

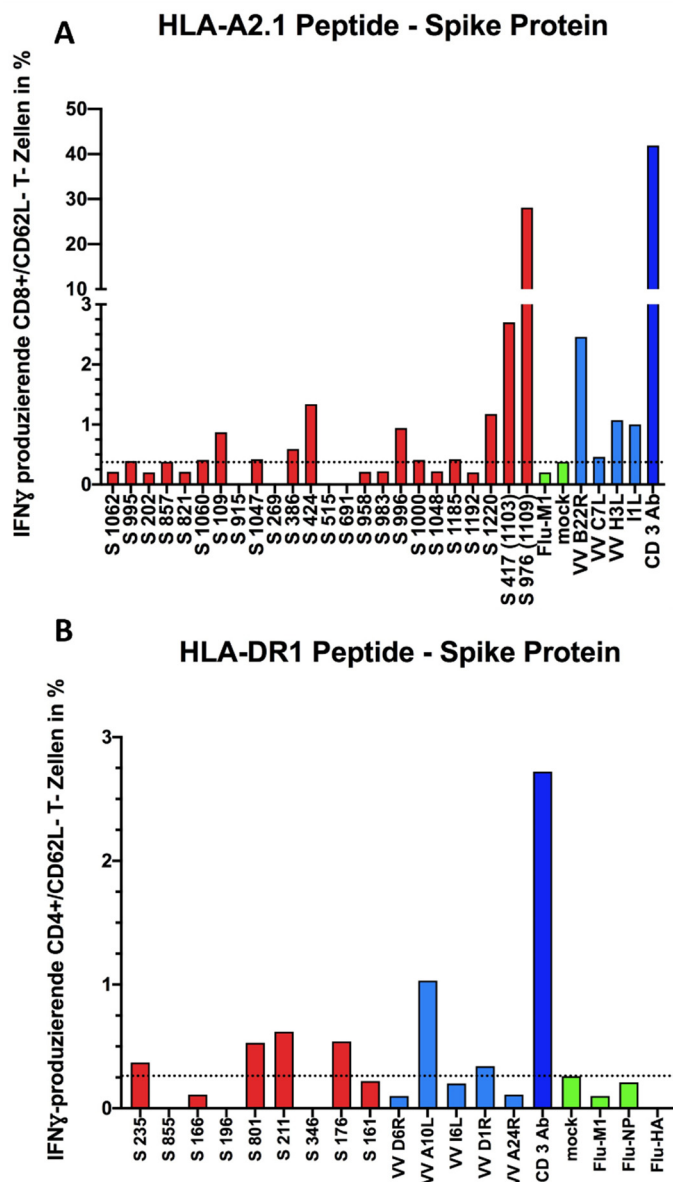


Abb. 20 MVA-Sc ist in der Lage, im Mausmodell Spike-spezifische CD8+ und CD4+ T-Zell-Antworten zu induzieren. Abgebildet ist der Anteil peptidspezifischer IFN γ (Interferon Gamma) produzierender CD8+ T-Zellen (A) bzw. CD4+ T-Zellen (B) an zirkulierenden aktivierten CD8+ bzw. CD4+ T-Zellen in Prozent, nach Immunisierung mit MVA-Sc. Die Immunisierung zweier Mäuse mit MVA-Sc erfolgte im „Short Prime-Boost“- Schema mit *Prime*-Impfung an Tag 0 und *Booster*-Impfung an Tag 5. Das Screening auf T-Zellen, die für die hier getesteten HLA-A2.1-

bzw. HLA-DR1 restringierten Peptide spezifisch sind, erfolgte an Tag 12 mittels intrazellulärer Zytokinfärbung und *Fluorescence activated cytometry* (FACS)-Analyse nach Splenektomie und *ex vivo* Inkubation muriner Splenozyten mit den verschiedenen Peptiden. Als Impferfolgskontrollen dienten HLA-A2.1 bzw. HLA-DR1 restringierte MVA Peptide (hellblau). Als Positivkontrolle wurde ein CD3 Antikörper mitgeführt, der eine unspezifische Stimulation aller aktivierten T-Zellen im Well induziert (dunkelblau). Als Negativkontrolle dienten nicht immunrelevante HLA-A2.1 bzw. HLA-DR1 restringierte Influenza-Peptide (grün) und eine Zellkontrolle ohne Peptidbeladung („mock“), die gleichzeitig zur Definition eines *Cutoffs* herangezogen wurde. MVA= *Modified Vaccinia Virus Ankara*, Sc= Spike codonoptimiert, HLA= Humanes Leukozyten Antigen, CD= *Cluster of differentiation*, S= Spike, VV= Vacciniavirus, Flu= Influenza.

Abb. 20 zeigt, dass sowohl Spike-spezifische CD4+ als auch CD8+ T-Zellen durch eine Impfung mit MVA-Sc induziert werden. Wie in **Abb. 20 A** ersichtlich, zeigen murine CD8+ T-Zellen eine sehr starke IFN γ Ausschüttung auf die Spike Peptide S417 (S 1103) und S976 (S 1109), während andere Spike-Peptide wie S109, S424, S996 und S1220 nennenswerte, jedoch deutlich schwächere T-zelluläre Antworten induzieren. Bei Betrachtung der Gesamtheit der aktivierten T-Zellen, die über den CD3 Antikörper stimuliert werden können, scheinen S976 (S 1109) spezifische T-Zellen fast den gesamten CD8+ T-zellulären Raum der Milz einzunehmen. Hinsichtlich der MVA spezifischen Peptide zeigt das Peptid B22R als Genprodukt der frühen viralen Genexpression die stärkste CD8+ T-zelluläre Antwort. Daher wurde es im Verlauf weiterführender Experimente als Kontrollpeptid für CD8+ T-Zellantworten ausgewählt. Die nach der intermediären bis späten Genexpression synthetisierten MVA Peptide H3L und I1L zeigen deutlich schwächere T-Zell-Antworten (vgl. **Abb. 20 A**).

Nach Impfung mit MVA-Sc sind ebenfalls nennenswerte CD4+ T-zelluläre Antworten, vor allem gegenüber den HLA-DR1-restringierten Spike-Peptiden S211, S801 und S176 messbar (vgl. **Abb. 20 B**). Jedoch zeigt sich hier keines der getesteten Peptide als deutlich immundominant. Das MVA Peptid VV A10L präsentiert sich als das HLA-DR1 restringierte Peptid mit der stärksten CD4+ T-zellulären Antwort und scheint daher im Vergleich zu den anderen getesteten MVA Peptiden am besten als Impferfolgskontrolle geeignet zu sein.

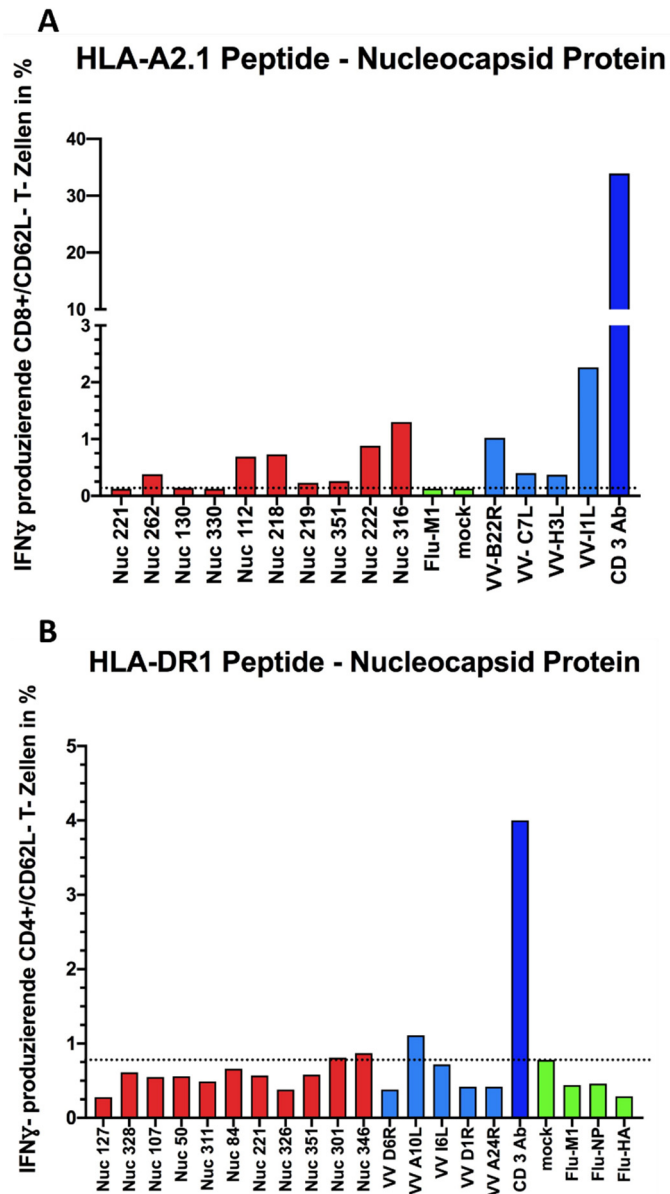


Abb. 21 MVA-N ist in der Lage, im Mausmodell schwache CD8+ T-Zell-Antworten, jedoch keine relevanten CD4+ T-Zell-Antworten zu induzieren. Abgebildet ist der Anteil peptidspezifischer, IFN γ (Interferon Gamma) produzierender CD8+ T-Zellen (A) bzw. CD4+ T-Zellen (B) an zirkulierenden, aktivierten CD8+ bzw. CD4+ T-Zellen in Prozent, nach Immunisierung mit MVA-N. Die Immunisierung zweier Mäuse mit MVA-N erfolgte im „Short Prime-Boost“- Schema mit *Prime*-Impfung an Tag 0 und *Booster*-Impfung an Tag 5. Das Screening auf T-Zellen, die für die hier getesteten Peptide spezifisch sind, erfolgte an Tag 12 mittels intrazellulärer Zytokinfärbung und *Fluorescence activated cytometry* (FACS)-Analyse nach Splenektomie und *ex vivo* Inkubation muriner Splenozyten mit verschiedenen Peptiden. Als Impferfolgskontrollen dienten HLA-A2.1 bzw. HLA-DR1 restringierte MVA Peptide (hellblau). Als Positivkontrolle wurde ein CD3 Antikörper mitgeführt, der eine unspezifische Stimulation aktivierter T-Zellen im Well induziert (dunkelblau). Als Negativkontrolle dienten nicht immunrelevante HLA-A2.1 bzw. HLA-DR1 restringierte Influenza-Peptide (grün) und eine Zellkontrolle ohne Peptidbeladung („mock“), die gleichzeitig zur Definition eines *Cutoffs* herangezogen wurde. MVA= *Modified Vaccinia Virus Ankara*, Nuc= Nukleokapsid, HLA= Humanes Leukozyten Antigen, CD= *Cluster of differentiation*, VV= Vacciniavirus, Flu= Influenza.

Auch nach Peptidstimulation mit HLA-A2.1 restringierten N-Peptiden ist eine CD8+ T-zelluläre Antwort messbar, wenn auch keines der getesteten Peptide als eindeutig immundominant definiert werden kann (vgl. **Abb. 21 A**). Insgesamt fällt die Stärke der CD8+ T-zellulären Antwort nach Impfung mit MVA-N jedoch deutlich geringer aus als nach Impfung mit MVA-Sc. Zu den Peptiden mit der deutlichsten Immunantwort gehören Nuc316 und Nuc222, danach folgen Nuc218 und Nuc112. Anders als nach Impfung mit MVA-Sc, dominiert bei den MVA Peptiden nach Impfung mit MVA-N das nach intermediärer bis später viraler Genexpression synthetisierte Peptid I1L (vgl. **Abb. 21 A**).

Bei der Testung HLA-DR1 restringierter Peptide des N-Proteins (vgl. **Abb. 21 B**) ist die Identifikation eines immundominanten Peptids aufgrund einer sehr hohen Hintergrundaktivität erschwert. Als einzige der hier getesteten Peptide liegen Nuc346 und Nuc301 über dem *Cutoff*. Von einer deutlichen spezifischen T-Zell-Reaktion kann hier jedoch nicht gesprochen werden. Von einem generellen Impferfolg ist durch die in **Abb. 21 A** dargestellte CD8+ T-zelluläre Reaktion und durch das Vorhandensein MVA spezifischer CD8+ und CD4+ T-Zellen (vgl. **Abb. 21 A, B**) auszugehen. Genau wie nach Impfung mit MVA-Sc, dominiert auch nach Impfung mit MVA-N VVA10L unter den MVA Peptiden die CD4+ T-zelluläre Antwort.

Zwischen der Menge, der mittels CD3-Antikörper stimulierbaren, aktivierten CD8+ (vgl. **Abb. 21 A**) bzw. CD4+ T-Zellen (vgl. **Abb. 21 B**) und der T-Zell-Reaktionen, auf die hier getesteten Peptide, besteht eine deutliche Diskrepanz.

Insgesamt sind sowohl nach Impfung mit MVA-Sc als auch nach Impfung mit MVA-N deutliche T-Zell-Reaktionen nachweisbar. Eine nennenswerte CD4+ T-Zell-Reaktion nach Impfung mit MVA-N ist jedoch nicht detektierbar.

3.3.2 *In vitro* Testung der Reaktivität SARS-CoV-2 S976 und S417 spezifischer muriner CD8+ T-Zellen mittels INF γ Ausschüttung auf endogen präsentierte Peptide durch HLA-A2.1 exprimierende Zellen.

Die im Screening als immundominant definierten SARS-CoV-2 Peptide wurden zur weiteren Untersuchung der, durch Impfung induzierten, T-Zellen *in vitro* ausgewählt. Dabei wurden die zwei HLA-A2.1 restringierten S-Peptide S976 und S417, die in der Lage waren, starke CD8+ T-Zell-Reaktionen *in vivo* zu induzieren, verwendet, um *in vitro* zwei T-Zelllinien zu etablieren. Zusätzlich wurde zur Infektionskontrolle eine B22R

spezifische T-Zelllinie etabliert. Die Kultivierung spezifischer CD8⁺ T-Zellen *in vitro* diente der Expansion der T-Zellen, um sie hinsichtlich ihrer Fähigkeit, endogen prozessierte Peptide durch MVA-Sc infizierte Zellen zu erkennen, untersuchen zu können. Die Dichte an spezifischem Peptid in MHC-Molekülen auf der Oberfläche MVA-Sc infizierter Zellen ist im Vergleich zu Zellen, die von exogen mit einem spezifischen Peptid beladen werden, wesentlich geringer. Entsprechend schwächer fallen T-Zell-Reaktionen auf die Präsentation endogen prozessierter Peptide aus. Dabei ist die absolute T-Zell-Zahl direkt *ex vivo* zu gering, um eine IFN γ Ausschüttung detektieren zu können.

Nach einer und fünf Restimulationen der T-Zellen mit ihrem spezifischen Peptid *in vitro* wurde die T-Zell-Reaktivität im Rahmen eines Assays untersucht. Dazu wurden die T-Zellen mit HLA-A2.1 exprimierenden SY-9287 Zellen koinkubiert, die entweder mit Peptiden von exogen beladen wurden oder mit MVA-Sc infiziert wurden. Als Negativkontrollen dienten nicht infizierte und nicht mit Peptid beladene Zellen, sowie Zellen, die mit einem HLA-A2.1 bindenden, aber irrelevanten Influenza-Peptid beladen wurden. MVA-WT infizierte Zellen dienten darüber hinaus den S-spezifischen T-Zelllinien als Negativkontrolle. Außerdem wurde in jeder T-Zelllinie auch die Reaktivität gegenüber den jeweils anderen hier verwendeten Peptide getestet. Dadurch kann gezeigt werden, wie viele T-Zellen noch in den Kulturen vorhanden sind, die von einer anderen als der gewünschten Spezifität sind.

Wie im Peptid Screening Assay, erfolgte auch hier eine anschließende intrazelluläre Zytokinfärbung mit FACS-Analyse, sodass die T-Zell-Reaktivität über eine Ausschüttung von IFN γ evaluiert werden konnte.

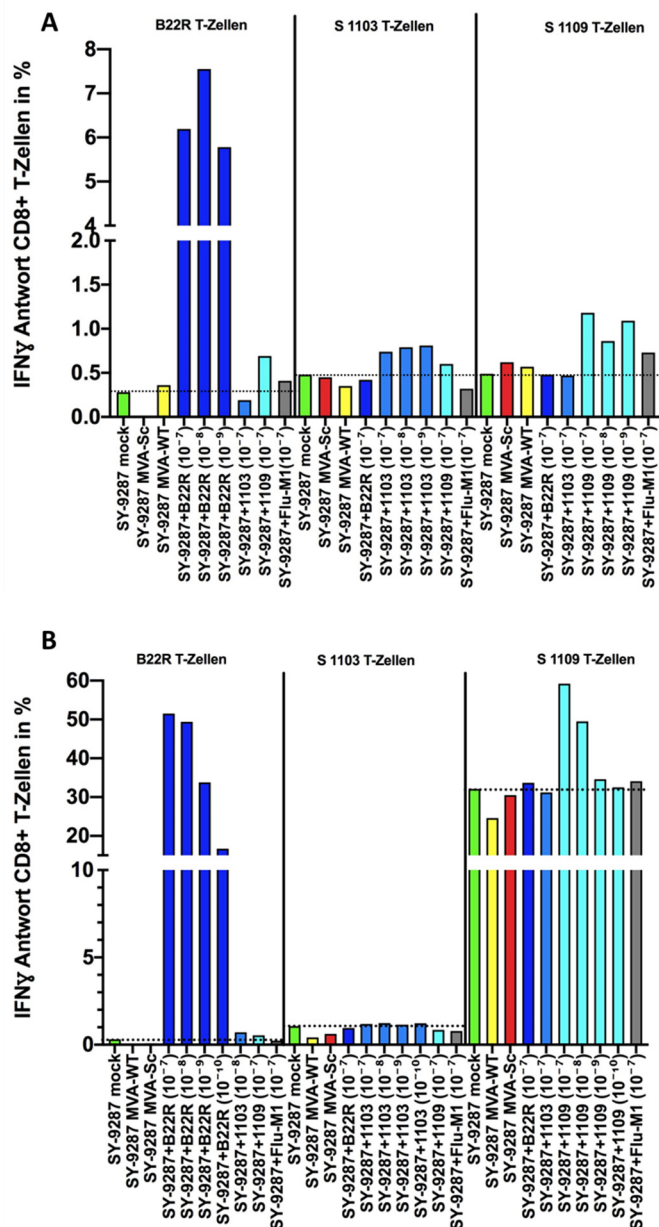


Abb. 22 SARS-CoV-2 Spike-spezifische murine CD8+ T-Zellen sind nach Isolation und mehrmaliger Restimulation *in vitro* nicht in der Lage, ihr Peptidepitop nach endogener Präsentation durch MVA-Sc infizierte Zellen zu erkennen. Abgebildet ist der Anteil IFN γ (Interferon Gamma) produzierender, peptidspezifischer CD8+ T-Zellen an allen CD8+ T-Zellen in Kultur in Prozent. Eine Messung erfolgte ausgehend von der Primärkultur nach einmaliger Restimulation (Passage 1) (A), bzw. nach fünfmaliger Restimulation (Passage 5) (B) *in vitro*. Eine Testung der Erkennung ihres Peptids nach endogener Peptidpräsentation erfolgte durch eine Koinkubation der T-Zellen mit HLA-A2.1 exprimierenden SY-9287 Zellen, die zuvor mit MVA-Sc (rot) oder MVA-WT(gelb) infiziert wurden. Eine Testung der Erkennung ihres Peptids durch exogene Peptidpräsentation erfolgte durch eine Koinkubation von T-Zellen mit peptidbeladenen SY-9287 Zellen (blau). Dabei wurden verschiedene Peptidkonzentrationen von 10⁻⁷- 10⁻¹⁰ molar getestet. Die Messung einer IFN γ Ausschüttung erfolgte mittels intrazellulärer Zytokinfärbung und *Fluorescence activated cytometry* (FACS)-Analyse. Das Verhältnis von SY-9287 Zellen und CD8+ T-Zellen betrug 1:1. Als Impferfolgskontrolle wurden MVA-spezifische murine CD8+ T-Zellen (VV B22R) mitgeführt, die ebenso wie die S-spezifischen T-Zellen nach Impfung mit MVA-Sc isoliert und *in vitro* durch Restimulation expandiert wurden. Als Negativkontrolle wurden mit Influenza-Peptid beladene SY-9287 Zellen mitgeführt (grau), sowie „mock“ Zellen (grün), d.h. nicht infizierte, nicht peptidbeladene SY-9287 Zellen, die gleichzeitig zur Definition eines *Cutoffs* herangezogen wurden. MVA= *Modified Vaccinia Virus Ankara*,

HLA= Humanes Leukozyten Antigen, CD= *Cluster of differentiation*, S= Spike, Sc= Spike codonoptimiert, WT= Wildtyp, VV= Vacciniavirus, Flu= Influenza.

Wie in **Abb. 22 A** sichtbar, zeigen bereits in Passage Eins bis zu 7,55 % der T-Zellen der B22R spezifischen T-Zelllinie eine IFN γ Ausschüttung nach exogener Peptidpräsentation. Dahingegen ist eine endogene Peptidpräsentation nach Infektion der SY-9287 Zellen mit MVA-Sc bzw. MVA-WT nicht in der Lage, eine T-Zell-Reaktion hervorzurufen. Die Spike-spezifischen CD8 $^{+}$ T-Zell-Linien S417 (S1103) und S976 (S1109) zeigen auch bei exogener Peptidpräsentation nur eine geringe Reaktivität (vgl. **Abb. 22 A**). Insgesamt ist die Hintergrundreaktivität von T-Zellen, die spezifisch für die anderen Peptide sind, in der ersten Passage noch relativ hoch, sodass beispielsweise auch in der Kultur S417 (S1103) spezifischer T-Zellen, Reaktionen gegen S976 (S1109) detektierbar sind. Allerdings scheinen auch unabhängig davon unspezifische Hintergrundaktivitäten in der Passage 1 hoch zu sein, denn auch nach Präsentation eines Influenzapeptids werden in der Kultur B22R- und S976 (S1109) spezifischer T-Zellen Messwerte über dem *Cutoff* detektiert.

Nach fünfmaliger Restimulation (vgl. **Abb. 22 B**) zeigt sich eine deutliche Steigerung der T-Zell-Reaktivität B22R-spezifischer CD8 T-Zellen auf eine exogene Peptidpräsentation. Hier zeigen bis zu 51,5% der B22R spezifischen T-Zellen eine IFN γ Ausschüttung. Auch die Hintergrundaktivität der T-Zellen gegenüber anderen Peptiden ist in Passage 5 deutlich reduziert. Nach endogener Peptidpräsentation durch MVA-Sc oder MVA-WT infizierte Zellen ist jedoch immer noch keine T-zelluläre Reaktion nachweisbar. Die Reaktivität S417 (S 1103) spezifischer CD8 $^{+}$ T-Zellen zeigt auch nach fünfmaliger Restimulation weder nach endogener, noch nach exogener Peptidpräsentation eine Zunahme (vgl. **Abb. 22 B**). Die Reaktivität S976 (S 1109) spezifischer CD8 $^{+}$ T-Zellen ist in dieser Passage aufgrund einer Überstimulation und einer hohen unspezifischen IFN γ - Ausschüttung in allen Proben nicht mehr beurteilbar, wenn auch mit großer Wahrscheinlichkeit darüber hinaus noch spezifische T-Zellen vorhanden sind (vgl. **Abb. 22 B**).

Zusammenfassend ist keine der etablierten T-Zelllinien in der Lage, ihr spezifisches Peptid nach endogener Prozessierung und Präsentation durch MVA-Sc infizierte Zellen zu erkennen. Die IFN γ Ausschüttung auf exogen präsentierte Peptide erfährt mit zunehmender Anzahl an Restimulationen in der Linie B22R spezifischer T-Zellen eine deutliche Steigerung. Dahingegen bleibt bei den S-spezifischen T-Zellen auch eine Steigerung der Reaktivität auf exogen präsentierte Peptide aus.

4 Diskussion

4.1 Bedeutung einer präformierten Immunantwort durch eine Impfung im Zusammenhang mit SARS-CoV-2

Bereits im Zusammenhang mit zahlreichen Infektionskrankheiten sind die Vorteile des Immunschutzes durch eine Impfung unumstritten. Auch bei SARS-CoV-2 erlangt eine präexistente Immunantwort vor Virusexposition durch eine Impfung besondere Bedeutung.

Ein charakteristischer Immunevasionsmechanismus von SARS-COV-2 ist eine Beeinträchtigung der Induktion von Typ I und III Interferonen nach Infektion [102]. Dadurch kommt es zu einer Verzögerung der Herstellung eines antiviralen Milieus, zu einer verspäteten Aktivierung des adaptiven Immunsystems und einer initial uneingeschränkten viralen Vermehrung [103].

Diesem Immunevasionsmechanismus kann ein gesundes Immunsystem üblicherweise mit einer suffizienten, wenn auch verzögerten, Antwort des adaptiven Immunsystems entgehen [103]. Eingeschränkt ist diese Möglichkeit jedoch beispielsweise bei älteren Menschen mit einem reduzierten Pool an naiven T-Zellen und einer entsprechend insuffizienten T-Zell-Reaktion und Antikörperantwort [104].

Während die meisten Fälle von COVID-19 in einer milden Infektion münden [13], können insuffiziente und unkoordinierte Immunantworten mit schweren Infektionsverläufen einhergehen [104]. Diese zeichnen sich durch erhöhte Level proinflammatorischer Zytokine und einer Invasion von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten an den Ort des Infektionsgeschehens aus [105]. In Kombination mit dem zytopathischen Effekt des Virus selbst kann eine dysregulierte Immunantwort zu einer schweren Schädigung des Lungengewebes führen [105].

Eine solche systemische Hyperinflammation könnte die Reaktion des angeborenen Immunsystems auf die verzögerte Rekrutierung des adaptiven Immunsystems bei fortlaufender viraler Replikation sein [103].

Einer Impfung kommt dieser Annahme zur Folge eine besondere Bedeutung zu, da sie eben diese Lücke zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort durch einen präformierten Pool an B- und T-Gedächtniszellen füllt und eine schnelle und suffiziente Immunantwort ermöglichen kann, die insbesondere der älteren und immunkompromittierten Bevölkerung zugutekommt [103].

4.2 Bedeutung der humoralen Immunantwort

Die humorale Immunantwort steht an der Schnittstelle zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem und fungiert als einer der ersten Akteure bei viralen Infektionen, sofern es sich um ein dem Immunsystem bereits bekanntes Pathogen handelt. Dabei verhindern Antikörper extrazellulär einen Eintritt des Virus in die Wirtszelle und können auf diesem Wege eine neutralisierende Funktion ausüben. Darüber hinaus können sie bereits virusinfizierte Zellen durch eine Expression viraler Proteine an der Zelloberfläche erkennen und über eine Fc-vermittelte Zytotoxizität indirekt zur „viralen Clearance“ beitragen [106].

Im Vergleich zu anderen Komponenten der adaptiven Immunantwort sind neutralisierende Antikörper in einer natürlichen COVID-19 Erstinfektionen nicht mit einem mildereren Verlauf assoziiert bzw. zur Infektionskontrolle nicht erforderlich, sofern CD4+ und CD8+ T-Zellen vorhanden sind [104]. Dies könnte darin begründet liegen, dass Zellen bereits infiziert sind und die Virusreplikation schon fortgeschritten ist bis sich eine suffiziente Antikörperantwort entwickelt hat [103].

Im Hinblick auf eine Reinfektion oder einen Viruskontakt nach Impfung, kommt präformierten neutralisierenden Antikörpern jedoch eine hohe protektive Bedeutung zu, da sie die virale Vermehrung bereits in einer frühen Phase der Infektion begrenzen können [103] und so zu einer raschen Infektionskontrolle beitragen.

4.2.1 MVA-Sc ist in der Lage, im Mausmodell Virusvarianten übergreifend neutralisierende Anti-S-Antikörper zu induzieren

Durch seine Oberflächenlokalisation und seine Schlüsselrolle beim Eintritt in die Wirtszelle, gilt das S-Protein bzw. die RBD, als wichtigstes Ziel neutralisierender Antikörper [107]. Impfstoffe, die bereits in klinischem Einsatz sind (vgl. **Tabelle 2**), basieren aufgrund dieser herausragenden Bedeutung, im Rahmen der Etablierung eines Immunschutzes, auf dem S-Protein.

Ebenso wurden bereits verschiedene MVA basierte SARS-CoV-2 Impfstoffe, die das S-Protein exprimieren, in präklinischen Studien getestet und haben sich bezüglich der Induktion potenter, VOC-übergreifender Antikörperantworten im Tiermodell als sehr wirksam erwiesen [108-116].

Wie oben gezeigt, ist rekombinantes MVA-Sc ebenfalls in der Lage, eine effektive humorale Immunantwort im Mausmodell zu induzieren. Nach *Prime*- und vor allem nach *Booster*-Impfung, liegen hohe Titer S-bindender Antikörper vor (vgl. **Abb. 18**). Auch qualitativ, im Hinblick auf ihre neutralisierende Kapazität, erweisen sie sich nicht nur im Zusammenhang mit der SARS-CoV-2 D614G Variante („Wildtyp“) als effektiv, sondern besitzen auch neutralisierende Kapazität gegenüber den hier getesteten Varianten „Alpha“, „Beta“, „Delta“ und „Omikron“, wenn auch mit einer abnehmenden Tendenz (vgl. **Abb. 19**). Die geringste neutralisierende Kapazität nach Impfung mit MVA-Sc zeigt sich dabei gegenüber der Delta-Variante.

Davon abweichend zeigen andere MVA-S basierte Impfstoffe in präklinischen Studien die geringste neutralisierende Kapazität gegenüber „Omikron“ [108, 110, 111, 115], ebenso wie die durch mRNA-Impfstoffe induzierten Antikörper im klinischen Kontext [117]. Die abnehmende Wirksamkeit neutralisierender Antikörper gegenüber „Omikron“, ist durch den Reichtum an Mutationen im S-Protein dieser Virusvariante durchaus zu erwarten.

Entgegen dieser Erwartungen zeigt sich nach Impfung mit MVA-Sc im Mausmodell eine hohe Neutralisationskapazität gegenüber der Omikron-Variante, die dem ursprünglichen „Wildtyp“ nahe kommt (vgl. **Abb. 19**). Die Annahme eines mausspezifischen Phänomens hinsichtlich der hohen Neutralisationskapazität gegenüber „Omikron“ ist unwahrscheinlich, da andere MVA-basierte Impfstoffkandidaten ebenfalls eine deutliche Abnahme der Neutralisationskapazität in C57BL/6 Mäusen zeigten [110, 115]. Da der Neutralisationstest mit der Omikron-Variante nur in einem Testansatz durchgeführt wurde, ist die Aussagekraft der Ergebnisse dennoch begrenzt. Eine Wiederholung des Neutralisationstestes mit weiteren Mäusen wäre notwendig, um die Ergebnisse verifizieren zu können.

Während die Menge gebildeter Antikörper nach *Prime* und nach *Prime-Boost*-Impfung unter den getesteten Mäusen sehr vergleichbar ist und sich ein signifikanter Anstieg bindender Antikörper nach *Booster*-Impfung zeigen lässt (vgl. **Abb. 18**), variieren die Neutralisationstitern unter den Mäusen nach *Booster*-Impfung stark (vgl. **Abb. 19**). Dadurch ist, trotz einer deutlichen Funktionalitätssteigerung der gebildeten Antikörper in einzelnen Tieren, kein signifikanter Unterschied im Vergleich zum Zustand nach *Prime*-Impfung darstellbar. Trotz genetischer Ähnlichkeit der verwendeten Mäuse, ist eine Individualität hinsichtlich der Qualität der Immunantwort nicht ungewöhnlich. So zeigt sich auch in anderen Studien, in denen die quantitative und qualitative

Antikörperantwort in BALB/c Mäusen untersucht wurde, eine große interindividuelle Diversität hinsichtlich der Titer bindender bzw. neutralisierender Antikörper [83, 108].

Nichtsdestotrotz ist die hier gezeigte hohe Neutralisationskapazität gegenüber der Omikron-Variante, unter den hier diskutierten MVA-S Impfstoffen, die ebenfalls auf der ursprünglichen Wuhan-Variante basieren, soweit bekannt, im präklinischen Setting ein Alleinstellungsmerkmal. Die Ursache für die hohe Qualität gebildeter Antikörper gegenüber der Omikronvariante nach Impfung mit MVA-Sc ist nicht bekannt, könnte aber Bestandteil weiterer Forschung sein und bietet Anhalt für eine gute Kreuzreaktivität gegenüber anderen Omikron-Subvarianten.

Die mitgeführten Positivkontrollen, die Humansenen mit hohen und niedrigen Neutralisationstitern entsprechen, zeigen ein den getesteten Mausseren sehr vergleichbares Neutralisationsverhalten, ausgenommen der Omikron-Variante, die in den humanen Kontrollseren vielmehr der geringen Neutralisationskapazität gegenüber der Beta- und Delta- Variante vergleichbar ist (vgl. **Abb. 19**). Insgesamt werden die Virusvarianten durch das Humanserum in wesentlich geringerem Ausmaß neutralisiert, als es bei den getesteten Mausseren der Fall ist. Fraglich ist jedoch inwieweit die getesteten humanen Seren mit den Mausseren vergleichbar sind, da hier die Zeitpunkte einer durchgemachten Infektion bzw. einer erhaltenen Impfung unbekannt sind und die neutralisierende Kapazität gebildeter Antikörper bekanntlich im Laufe der Zeit abnimmt [117].

Nach zweimaliger Impfung mit mRNA Impfstoffen gebildete Antikörper zeigen ebenfalls initial eine potente Kreuzreaktivität gegenüber der D614G Variante und den hier getesteten VOCs, außer der Omikronvariante, dahingegen aber eine deutliche Funktionsabnahme über einen Beobachtungszeitraum von 6 Monaten [117]. Da die Mausseren in diesem Projekt nur in einem begrenztem Zeitraum nach Impfung getestet wurden, ist die Aussagekraft hinsichtlich des langfristigen Verhaltens gebildeter Antikörper limitiert und müsste durch eine Ausweitung des Beobachtungszeitraumes ergänzt werden.

Wie auch andere MVA-S Impfstoffstudien belegen, ist eine Zweifachimpfung hinsichtlich einer effektiven Antikörperantwort zu favorisieren, da dies, wie auch nach Impfung mit MVA-Sc gezeigt (vgl. **Abb. 18, Abb. 19**), nicht nur einen Anstieg bindender Antikörper, sondern auch eine Funktionalitätssteigerung zur Folge hat [81, 83-85, 108, 109, 111, 112, 115].

Präklinische und klinische Studien gaben Hinweise darauf, dass vor allem SARS-CoV-2 Infektionen zu einer effektiven *Boosterung* des Neutralisationsvermögens gebildeter

Antikörper führen können [112, 117, 118]. Über einen solchen *Booster*-Effekt hinaus, kann der Vorteil einer natürlichen Infektion darin bestehen, über den direkten Kontakt des Virus mit dem respiratorischen Epithel eine mukosale Immunität durch Bildung spezifischer IgA-Antikörper zu induzieren [119]. In den Schleimhäuten des Respirationstraktes induzierte Antikörper sind in der Lage, schneller am Ort des Viruseintrittes vor einer Infektion zu schützen und im Sinne einer sterilen Immunität auch die lokale Virusreplikation zu verhindern [119].

Eine solche mukosale Immunität könnte ebenfalls mit einem MVA-basierten Impfstoff induziert werden. Diverse Studien haben den intranasalen Impfweg im Zusammenhang mit einem MVA-basierten SARS-CoV-2 Impfstoff bereits präklinisch getestet [110, 113-115] und sein Potential vor allem in der initialen Phase einer Exposition gegenüber dem Virus aufgezeigt. Zusätzlich wird aber auch ein wirksamer systemischer Immunschutz etabliert, der dem einer intramuskulären (i.m.) Impfung vergleichbar ist [115]. Ein inhalativer MVA basierter Impfstoff wird außerdem bereits im Rahmen einer klinischen Phase I Studie getestet (NCT05226390, ClinicalTrials.org). Ein Einsatz von MVA-Sc auf mukosalem Wege wäre ebenfalls denkbar und könnte eine Rolle in zukünftigen Experimenten spielen.

4.2.2 MVA-N ist nicht in der Lage, eine im ELISA messbare Antikörperantwort im Mausmodell zu induzieren

Eine Anti-N-Antikörperantwort hat im Vergleich zu Anti-S-Antikörpern zwar keine neutralisierende Funktion und kann eine Infektion nicht verhindern, komplementiert die Immunantwort jedoch durch andere antikörpervermittelte Funktionen und zeigt so ebenfalls protektiven Charakter [120]. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass ein monoklonaler N-spezifischer Antikörper im Mausmodell in der Lage ist, bei prophylaktischer Gabe vor SARS-CoV-2 *Challenge* die Viruslast im Verlauf der Infektion zu senken und so zur Infektionskontrolle beizutragen [120].

SARS-CoV-2 nutzt zur initialen Expansion neben der direkten Infektion einer Zelle, eine interzelluläre Transmission durch Zell-Zell-Kontakte [121]. An dieser Stelle können neutralisierende Antikörper ihre protektive Wirkung nicht entfalten [121]. Dadurch, dass nennenswerte Mengen an N-Protein in infizierten Zellen auch an die Zelloberfläche gelangen, können spezifische Anti-N-Antikörper mit bereits infizierten Zellen interagieren, durch eine Antikörper-vermittelte Zytotoxizität zur Viruseliminierung beitragen und so die Funktion neutralisierender Antikörper ergänzen [120, 122, 123].

Nach Infektion mit SARS-CoV-2 sind initial in den meisten Rekonvaleszentenseren starke Anti-N-Antikörperantworten messbar [44]. Teilweise bleibt eine Anti-N-Antikörperantwort nach Infektion jedoch aus. Dies konnte vor allem in milderen Infektionsverläufen beobachtet werden und könnte auf eine schnelle initiale Viruseliminierung und eine geringe virale Replikation zurückgeführt werden [44, 124].

Auch nach Impfung mit MVA-N sind in keiner der nach *Prime*- bzw. nach *Booster*-Impfung getesteten Mäuse Anti-N-Antikörper detektierbar (vgl. **Abb. 17**). Die Validität des ELISAS ist durch das Mitführen eines monoklonalen Anti-N-Antikörpers als Positivkontrolle sichergestellt.

Die ausbleibende Antikörperantwort nach Impfung mit MVA-N könnte aus einem unzureichenden Kontakt zwischen B-Zellen und dem N-Protein resultieren. Da nach einer Impfung mit MVA-N auch eine T-Zell-Hilfe in Form N-spezifischer CD4+ T-Zellen ausbleibt (siehe **Abb. 21 B**), ist anzunehmen, dass eine Präsentation der hier getesteten N-Peptidpeptide in Antigenpräsentierenden Zellen nicht in ausreichendem Maße stattfindet.

Eine Erklärung, sowohl für die unzureichende Induktion von T-Zellen, als auch für den fehlenden Kontakt zu B-Zellen, könnte ein zelltypabhängiger proteolytischer Abbau des N-Proteins nach Synthese sein. In vorherigen Analysen nach Infektion von Zellen mit MVA-N, wurde gezeigt, dass das N-Protein nach Infektion der Zellen mit MVA-N synthetisiert wird, jedoch zelltypabhängig, vermutlich posttranskriptionell, modifiziert wird [90]. Nach Transkription und Translation liegt dadurch nicht nur das Volllängen N-Protein vor, sondern darüber hinaus verschiedene andere N-spezifische Produkte mit anderem Molekulargewicht [90]. Auch in anderen Studien wurde eine proteolytische Prozessierung des N-Proteins und die Entstehung verschiedener, vermutlich funktionell relevanter N-Proteoformen beschrieben [125, 126].

Bekannt ist außerdem, dass das N-Protein nicht nur im Zytoplasma der Zelle lokalisiert ist, sondern auch im Zellkern zu finden ist [126]. Ebenso ist dies auch bei den verschiedenen N-Proteoformen denkbar [126]. Eine aktive nukleäre Migration wird durch *Nuclear localization signals* (NLS) initiiert [126]. In der C-terminalen Domäne (CTD) des N-Proteins scheint vorwiegend die NLS 2 für die Migration in den Kern verantwortlich zu sein [126]. C-terminale Proteoformen zeigen im Vergleich zur N-terminalen eine wesentlich stärkere Interaktion mit Rekonvaleszenten-Plasma, was vermuten lässt, dass antigene Epitope vorwiegend im Bereich der CTD lokalisiert sind [125]. Somit wäre es möglich, dass immunogene N-Epitope durch fehlende

zytoplasmatische Verfügbarkeit von C-terminalen Proteoformen, dem Immunsystem nicht zugänglich sind.

Da andere N-basierte virale Vektorimpfstoffe jedoch in der Lage sind, N-spezifische Antikörperantworten zu induzieren [86, 127], sprechen diese Ergebnisse und Überlegungen für ein MVA-N spezifisches Phänomen, das weiterer Klärung bedarf.

Mögliche zukünftige Experimente könnten darin bestehen, eine Migration des N-Proteins in den Kern durch Sequenzmodifikation des N-Proteins im Sinne einer Mutation der NLS2 zu verhindern [90], um so eine zytoplasmatische Lokalisation der CTD des N-Proteins aufrechtzuerhalten und dadurch eine Induktion einer Anti-N-Antikörperantwort nach Impfung mit MVA-N zu ermöglichen.

4.3 Bedeutung der T-zellulären Immunantwort im Zusammenhang mit SARS-CoV-2

Die T-zelluläre Antwort ist ein wichtiger Bestandteil der adaptiven Immunantwort im Rahmen der Bekämpfung einer viralen Infektion. Eine Rolle spielen hier sowohl CD4+ T- Zellen, als auch CD8+ T-Zellen. Die CD4+ T-Zellen unterteilt man nochmals, je nach Effektorfunktion, in unterschiedliche CD4+ T-Zell-Subtypen, wobei zur Viruseliminierung insbesondere IFN γ produzierende T-Helferzellen (Th1- Zellen) neben T-follikulären Helferzellen (T_H-Zellen) relevant sind [128]. Th1-Zellen helfen dabei, über eine Aktivierung von Makrophagen, intrazelluläre Pathogene zu bekämpfen und regen B-Zellen nach Antigenerkennung zur Differenzierung, Reifung und Produktion spezifischer Antikörper an [128]. Außerdem ist eine T-Zell-Hilfe auch bei der Aktivierung von CD8+T-Zellen notwendig, bei der eine alleinige Stimulation durch Antigenpräsentierende Zellen häufig nicht ausreicht [128]. Th1-Zellen können darüber hinaus MHC Klasse II-restringiert selbst zytotoxische Funktion ausüben [103]. Aktivierte CD8+ T-Zellen induzieren nach Erkennung ihrer Zielstruktur in MHC Klasse I Molekülen auf der Oberfläche der infizierten Zelle eine Apoptose und können so direkt virusbefallene Zellen eliminieren [128].

Im Gegensatz zu neutralisierenden Antikörpern haben sich T-Zellen in primären SARS-CoV-2 Infektionen als unverzichtbar und als wesentlicher Faktor zur Kontrolle der Infektion erwiesen [104]. Sowohl das Vorhandensein SARS-CoV-2 spezifischer CD4+ T-Zellen als auch das von CD8+T-Zellen ist mit einem besseren Outcome assoziiert [104]. Vor allem die rasche Induktion SARS-CoV-2 spezifischer T-Zellen während der

akuten Phase der Infektion resultiert in einer mildereren Symptomatik und einer kürzeren Erkrankungsdauer [129].

Auch hinsichtlich eines langfristigen Immunschutzes unter dem Auftreten von Virusvarianten kommt T-Gedächtniszellen eine besondere Bedeutung zu. Während die zu Beginn der Pandemie präformierte Antikörper-Antwort in ihrer Wirksamkeit gegenüber den zahlreichen, im Laufe der Zeit aufgetretenen SARS-CoV-2 VOCs beeinträchtigt ist, ist eine Abnahme der T-Zell-Effektivität in wesentlich geringerem Ausmaß zu erwarten [130]. Im Zuge einer SARS-CoV-2 Infektion wird im Individuum ein breites Repertoire an SARS-CoV-2 Epitopen durch humane T-Zellen erkannt [100]. Gegenüber SARS-CoV-2 VOCs wie der Alpha- und Beta-Variante ist die T-Zell-Reaktivität in keinem signifikanten Ausmaß reduziert [131]. Die Epitope selbst sind in oben genannten SARS-CoV-2 VOCs weitestgehend konserviert [131]. Trotz des Reichtums an Mutationen in der Omikron-Variante zeigt sich auch hier eine überwiegend erhaltene Kreuzreaktivität von CD4+ und CD8+ T-Zellen [130]. Lediglich einzelne HLA-Subgruppen könnten von einer mutationsbedingten, verminderten Peptidpräsentation und einer entsprechend beeinträchtigten T-Zell-Antwort betroffen sein [132]. Eine generelle T-zelluläre Immunevasion durch Mutationen erscheint auch für zukünftig auftretende Virusvarianten aufgrund der hohen Diversität an HLA-Molekülen in der menschlichen Population und der Breite der T-zellulären Reaktion jedes Individuums unwahrscheinlich [97].

4.3.1 MVA-Sc und MVA-N sind in der Lage, im Mausmodell SARS-COV-2 S- bzw. N-spezifische T-Zellen zu induzieren

Wie oben beschrieben, sind T-Zellen im Rahmen eines Immunschutzes vor einer SARS-CoV-2 Infektion von herausragender Bedeutung. Bei der Etablierung eines wirksamen Impfstoffes ist die Induktion einer effektiven T-Zell-Antwort entsprechend essentiell. In diesem Projekt wurde die Induktion SARS-CoV-2 spezifischer T-Zellen nach Impfung mit rekombinanten MVA-Vektoren in einem humanisierten Mausmodell untersucht. Dieses Mausmodell ist transgen für humane MHC Klasse I und MHC Klasse II Moleküle und erlaubt die Detektion HLA-A2.1 und HLA-DR1 restringierter SARS-CoV-2 spezifischer T-Zell-Antworten.

HLA-A2.1 ist weltweit eines der meist verbreiteten MHC Klasse I Moleküle [133, 134] und bietet damit das Potential, die SARS-CoV-2 spezifische T-Zell-Antwort für eine

breite Bevölkerungsgruppe abzubilden. Auch HLA-DR1 wird von einem nennenswerten Anteil der menschlichen Population exprimiert [92].

Für das Screening auf SARS-CoV-2- Peptide, die in der Lage sind, nach Impfung mit MVA-Sc/ MVA-N spezifische T-Zellen zu induzieren, wurden HLA-A2.1 und HLA-DR1-restringierte Peptide anhand der derzeit verfügbaren Literatur ausgewählt, die messbare spezifische T-Zell-Reaktionen im Rahmen einer natürlichen SARS-CoV-2 Infektion induzieren konnten [97]. Die HLA-Restriktion wurde dort überwiegend über *in silico* Bindungsmodelle definiert oder durch überlappende Peptidsequenzen getestet [97]. Aussagen bezüglich der Immunprävalenz bzw. Immundominanz der beschriebenen und ausgewählten Peptidepitope sind durch teilweise kleine Studienpopulationen, durch eine begrenzte Diversität an getesteten HLA-Subtypen, und durch eine teilweise gezielte Testung einzelner Peptide, statt vollständiger Proteinsequenzen, nur eingeschränkt möglich [97]. Darüber hinaus wurden unterschiedliche Testmethoden verwendet, die gegebenenfalls auch funktionell nicht relevante T-Zell-Antworten abbilden [97].

Die Immunogenität eines Peptids innerhalb eines Antigens ist von zahlreichen Faktoren abhängig: Eine Rolle spielen dabei zum Beispiel die Verfügbarkeit des Peptids innerhalb der Zelle, die Effektivität der Prozessierung, die Passgenauigkeit in die verfügbaren MHC-Moleküle, das vorhandene Repertoire an naiven T-Zellen [97] und die Fähigkeit, den MHC-Peptid-Komplex ausreichend lang auf der Zelle stabilisieren zu können [133]. Entsprechend unterschiedlich immunogen können Peptidepitope in verschiedenen Individuen sein.

Nach Impfung mit MVA-Sc im HHD/DR1 Mausmodell zeigt die CD8⁺ T-Zell-Antwort auf HLA-A2.1-restringierte SARS-CoV-2 Spike-Peptide eine sehr starke Reaktion gegenüber den Peptidepitopen S417 (S1103) und S976 (S1109), für die die Mehrheit aller aktivierbaren T-Zellen spezifisch zu sein scheinen (vgl. **Abb. 20 A**). Das in der Literatur für den Menschen am häufigsten als immunogen beschriebene HLA-A2.1 restringierte Spike Epitop S269 [97] zeigt dahingegen in unserem Assay keine messbare Reaktion (vgl. **Abb. 20 A**). T-Zell-Reaktionen auf S417 und S976 sind in Studien im Zusammenhang mit einer natürlichen SARS-CoV-2 Infektion ebenfalls beschrieben [135, 136]. Beide Peptide wurden außerdem über ihre HLA-Bindeeigenschaften als vielversprechende T-Zell-Epitope eingestuft [137, 138]. Die sehr schmale, aber starke Antwort auf die Peptidepitope S417 (S1103) und S976 (S1109) nach Impfung mit MVA-Sc könnte durch die geringe absolute Anzahl an verfügbaren naiven T-Zellen in HHD/DR1-Mäusen erklärt werden [93] und spricht für

eine hohe Immunogenität der Epitope im Kontext der im Mausmodell vorliegenden Ausstattung an MHC-Molekülen. Zusammenfassend kann nach Impfung mit MVA-Sc von einer sehr effektiven Induktion S-spezifischer CD8⁺ T-Zellen ausgegangen werden.

Die spezifische CD8⁺ T-Zell-Antwort auf HLA-A2.1 restringierte SARS-CoV-2 N-Peptide fällt deutlich geringer, aber diverser aus (vgl. **Abb. 21 A**). Da generell eine Induktion von N-spezifischen CD8⁺ T-Zellen möglich ist, scheint die unter **4.2.2** beschriebene Degradierung des N-Proteins nach Synthese, die Präsentation von N-Peptiden in MHC Klasse I Molekülen nicht in gleichem Maß zu beeinträchtigen wie die in MHC Klasse II Molekülen. Möglicherweise könnte der Faktor Zeit hier eine entscheidende Rolle spielen. Während in Antigenpräsentierenden Zellen sechs Stunden nach Infektion mit MVA-N noch das Vollängen-N-Protein detektiert werden konnte, scheint dieses 24 Stunden nach Infektion partiell degradiert zu sein [90].

Trotzdem wäre es denkbar, dass das CD8⁺ T-Zell-*Priming* durch die unzureichende Stabilität des N-Proteins ebenfalls beeinträchtigt ist. Eine wichtige Rolle für ein effizientes T-Zell-*Priming* im Zusammenhang mit rekombinantem MVA spielt die Kreuzpräsentation der Peptidepitope über professionelle Antigenpräsentierende Zellen [139]. Durch die rasche Degradierung des N-Proteins, findet eine solche Kreuzpräsentation hier möglicherweise nur in geringerem Maße statt. Der andere Weg der endogenen Prozessierung und Präsentation der N-Peptide spielt dahingegen für ein *Priming* der CD8⁺ T-Zellen in den meisten Fällen nur eine untergeordnete Rolle [139].

Die schwächere Reaktion N-spezifischer CD8⁺ T-Zellen könnte zudem durch eine ausbleibende T-Zell-Hilfe bedingt sein (vgl. **Abb. 21 B**).

Eine andere mögliche Erklärung wäre, dass einige HLA-A2.1 restringierte N-Peptide generell nicht in der Lage sind, den MHC-Peptid Komplex ausreichend lange auf der Zelloberfläche zu stabilisieren, um T-Zellen effizient primen zu können [133]. Konform mit der bei uns gemessenen, stärksten CD8⁺ T-Zell-Reaktion auf die N-Peptide Nuc222 und Nuc316, können diese, im Vergleich zu anderen, in der Studie von Szeto *et al.* getesteten Peptiden, den MHC Klasse I-Peptid-Komplex am effektivsten auf der Zelloberfläche stabilisieren [133]. Auch in anderen Studienpopulationen konnten Nuc222 [98, 100, 136, 140, 141] und Nuc316 [100, 136, 141, 142] spezifische T-Zellen induzieren.

Interessanterweise scheint das N-Gen einen Einfluss auf die Immunogenität bzw. die Synthese der MVA-Proteine zu haben. Nach Impfung mit MVA-Sc dominiert das B22R-

abgeleitete MVA-Peptid die CD8+T-Zell-Antwort (vgl. **Abb. 20 A**). Dahingegen induziert nach Impfung mit MVA-N das MVA-Peptid aus I1L die höchste T-Zell-Antwort (vgl. **Abb. 21 A**). B22R gehört zu den Proteinen, die früh in MVA- infizierten Zellen synthetisiert werden und üblicherweise die T-Zell-Antworten nach *Booster*-Impfung gegenüber denen der spät synthetisierten Proteine wie I1L dominieren [143]. Dies ist vor allem durch einen Verbleib von spät synthetisierten Proteinen in Virosomen (vgl. **Abb. 5**) und einen entsprechend fehlenden bzw. verzögerten Zugang zur Antigenprozessierung für die Präsentation in MHC Molekülen bedingt, sodass T-Zellen, die spezifisch für früh synthetisierte Proteine sind, einen Proliferationsvorteil erlangen [144]. Da I1L nach *Prime-Boost*-Impfung mit MVA-N, die MVA-spezifische T-Zell-Antwort dominiert, ist ein Einfluss des N-Gens auf die Synthese von MVA-Proteinen, bzw. auf deren Prozessierung innerhalb der infizierten Zelle zu diskutieren.

Die detektierbare Menge spezifischer, IFN γ produzierender CD4+ T-Zellen fällt generell geringer gegenüber der spezifischer CD8+ T-Zellen aus. Bei den HLA-DR1 restringierten Spike-Peptiden sind trotzdem deutliche, spezifische CD4+T-Zell-Reaktionen auf die Peptide S211, S801, S176 und S235 erkennbar (vgl. **Abb. 20 B**). Das S-Protein ist also in der Lage, nach Synthese in MVA-infizierten Zellen, vergleichbar einer natürlichen Infektion [98, 100, 101], spezifische CD4+ T-Zellen zu induzieren. CD4+ T-Zellen gelten im Rahmen von SARS-CoV-2 Infektionen vermutlich deshalb als besonders relevant, da sie sowohl für die Etablierung einer wirksamen Antikörperantwort als auch für die Induktion einer suffizienten Aktivierung spezifischer CD8+ T-Zellen erforderlich sind [128], und so durch ein koordiniertes Zusammenspiel aller drei Arme der adaptiven Immunantwort mit einem bestmöglichen Outcome assoziiert sind [104]. Da MVA-Sc im Mausmodell in der Lage ist, alle Komponenten der adaptiven Immunantwort effektiv zu stimulieren, ist davon auszugehen, dass eine Impfung mit MVA-Sc einen effektiven Schutz vor SARS-CoV-2 Infektionen bieten kann.

Auf die getesteten HLA-DR1 restringierten N-Peptide sind keine nennenswerten CD4+ T-Zell-Reaktionen detektierbar (vgl. **Abb. 21 B**). Eine ausbleibende N-spezifische CD4+ T Zell-Reaktion könnte mit der unter **4.2.2** diskutierten Degradierung des N-Proteins nach Synthese begründet werden und ursächlich für die ebenfalls ausbleibende N-spezifische Antikörperantwort sein. Um die T-zelluläre Reaktion auf das N-Protein zu optimieren, könnten zukünftige Experimente in einer Sequenzmodifikation des N-Gens bestehen, in der Hoffnung, eine effektivere Präsentation relevanter N-Peptide in MHC Klasse II Molekülen nach Impfung mit MVA-N zu ermöglichen (vgl. **4.2.2**). Da die CD3 Positivkontrolle jedoch eine, der nach Impfung mit MVA-Sc, vergleichbare Anzahl an aktivierten CD4+ T-Zellen anzeigt (vgl.

Abb. 20 B, Abb. 21 B), könnten CD4⁺ T-Zellen vorhanden sein, die spezifisch für andere, nicht mit in das Screening eingeschlossene N-Peptide sind. Andernfalls könnte es sich dabei jedoch auch um weitere, vektorspezifische T-Zellen handeln.

Bezüglich der Dominanz von MVA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen gibt es keine Unterschiede nach Impfung mit MVA-Sc oder MVA-N. In beiden Assays dominiert das spät synthetisierte MVA Protein A10L. Dies ist konform mit der Tatsache, dass die CD4⁺ T-Zell-Antworten von T-Zellen dominiert wird, die spezifisch für spät synthetisierte MVA-Proteine sind [145].

Im hier beschriebenen Teil der Studie wurden die T-Zellen direkt *ex vivo* und nur im Falle einer IFN γ Ausschüttung detektiert. Ein Vorteil eines solchen funktionellen *ex vivo* Assays besteht darin, dass nur funktionell relevante T-Zellen detektiert werden und eine *in vivo* induzierte Immunantwort, ohne eine vorausgehende *in vitro* Expansion, unverzerrt abgebildet werden kann [97]. Nachteilig ist, dass T-Zellen, die andere Zytokine oder sehr geringe Mengen an Zytokinen produzieren, nicht erfasst werden [97]. Eine genauere Charakterisierung des nach Impfung mit MVA-Sc/MVA-N gebildeten Zytokinmusters durch T-Zellen wäre trotzdem hinsichtlich der Sicherheit des Impfstoffes von Interesse. Durch den Nachweis einer überwiegend Th1 gewichteten Immunantwort, könnten Bedenken bezüglich der Induktion einer dysfunktionalen Th2-Antwort entkräftet werden [146]. Eine solche, durch eine Impfung induzierte, Th2-Antwort ist mit einer gesteigerten respiratorischen Inflammation assoziiert und kann den Krankheitsverlauf im Falle einer SARS-CoV-2 Infektion aggravieren [146]. Durch die Synthese über einen viralen Vektor ist es allerdings ohnehin unwahrscheinlich, dass das rekombinante Protein eine Th2-Antwort induzieren kann.

Andere MVA-basierte SARS-CoV-2 Impfstoffe sind ebenfalls in der Lage, potente, CD8⁺ und Th1 gewichtete CD4⁺ T-Zell-Antworten in BALB/c Mäusen [85], C57BL/6 Mäusen [81] und in einem humanisierten, HLA-B*0702 exprimierenden Mausmodell zu induzieren [85]. Interessanterweise waren beim multiantigenen S/N produzierendem Impfstoff keine N-spezifischen CD8⁺ T-Zell-Antworten in BALB/c Mäusen, dafür aber im humanisierten Mausmodell detektierbar [85]. In den transgenen HLA-B*0702 Mäusen zeigte sich das N-Protein sogar gegenüber dem S-Protein immundominant [85]. Eine mögliche Ursache wäre auch hier, wie oben bereits diskutiert, dass die Effektivität der Präsentation von N- und S-Peptiden in Abhängigkeit der Ausstattung an MHC-Molekülen sehr variabel ist.

Eine über sechs Monate andauernde Persistenz SARS-CoV-2 spezifischer T-Zellen konnte nach Impfung mit dem MVA basierten Impfstoff COH04S1 im klinischen Kontext

sogar unter Immunsuppression nachgewiesen werden [87]. Eine Aussage über die Langfristigkeit der T-zellulären Immunität ist in dieser Arbeit limitiert, da T-Zell-Experimente in einem „*Short Prime-Boost*“-Schema durchgeführt wurden und eben nur die unmittelbare T-Zell-Reaktion auf die Impfung abbilden.

Sicher ist in Zusammenschau der vorliegenden Ergebnisse, dass vor allem MVA-Sc in der Lage ist, eine potente HLA-A2.1 restringierte CD8+T-Zellantwort und HLA-DR1 restringierte CD4+ T-Zell-Antwort *in vivo* zu induzieren und damit beste Voraussetzungen als wirksamer Impfstoffkandidat bietet.

Obwohl die T-Zell-Reaktivität gegenüber einem veränderten Spike-Protein in den SARS-CoV-2 VOCs überwiegend erhalten ist, könnte durch eine Kointegration des S- und des N-Proteins in einen Impfstoff eine noch breitere, SARS-CoV-2 spezifische Immunantwort induziert werden. Naranbhai *et al.* konnten zeigen, dass die T-Zell-Reaktivität gegenüber anderen Strukturproteinen in der Omikronvariante, im Vergleich zum S-Protein, bei allen getesteten Individuen erhalten ist [132]. Eine Immunantwort, die auf Strukturen außerhalb des Spike Proteins gerichtet ist, verspricht deshalb einen noch verlässlicheren Schutz gegenüber zukünftig auftretenden SARS-CoV-2 VOCs. Entsprechend sinnvoll ist zukünftig der Fokus auf eine Optimierung der N-spezifischen Immunantwort und der Kointegration beider Proteine in einen Impfstoff.

4.3.2 *In vitro* expandierte, SARS-CoV-2 Spike-spezifische murine CD8+ T-Zellen aus HHD/DR1 Mäusen werden durch MVA-Sc infizierte Zellen nicht reaktiviert.

Zur Evaluation der Funktionalität S-spezifischer CD8+ T-Zellen hinsichtlich der Erkennung ihres Peptids nach endogener Peptidprozessierung und -präsentation *in vitro*, wurden murine Splenozyten nach Impfung mit MVA-Sc zunächst isoliert und spezifische CD8+ T-Zellen durch eine wöchentliche Restimulation mit ihrem jeweiligen Peptid expandiert.

Verwendet wurden für die Restimulation der T-Zell-Kulturen die beiden S-Peptide S417 (S 1103) und S976 (S1109), die im Peptid-Screening (vgl. **Abb. 20 A**) die stärkste Reaktion hervorriefen, ebenso wie das B22R-abgeleitete-Peptid von MVA als Impferfolgskontrolle.

Der mit der Passage Eins (P1) der restimulierten CD8+ T-Zellen durchgeführte Assay zeigte bereits eine gute Erkennung der B22R-spezifischen T-Zellen nach exogener Peptidbeladung der HLA-A2.1-exprimierenden SY-9287 Zellen (vgl. **Abb. 22 A**). Die S-

spezifischen T-Zellen dahingegen zeigten auf die peptidbeladenen Zellen nur mäßige Reaktionen mit einer etwas höheren IFN γ Ausschüttung der S976 (S1109) spezifischen CD8+ T-Zellen gegenüber den S417 (S1103)-spezifischen CD8+T-Zellen (vgl. **Abb. 22 A**). Eine vergleichbare Abstufung der Stärke der S-spezifischen T-Zell-Reaktionen zeigte sich auch schon im Peptid-Screening (vgl. **Abb. 20 A**). Eine Reaktion auf die endogene Peptidpräsentation durch MVA-infizierte Zellen war bei keiner der CD8+ T-Zelllinien detektierbar. Die verhältnismäßig hohe unspezifische Hintergrundreaktion bzw. Kreuzreaktivität mit anderen Peptiden ist in der P1 durch den noch hohen Anteil nicht peptid-spezifischer T-Zellen zu erwarten (vgl. **Abb. 22 A**).

Eine erneute Testung der T-Zellen in Passage 5 (P5), zeigte eine deutliche Reduktion der Hintergrundaktivität und eine Steigerung der IFN γ Ausschüttung der B22R spezifischen CD8+T-Zellen als Reaktion auf exogen mit Peptid beladene SY-9287 Zellen. MVA-infizierte Zellen waren nach wie vor nicht in der Lage, eine messbare T-Zell-Reaktion auszulösen (vgl. **Abb. 22 B**).

Nach mehrmaliger Restimulation wäre von einer deutlichen T-Zell-Reaktion, auch auf MVA infizierte Zellen, auszugehen. Eine mögliche Erklärung könnte eine ineffiziente Restimulation durch die dafür verwendeten Zellen sein. Dabei handelt es sich um Jurkat-Zellen, eine humane immortalisierte T-Zelllinie, die mit HLA-A2.1 transfiziert ist (JA2.1 Zellen). Dieses MHC Klasse I Molekül entspricht, im Gegensatz zu dem im Mausmodell exprimierten HHD Molekül, dem humanen HLA-A2.1. Die beiden Moleküle unterscheiden sich dadurch, dass die $\alpha 3$ Domäne im HHD Molekül murinen Ursprungs ist. Die murine $\alpha 3$ Domäne sorgt für eine bessere Interaktion zwischen dem MHC Klasse I Molekül und CD8 und damit für eine intensivere und länger andauernde Interaktion des T-Zell-Rezeptors mit dem MHC Klasse I/Peptidkomplex; insgesamt wird so die Funktionalität der immunologischen Synapse erhöht [93, 147].

Samberg *et al.* verglichen verschiedene MHC Klasse I Moleküle mit murinen/humanen Komponenten hinsichtlich ihrer Fähigkeit, im Mausmodell CD8+T Zellen *in vivo* zu aktivieren und *in vitro* zu restimulieren [148]. Insgesamt waren hier MHC Klasse I Moleküle, die murine $\alpha 3$ Domänen tragen, in der Lage, wesentlich stärkere T-Zell-Antworten zu induzieren [148]. Vor allem die effektive Aktivierung naiver T-Zellen als Grundlage für die Reifung und Expansion spezifischer T-Zellen erforderte im Mausmodell eine murine $\alpha 3$ Domäne [148]. Hinsichtlich der Restimulation *in vitro* spielte die Speziesherkunft der $\alpha 3$ Domäne, im Falle einer vorausgegangenen effektiven Aktivierung der CD8+T-Zellen *in vivo*, eine untergeordnete Rolle [148]. Trotzdem scheint auch hier die murine $\alpha 3$ Domäne T-Zellen effizienter zu stimulieren

[148]. Daher ist eine Verbesserung der CD8+ T-Zell-Restimulationsbedingungen durch die Verwendung einer ebenfalls HHD exprimierenden Zelllinie als Stimulatorzelle naheliegend und sollte zukünftig überprüft werden.

Eine ausbleibende Reaktion der CD8+ T-Zellen auf MVA-infizierte Zellen (SY-9287 MVA-Sc/ MVA-WT) im T-Zell-Assay könnte außerdem in dem hier ausschließlich endogenem Weg der Antigenpräsentation begründet liegen. Für ein effizientes CD8+ T-Zell-*Priming* durch MVA-infizierte Zellen *in vivo* ist der Weg der endogenen Antigenpräsentation meist nicht ausreichend [139]. Vielmehr bedarf es einer Kreuzpräsentation des exogen aufgenommenen Antigens in MHC Klasse I Molekülen durch professionelle Antigenpräsentierende Zellen [139]. Ebenso ist denkbar, dass auch bei einer erneuten Präsentation des Antigens gegenüber geprimten CD8+ T-Zellen *in vitro* der Weg der Kreuzpräsentation erforderlich ist, um CD8+ T-Zellen effizienter stimulieren zu können. Dies könnte eine weitere mögliche Erklärung dafür sein, dass sogar bei den B22R-spezifischen CD8+ T-Zellen trotz deutlich messbarer Reaktionen auf peptidbeladene Zellen, auch nach mehrfacher Restimulation, keine Reaktion auf MVA-WT infizierte Zellen detektierbar ist (vgl. **Abb. 22**).

Bezüglich der S-spezifischen T-Zellen hatten weitere Restimulationen weder eine Verbesserung der Erkennung peptidbeladener noch infizierter Zellen zur Folge. S417 (S1103) spezifische CD8+T-Zellen zeigten keine relevanten Reaktionen nach Peptidpräsentation in Passage 5. S976 (S1109) spezifische CD8+T-Zellen zeigten in Passage 5 eine unspezifische Aktivierung im Sinne einer ungerichteten IFN γ Ausschüttung ähnlicher Intensität in allen getesteten Proben, einschließlich der Negativkontrollen (vgl. **Abb. 22 B**). Als mögliche Ursache wäre eine Art superantigene Eigenschaft [149] des isolierten Peptidfragmentes S976 zu diskutieren, die *in vitro* zu einer unspezifischen Überaktivierung großer Anteile vorhandener CD8+ T-Zellen geführt haben könnte. Da diese Überstimulation jedoch erst nach mehrmaliger Restimulation der T-Zellen *in vitro* aufgetreten ist, könnten auch ungünstige Kulturbedingungen zu diesem Phänomen geführt haben. S976 spezifische T-Zellen scheinen trotzdem neben unspezifisch aktivierten T-Zellen vorzuliegen; entsprechend höhere IFN γ Ausschüttungen sind in den Proben detektierbar, denen das Peptid S976 erneut präsentiert wurde (vgl. **Abb. 22 B**).

Aufgrund der Divergenz der MVA-spezifischen CD8+ T-Zell-Reaktionen und der der S-spezifischen CD8+T-Zell-Reaktionen bereits in Passage 1 ist als Ursache für die erfolglosen Restimulationen möglicherweise schon das Impfgeme zu diskutieren. Während das Peptid-Screening nach *Prime-Boost*-Impfung durchgeführt wurde,

wurden die Mäuse für die Generierung von T-Zellkulturen schon nach einer einzigen Impfung splenektomiert. Möglicherweise kommt es jedoch erst nach *Booster*-Impfung zu einer ausreichenden Expansion der S-spezifischen CD8+T-Zellen.

Kastenmuller *et al.* beschreiben ein Phänomen der "*Cross-Competition*" unter CD8+T-Zellen, die für verschiedene Epitope spezifisch sind [143]. Das bedeutet, dass es T-Zellen gibt, die einen Expansionsvorteil gegenüber anderen spezifischen T-Zellen besitzen und die Immunantwort entsprechend dominieren [143]. Relevant wird dieses Phänomen vor allem nach einer *Booster*-Impfung bzw. einer erneuten Exposition des Immunsystems gegenüber dem Antigen [143]. Dabei kann sich die Anzahl und das Verhältnis an CD8+T-Zellen, die für bestimmte Epitope spezifisch sind, grundlegend verändern [143]. Bei MVA resultiert dies nach einer *Booster*-Impfung, unabhängig vom Ergebnis der T-Zellantwort nach dem *Priming*, in einer Dominanz von CD8+T-Zellen, die spezifisch für frühe Antigene, gegenüber denen, die spezifisch für spät synthetisierte Antigene sind [143, 144].

Während T-Zellen, die spezifisch für früh synthetisierte Antigene sind, nach *Prime*-Impfung in der Studie von Kastenmuller *et al.* teilweise kaum detektierbar sind, zeigen sie nach *Booster*-Impfung eine starke Expansion [143]. Denkbar wäre eine solche Verschiebung der Immunhierarchie auch nach *Booster*-Impfung mit MVA-Sc, sodass erst nach *Booster*-Impfung S-spezifische CD8+T-Zellen in dem Maße vorhanden sind, wie es sich im Peptid-Screening abbilden lässt (vgl. **Abb. 20 A**).

Unklar bleibt jedoch, wie das Verhältnis der MVA- und S-spezifischen T-Zellen nach *Prime*-Impfung direkt *ex vivo* aussieht. Aufgrund der besseren Reaktion der B22R-spezifischen T-Zellen auf die Restimulation (vgl. **Abb. 22 A**, **Abb. 22 B**), ist schon nach *Prime*-Impfung von einer höheren Anzahl B22R-spezifischer CD8+T-Zellen auszugehen.

Insgesamt könnte die zu geringe Menge an spezifischen T-Zellen für die hier gewählten Peptide nach alleiniger *Prime*-Impfung dazu führen, dass eine Expansion spezifischer CD8+T-Zellen *in vitro* nicht oder nur erschwert möglich ist. Gegebenenfalls könnte man diesem Problem durch eine ergänzende *Booster*-Impfung vor Splenektomie entgegenen.

Durch die Verwendung einer HHD-exprimierenden Zelllinie für die *in vitro* Restimulation und durch eine *Booster*-Impfung vor Splenektomie könnten die Kulturbedingungen für eine *in vitro* Expansion spezifischer T-Zellen optimiert werden, und so zukünftig genauere Aussagen über die Qualität der nach Impfung mit MVA-Sc gebildeten T-Zellen möglich machen.

4.4 Potential neuer Impfstrategien und MVA-basierter SARS-CoV-2 Impfstoffkandidaten im Hinblick auf einen langfristigen Immunschutz

Dass Impfstoffe im Zusammenhang mit SARS-CoV-2, vor allem zu Beginn der Pandemie, bei initial zahlreichen schweren Infektionsverläufen bereits von großem Nutzen waren, ist unumstritten. In Anbetracht der Tatsache, dass COVID-19 sich inzwischen, nicht zuletzt aufgrund einer präformierten Immunität, vielmehr zu einem endemisch auftretendem Virus mit überwiegend milden Infektionsverläufen entwickelt, stellt sich die Frage, inwieweit neuartige Impfstoffe, über die bereits etablierten Impfstoffe hinaus, Vorteile bringen und auch zukünftig von Nutzen sein könnten.

Trotz der kumulativ sinkenden Zahl schwerer Erkrankungsfälle, besteht im Zuge fortlaufend neu auftretender, immunevasiver Virusvarianten [54, 150] mehr denn je die Nachfrage nach neuen Impfstrategien, die den Schutz der Immunkompromittierten und durch Immunseneszenz beeinträchtigten älteren Menschen fokussieren. Diese sind durch potentiell schwere Infektionsverläufe gefährdet und selbst nicht in der Lage, nach Impfung mit bisher etablierten Impfstoffen, einen der jüngeren Generation bzw. immunkompetenten Menschen vergleichbaren Immunschutz auszubilden [151, 152].

Zum einen könnte die stärker gefährdete Bevölkerungsgruppe indirekt durch eine Impfstrategie geschützt werden, die eine sterile Immunität induziert und so das Risiko einer viralen Transmission durch asymptomatisch Infizierte senkt [119], zum anderen durch einen Impfstoff, der auch älteren und immunkompromittierten Menschen selbst einen langfristigeren Immunschutz bietet.

Ob eine sterile Immunität im Zusammenhang mit SARS-CoV-2 erzielt werden kann, bleibt fraglich. Neben einer effektiven T-Zell-Antwort, die nachhaltigen Schutz vor schweren Infektionsverläufen bietet [130], könnte durch einen gezielteren Fokus auf eine langfristig wirksame Antikörperantwort jedoch auch das Risiko für asymptomatische Infektionen reduziert und die virale Transmission vermindert werden.

Bereits etablierte SARS-CoV-2 Impfstoffe wurden zur Steigerung der Impfeffektivität bereits der dominierenden Omikron-Variante angepasst (siehe **Tabelle 2**). Omikron-Varianten der Linie XBB beispielsweise zeigen sich jedoch auch nach Impfung mit den an die BA4/5 Variante angepassten mRNA Impfstoffen immunevasiv [54].

Auch bei MVA-basierten SARS-CoV-2 Impfstoffen wurden entsprechende virusvariantenadaptierte Modifikationen vorgenommen. Beim multiantigenen MVA-Impfstoff COH04S1 zeigte sich nach einer Anpassung des S-Proteins an die Omikron-

Subvariante BA.1 zwar ein höherer Schutz in der initialen Phase bei homologer Infektion mit dieser Virusvariante, gegenüber der Omikron-Subvariante BA.2.12.1 erwies sich der Omikron-adaptierte Impfstoff präklinisch jedoch nicht als besser wirksam, verglichen mit dem auf der Wuhan-Variante basierten Impfstoff [153]. Auch die Antikörperantwort erfährt durch die Anpassung des Impfstoffs keine nennenswerte Optimierung. Die Neutralisationskapazität gegenüber der Variante BA.1 steigt nach Adaption des Impfstoffes deutlich an. Gegenüber der Variante BA.2.12.1 ist sie jedoch wiederum der nach Impfung mit dem nicht adaptierten Impfstoff vergleichbar [153]. Entsprechend fraglich ist, inwieweit diese Modifikationen unter fortlaufend neu auftretenden Virusvarianten eine langfristige Lösung bieten können.

Bei den Virusvarianten-adaptierten mRNA Impfstoffen könnte zudem ein *Immune Imprinting* eine starke spezifische Immunantwort gegenüber neueren Virusvarianten beeinträchtigt haben [54, 154]. Als *Immune Imprinting* ist dabei eine SARS-CoV-2 „Wildtyp“-gewichtete Immunantwort zu verstehen, die ein Resultat aus wiederholtem Impfen mit Impfstoffen ist, die, wie auch die bivalenten mRNA Impfstoffe, nach wie vor die ursprüngliche SARS-CoV-2 Variante enthalten [54, 154].

Vorteilhaft ist in diesem Zusammenhang sicherlich die ohnehin hohe Funktionalität der Antikörperantwort nach Impfung mit MVA-Sc gegenüber der Omikron-Variante, anders als dies bei anderen präklinisch getesteten Impfstoffkandidaten der Fall ist. Ob eine ebenso hohe Funktionalität auch gegenüber anderen Omikron-Subvarianten besteht, ist jedoch unklar und gilt es in zukünftigen Experimenten zu evaluieren. Hinsichtlich eines möglichen *Immune Imprintings* wäre jedoch, trotz der guten Kreuzreaktivität, auch bei MVA-Sc eine Adaption an aktuell zirkulierende Varianten zu diskutieren.

In ersten Ergebnissen im Rahmen einer klinischen Studie mit immunkompromittierten Patienten zeigte der multiantigene MVA-Impfstoff COH04S1 eine effektive Induktion von Antikörpern, die sogar gegenüber der hoch immunevasiven Omikron-Sublinie XBB1.5 eine gute neutralisierende Wirksamkeit aufweisen [87]. Die erhaltene, potente Neutralisationskapazität nach Impfung mit diesem MVA-basierten Impfstoff, auch gegenüber anderen SARS-CoV-2 Virusvarianten, ist konform mit den hier mit MVA-Sc im präklinischen Setting aufgezeigten Ergebnissen und untermauert das hoch immunogene Potential von MVA, ebenso wie die Tatsache, dass eine potente neutralisierende Antikörperantwort auch noch nach 6 Monaten nachweisbar ist [87].

Diese ersten Erkenntnisse im Rahmen klinischer Studien geben Anhalt dafür, dass MVA als Vektor den bereits etablierten SARS-CoV-2 Impfstoffen hinsichtlich der Stärke und der Langfristigkeit der induzierten Immunantwort, auch unter Immunsuppression,

überlegen sein könnte [87] und somit Potential bietet, entsprechende Bevölkerungsgruppen langfristig zu schützen.

Die starke Immunogenität von MVA könnte außerdem die Häufigkeit erforderlicher *Booster*-Impfungen reduzieren. Denn eine, wie die vor allem zu Beginn der Pandemie eingeforderte Frequenz an *Booster*-Impfungen, ist hinsichtlich der *Compliance* der Bevölkerung auf Dauer nur schwer umsetzbar.

Multiantigene Impfstoffe wie COH04S1 oder MVA-Sc/N bieten darüber hinaus durch die Synthese zweier antigenen Strukturen, wie bereits beschrieben, ein höheres Potential, durch eine breitere Immunität, langfristig vor neu auftretenden Virusvarianten zu schützen.

Auch wenn Anti-N-Antikörper im Vergleich zu Anti-S-Antikörpern erst zu einem späteren Zeitpunkt im Infektionsverlauf eine protektive Funktion einnehmen, so können sie dennoch die Viruslast reduzieren und so zur Infektionskontrolle beitragen [120]. Dadurch, dass das N-Protein im Zuge neu auftretender Virusvarianten geringeren Veränderungen unterliegt, könnte eine Anti-N-Antikörperantwort, neben einer durch S-Mutationen beeinträchtigten Anti-S-Antikörperantwort, einen länger wirksamen Schutz bieten [123].

Hinsichtlich der T-Zell-Antwort erweitert das N-Protein als zusätzliche antigene Struktur nicht nur die Breite der Immunantwort. Auch in Bezug auf einen langanhaltenden, VOC übergreifend wirksamen Schutz, bietet das N-Protein den Vorteil, dass eine mutationsbedingte Beeinträchtigung der T-Zell-Funktion aufgrund seiner hohen genetischen Stabilität in der Vergangenheit auch zukünftig kaum wahrscheinlich erscheint [132]. Dahingegen zeigt sich in einzelnen Individuen, abhängig von der HLA-Ausstattung, eine verminderte CD8+T-zelluläre Wirksamkeit gegenüber dem S-Protein der Omikronvariante [132]. Dementsprechend könnte für das S-Protein auch zukünftig ein höheres, wenn auch insgesamt geringes, Potential für eine T-zelluläre Evasion in einzelnen Individuen bestehen.

4.5 Fazit: Potential von MVA-Sc /MVA Sc-N als zukünftiger SARS-CoV-2 Impfstoffkandidat

Im Rahmen erster präklinischer Experimente hat sich MVA-Sc über den Untersuchungszeitraum hinweg im Mausmodell nicht nur als sicher, sondern durch die Induktion einer starken humoralen und zellulären Immunantwort auch als sehr immunogen erwiesen. MVA-Sc ist in der Lage, nach *Prime-Boost*-Impfung eine hochwirksame SARS-CoV-2 VOC-übergreifende Antikörperantwort zu induzieren. Dabei ist insbesondere die starke Kreuzreaktivität gegenüber der bekanntlich hoch immunevasiven Omikron-Variante hervorzuheben. Darüber hinaus ist MVA-Sc in der Lage, im humanisierten Mausmodell eine starke CD8⁺ T-zelluläre Immunantwort auf die Spike-Peptide S417 und S976 und eine breite S-spezifische CD4⁺ T-zelluläre Antwort zu induzieren. MVA-N hingegen kann keine messbaren N-spezifischen Antikörper und CD4⁺ T-Zell-Antwort induzieren, stimuliert jedoch deutliche N-spezifische CD8⁺ T-Zell-Reaktionen.

Im weiteren Verlauf ist zunächst eine Modifikation der Konstrukte erforderlich, die vor allem das Ziel verfolgen sollen, die Prozessierung des N-Proteins zu optimieren, um so potentiell auch eine Generierung N-spezifischer CD4⁺ T-Zellen und Anti-N-Antikörper nach Impfung zu ermöglichen. Langfristig sollte das Ziel einer Synthese beider Proteine durch einen Vektor verfolgt werden.

Neben einer erneuten Evaluation der modifizierten Konstrukte im ELISA, Neutralisationstest und T-Zell-Experimenten, ist eine Infektion der geimpften Mäuse mit verschiedenen SARS-CoV-2 Varianten und eine Evaluation der Impfstoffwirksamkeit *in vivo* im präklinischen Setting und im Rahmen eines erweiterten Beobachtungszeitraumes erforderlich. Außerdem könnte eine Studie sinnvoll sein, in der die intraperitoneale und eine intranasale Impfroute hinsichtlich der Induktion einer mukosalen Immunität und einer Suppression der viralen Vermehrung im Nasopharynx unter SARS-CoV-2 Infektion verglichen werden.

Zwar befinden sich aktuell zahlreiche, MVA-basierte SARS-CoV-2 Impfstoffkandidaten, in präklinischer oder klinischer Testung, jedoch unterscheiden sich diese durch zahlreiche Faktoren, wie der Insertionsstellen der Fremdartigene, der genutzten Promotoren, der Modifikation der Fremdartigene oder auch der Impfrouten und Impfdosen. So können diese Faktoren große Unterschiede in der Induktion einer Immunantwort bedingen und so gemeinsam den Erkenntnisgewinn auf dem Weg zu einem hocheffektiven, MVA-basierten SARS-CoV-2 Impfstoffkandidaten vorantreiben.

Durch seine hohe Sicherheit in Kombination mit einer starken Wirksamkeit bietet MVA, insbesondere für gefährdete Bevölkerungsgruppen, die Möglichkeit eine protektive Immunantwort auszubilden. Neue Impfstrategien, wie eine mukosale Impfroute, könnten darüber hinaus das fortbestehende Problem der viralen Transmission durch asymptomatisch Infizierte minimieren. Neben der potenten Kreuzreaktivität der durch MVA-Sc generierten Immunantwort, könnte durch eine zusätzliche Synthese des N-Proteins bisherigen Schwierigkeiten im Zusammenhang mit einer langfristigen Impfstoff-vermittelten Immunität entgegnet werden.

Durch seine starke Immunogenität im Tiermodell kann MVA-Sc bereits jetzt als ein vielversprechender SARS-COV-2 Impfstoffkandidat betrachtet werden.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Muralidar, S., et al., *The emergence of COVID-19 as a global pandemic: Understanding the epidemiology, immune response and potential therapeutic targets of SARS-CoV-2*. Biochimie, 2020. **179**: p. 85-100.
2. Das, K., et al., *A detailed review of the outbreak of COVID-19*. Front Biosci (Landmark Ed), 2021. **26**(6): p. 149-170.
3. World Health Organization. *COVID-19 Epidemiological Update. Edition 159 published 29 September 2023*. [Access: 18.10.2023]; Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-epidemiological-update---29-september-2023>.
4. Antia, R. and M.E. Halloran, *Transition to endemicity: Understanding COVID-19*. Immunity, 2021. **54**(10): p. 2172-2176.
5. Zhou, P., et al., *A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin*. Nature, 2020. **579**(7798): p. 270-273.
6. Fan, Y., et al., *Bat Coronaviruses in China*. Viruses, 2019. **11**(3).
7. Rabi, F.A., et al., *SARS-CoV-2 and Coronavirus Disease 2019: What We Know So Far*. Pathogens, 2020. **9**(3).
8. Yeo, C., S. Kaushal, and D. Yeo, *Enteric involvement of coronaviruses: is faecal-oral transmission of SARS-CoV-2 possible?* Lancet Gastroenterol Hepatol, 2020. **5**(4): p. 335-337.
9. Guo, Z.D., et al., *Aerosol and Surface Distribution of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Hospital Wards, Wuhan, China, 2020*. Emerg Infect Dis, 2020. **26**(7): p. 1583-1591.
10. World Health Organization. *WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard*. [Access: 31.08.2024]; Available from: <https://covid19.who.int/>.

11. Zhang, J.J., et al., *Risk and Protective Factors for COVID-19 Morbidity, Severity, and Mortality*. Clin Rev Allergy Immunol, 2023. **64**(1): p. 90-107.
12. Paul-Ehrlich-Institut. *COVID-19-Impfstoffe*. [Access: 19.10.2023, 27.10.2024]; Available from: <https://www.pei.de/DE/arzneimittel/impfstoffe/covid-19/covid-19-node.html>.
13. Buisson, Y., *Covid-19, an unfinished story*. Presse Med, 2022. **51**(3): p. 104131.
14. Zhou, Z., Y. Zhu, and M. Chu, *Role of COVID-19 Vaccines in SARS-CoV-2 Variants*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 898192.
15. Robert Koch Institut. *Epidemiologisches Bulletin 22/2024*. RKI-Ratgeber COVID-19 [Access:27.10.2024]; Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2024/Ausgaben/22_24.html.
16. Letko, M., A. Marzi, and V. Munster, *Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses*. Nat Microbiol, 2020. **5**(4): p. 562-569.
17. Sungnak, W., et al., *SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes*. Nat Med, 2020. **26**(5): p. 681-687.
18. Wang, Y., et al., *A comprehensive investigation of the mRNA and protein level of ACE2, the putative receptor of SARS-CoV-2, in human tissues and blood cells*. Int J Med Sci, 2020. **17**(11): p. 1522-1531.
19. Lee, S., R. Channappanavar, and T.D. Kanneganti, *Coronaviruses: Innate Immunity, Inflammasome Activation, Inflammatory Cell Death, and Cytokines*. Trends Immunol, 2020. **41**(12): p. 1083-1099.
20. Gusev, E., et al., *SARS-CoV-2-Specific Immune Response and the Pathogenesis of COVID-19*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(3).

21. Ochani, R., et al., *COVID-19 pandemic: from origins to outcomes. A comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management*. Infez Med, 2021. **29**(1): p. 20-36.
22. Huang, C., et al., *Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China*. Lancet, 2020. **395**(10223): p. 497-506.
23. Tariq, R., et al., *Prevalence and Mortality of COVID-19 Patients With Gastrointestinal Symptoms: A Systematic Review and Meta-analysis*. Mayo Clin Proc, 2020. **95**(8): p. 1632-1648.
24. Cascella, M., et al., *Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19)*, in *StatPearls*. 2023, StatPearls Publishing Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).
25. Wang, J., et al., *Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts*. J Leukoc Biol, 2020. **108**(1): p. 17-41.
26. Gibson, P.G., L. Qin, and S.H. Pua, *COVID-19 acute respiratory distress syndrome (ARDS): clinical features and differences from typical pre-COVID-19 ARDS*. Med J Aust, 2020. **213**(2): p. 54-56.e1.
27. Adamczak, M., S. Surma, and A. Więcek, *Acute kidney injury in patients with COVID-19: Epidemiology, pathogenesis and treatment*. Adv Clin Exp Med, 2022. **31**(3): p. 317-326.
28. Abou-Ismael, M.Y., et al., *The hypercoagulable state in COVID-19: Incidence, pathophysiology, and management*. Thromb Res, 2020. **194**: p. 101-115.
29. Guo, T., et al., *Cardiovascular Implications of Fatal Outcomes of Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)*. JAMA Cardiol, 2020. **5**(7): p. 811-818.
30. Davis, H.E., et al., *Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations*. Nat Rev Microbiol, 2023. **21**(3): p. 133-146.

31. Kadam, S.B., et al., *SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights*. J Basic Microbiol, 2021. **61**(3): p. 180-202.
32. Huang, Y., et al., *Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19*. Acta Pharmacol Sin, 2020. **41**(9): p. 1141-1149.
33. Ou, X., et al., *Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 1620.
34. Shang, J., et al., *Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2*. Nature, 2020. **581**(7807): p. 221-224.
35. Jackson, C.B., et al., *Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2022. **23**(1): p. 3-20.
36. Dai, L. and G.F. Gao, *Viral targets for vaccines against COVID-19*. Nat Rev Immunol, 2021. **21**(2): p. 73-82.
37. Magazine, N., et al., *Mutations and Evolution of the SARS-CoV-2 Spike Protein*. Viruses, 2022. **14**(3).
38. Xu, J., et al., *Systematic Comparison of Two Animal-to-Human Transmitted Human Coronaviruses: SARS-CoV-2 and SARS-CoV*. Viruses, 2020. **12**(2).
39. Bai, Z., et al., *The SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Its Role in Viral Structure, Biological Functions, and a Potential Target for Drug or Vaccine Mitigation*. Viruses, 2021. **13**(6).
40. McBride, R., M. van Zyl, and B.C. Fielding, *The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein*. Viruses, 2014. **6**(8): p. 2991-3018.
41. Chang, C.K., et al., *The SARS coronavirus nucleocapsid protein--forms and functions*. Antiviral Res, 2014. **103**: p. 39-50.

42. Gao, T., et al., *Identification and functional analysis of the SARS-COV-2 nucleocapsid protein*. BMC Microbiol, 2021. **21**(1): p. 58.
43. Chang, C.K., et al., *Modular organization of SARS coronavirus nucleocapsid protein*. J Biomed Sci, 2006. **13**(1): p. 59-72.
44. Smits, V.A.J., et al., *The Nucleocapsid protein triggers the main humoral immune response in COVID-19 patients*. Biochem Biophys Res Commun, 2021. **543**: p. 45-49.
45. Yu, H., et al., *The role of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein in antiviral immunity and vaccine development*. Emerg Microbes Infect, 2023. **12**(1): p. e2164219.
46. Peck, K.M. and A.S. Luring, *Complexities of Viral Mutation Rates*. J Virol, 2018. **92**(14).
47. Domingo, E., et al., *Mutation Rates, Mutation Frequencies, and Proofreading-Repair Activities in RNA Virus Genetics*. Viruses, 2021. **13**(9).
48. World Health Organization. *Updated working definitions and primary actions for SARS-CoV-2 variants, 4 October 2023*. [Access: 24.10.2023]; Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/updated-working-definitions-and-primary-actions-for--sars-cov-2-variants>.
49. Robert Koch Institut. *Bericht zu Virusvarianten von SARS-COV-2 in Deutschland*. 2021 [Last updated: 07.07.2021] [Access: 09.11.2024]; Available from: https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/DESH/Bericht_VOC_2021-07-07.pdf?__blob=publicationFile.
50. Robert Koch Institut. *Wöchentlicher Lagebericht des RKI zur Coronavirus-Krankheit-2019 (COVID-19)*. 2021 [Last updated: 02.12.2021] [Access: 09.11.2024]; Available from: https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Situationsberichte/Wochenbericht/Wochenbericht_2021-12-02.pdf?__blob=publicationFile.
51. Robert Koch Institut. *Wöchentlicher Lagebericht des RKI zur Coronavirus-Krankheit-2019 (COVID-19)*. 2022 [Last updated: 25.05.2022] Access:

09.11.2024]; Available from:

https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Situationsberichte/Wochenbericht/Wochenbericht_2022-05-25.pdf?__blob=publicationFile.

52. Global Initiative on Sharing All Influenza Data. *hCoV-19 Variants Dashboard*. [Access 25.10.2023, 09.11.2024]; Available from: <https://gisaid.org/hcov-19-variants-dashboard>.
53. Zhou, Y., H. Zhi, and Y. Teng, *The outbreak of SARS-CoV-2 Omicron lineages, immune escape, and vaccine effectiveness*. J Med Virol, 2023. **95**(1): p. e28138.
54. Faraone, J.N., et al., *Immune Evasion and Membrane Fusion of SARS-CoV-2 XBB Subvariants EG.5.1 and XBB.2.3*. Emerg Microbes Infect, 2023: p. 2270069.
55. Wang, L. and G. Cheng, *Sequence analysis of the emerging SARS-CoV-2 variant Omicron in South Africa*. J Med Virol, 2022. **94**(4): p. 1728-1733.
56. Hildt, E., *Übersicht über die in der EU zugelassenen COVID-19-Impfstoffe – von der Technologie über die klinische Prüfung zur Zulassung*. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 2022. **65**(12): p. 1237-1243.
57. Herrlich, A. and A. Mayr, *[Comparative experimental works on cow pox virus vaccines]*. Arch Hyg Bakteriol, 1954. **138**(7): p. 479-504.
58. Volz, A. and G. Sutter, *Modified Vaccinia Virus Ankara: History, Value in Basic Research, and Current Perspectives for Vaccine Development*. Adv Virus Res, 2017. **97**: p. 187-243.
59. Meyer, H., G. Sutter, and A. Mayr, *Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence*. J Gen Virol, 1991. **72** (Pt 5): p. 1031-8.
60. Orlova, O.V., et al., *Development of Modified Vaccinia Virus Ankara-Based Vaccines: Advantages and Applications*. Vaccines (Basel), 2022. **10**(9).

61. World Health Organization. *Summary report on first , second and third generation smallpox vaccines*. 2013.
62. Koch, T., et al., *Safety and immunogenicity of a modified vaccinia virus Ankara vector vaccine candidate for Middle East respiratory syndrome: an open-label, phase 1 trial*. Lancet Infect Dis, 2020. **20**(7): p. 827-838.
63. Bisht, H., et al., *Severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein expressed by attenuated vaccinia virus protectively immunizes mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(17): p. 6641-6.
64. Chen, Z., et al., *Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing the spike glycoprotein of severe acute respiratory syndrome coronavirus induces protective neutralizing antibodies primarily targeting the receptor binding region*. J Virol, 2005. **79**(5): p. 2678-88.
65. Kaynarcalidan, O., S. Moreno Mascaraque, and I. Drexler, *Vaccinia Virus: From Crude Smallpox Vaccines to Elaborate Viral Vector Vaccine Design*. Biomedicines, 2021. **9**(12).
66. Antoine, G., et al., *The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses*. Virology, 1998. **244**(2): p. 365-96.
67. Broyles, S.S., *Vaccinia virus transcription*. J Gen Virol, 2003. **84**(Pt 9): p. 2293-2303.
68. Modrow, S., et al., *Molekulare Virologie*. 3. Auflage ed. 2010, Heidelberg: Spektrum. pp. 610-623.
69. Moss, B., *Membrane fusion during poxvirus entry*. Semin Cell Dev Biol, 2016. **60**: p. 89-96.
70. Mallardo, M., S. Schleich, and J. Krijnse Locker, *Microtubule-dependent organization of vaccinia virus core-derived early mRNAs into distinct cytoplasmic structures*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(12): p. 3875-91.

71. Mallardo, M., et al., *Relationship between vaccinia virus intracellular cores, early mRNAs, and DNA replication sites*. J Virol, 2002. **76**(10): p. 5167-83.
72. Katsafanas, G.C. and B. Moss, *Colocalization of transcription and translation within cytoplasmic poxvirus factories coordinates viral expression and subjugates host functions*. Cell Host Microbe, 2007. **2**(4): p. 221-8.
73. Cairns, J., *The initiation of vaccinia infection*. Virology, 1960. **11**: p. 603-23.
74. Tolonen, N., et al., *Vaccinia virus DNA replication occurs in endoplasmic reticulum-enclosed cytoplasmic mini-nuclei*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(7): p. 2031-46.
75. Moss, B., *Poxvirus DNA replication*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(9).
76. Goebel, S.J., et al., *The complete DNA sequence of vaccinia virus*. Virology, 1990. **179**(1): p. 247-66, 517-63.
77. Drexler, I., C. Staib, and G. Sutter, *Modified vaccinia virus Ankara as antigen delivery system: how can we best use its potential?* Curr Opin Biotechnol, 2004. **15**(6): p. 506-12.
78. Blanchard, T.J., et al., *Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine*. J Gen Virol, 1998. **79** (Pt 5): p. 1159-67.
79. Wyatt, L.S., et al., *Highly attenuated smallpox vaccine protects mice with and without immune deficiencies against pathogenic vaccinia virus challenge*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(13): p. 4590-5.
80. Verheust, C., et al., *Biosafety aspects of modified vaccinia virus Ankara (MVA)-based vectors used for gene therapy or vaccination*. Vaccine, 2012. **30**(16): p. 2623-32.

81. García-Arriaza, J., et al., *COVID-19 vaccine candidates based on modified vaccinia virus Ankara expressing the SARS-CoV-2 spike induce robust T- and B-cell immune responses and full efficacy in mice*. J Virol, 2021. **95**(7).
82. Routhu, N.K., et al., *A modified vaccinia Ankara vector-based vaccine protects macaques from SARS-CoV-2 infection, immune pathology, and dysfunction in the lungs*. Immunity, 2021. **54**(3): p. 542-556.e9.
83. Tscherne, A., et al., *Immunogenicity and efficacy of the COVID-19 candidate vector vaccine MVA-SARS-2-S in preclinical vaccination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021. **118**(28).
84. Liu, R., et al., *One or two injections of MVA-vectored vaccine shields hACE2 transgenic mice from SARS-CoV-2 upper and lower respiratory tract infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021. **118**(12).
85. Chiuppesi, F., et al., *Development of a multi-antigenic SARS-CoV-2 vaccine candidate using a synthetic poxvirus platform*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 6121.
86. Chiuppesi, F., et al., *Safety and immunogenicity of a synthetic multiantigen modified vaccinia virus Ankara-based COVID-19 vaccine (COH04S1): an open-label and randomised, phase 1 trial*. Lancet Microbe, 2022. **3**(4): p. e252-e264.
87. Chiuppesi, F., et al., *Stimulation of Potent Humoral and Cellular Immunity via Synthetic Dual-Antigen MVA-Based COVID-19 Vaccine COH04S1 in Cancer Patients Post Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapy*. Vaccines (Basel), 2023. **11**(9).
88. Miyashita, K., et al., *Changes in the characteristics and outcomes of COVID-19 patients from the early pandemic to the delta variant epidemic: a nationwide population-based study*. Emerg Microbes Infect, 2023. **12**(1): p. 2155250.
89. Wyatt, L.S., et al., *Development of a replication-deficient recombinant vaccinia virus vaccine effective against parainfluenza virus 3 infection in an animal model*. Vaccine, 1996. **14**(15): p. 1451-8.

90. Voets, A., *Development and characterisation of MVA-based COVID-19 vector vaccines*. 2021, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
91. Beeton, C. and K.G. Chandy, *Preparing T cell growth factor from rat splenocytes*. J Vis Exp, 2007(10): p. 402.
92. Pajot, A., et al., *A mouse model of human adaptive immune functions: HLA-A2.1-/HLA-DR1-transgenic H-2 class I-/class II-knockout mice*. Eur J Immunol, 2004. **34**(11): p. 3060-9.
93. Pascolo, S., et al., *HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta2m double knockout mice*. J Exp Med, 1997. **185**(12): p. 2043-51.
94. Ostermann, P.N., *Investigating the capacity of locked nucleic acid mixmer antisense oligonucleotides to inhibit viral replication*. 2022, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
95. Crowther, J.R., *Stages in ELISA*. Methods in Molecular Biology, The ELISA Guidebook. Vol. 516. 2009. 43-78.
96. Crowther, J.R., *Titration of reagents*. Methods in Molecular Biology, The ELISA Guidebook. Vol. 516. 2009. 79-109.
97. Grifoni, A., et al., *SARS-CoV-2 human T cell epitopes: Adaptive immune response against COVID-19*. Cell Host Microbe, 2021. **29**(7): p. 1076-1092.
98. Nelde, A., et al., *SARS-CoV-2-derived peptides define heterologous and COVID-19-induced T cell recognition*. Nat Immunol, 2021. **22**(1): p. 74-85.
99. Jin, X., et al., *Screening HLA-A-restricted T cell epitopes of SARS-CoV-2 and the induction of CD8(+) T cell responses in HLA-A transgenic mice*. Cell Mol Immunol, 2021. **18**(12): p. 2588-2608.

100. Tarke, A., et al., *Comprehensive analysis of T cell immunodominance and immunoprevalence of SARS-CoV-2 epitopes in COVID-19 cases*. Cell Rep Med, 2021. **2**(2): p. 100204.
101. Peng, Y., et al., *Broad and strong memory CD4(+) and CD8(+) T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19*. Nat Immunol, 2020. **21**(11): p. 1336-1345.
102. Blanco-Melo, D., et al., *Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19*. Cell, 2020. **181**(5): p. 1036-1045.e9.
103. Sette, A. and S. Crotty, *Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19*. Cell, 2021. **184**(4): p. 861-880.
104. Rydyznski Moderbacher, C., et al., *Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity*. Cell, 2020. **183**(4): p. 996-1012.e19.
105. Li, S., et al., *Clinical and pathological investigation of patients with severe COVID-19*. JCI Insight, 2020. **5**(12).
106. Chandrashekar, A., et al., *SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques*. Science, 2020. **369**(6505): p. 812-817.
107. Rogers, T.F., et al., *Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model*. Science, 2020. **369**(6506): p. 956-963.
108. Meyer Zu Natrup, C., et al., *Stabilized recombinant SARS-CoV-2 spike antigen enhances vaccine immunogenicity and protective capacity*. J Clin Invest, 2022. **132**(24).
109. Pérez, P., et al., *A Single Dose of an MVA Vaccine Expressing a Prefusion-Stabilized SARS-CoV-2 Spike Protein Neutralizes Variants of Concern and Protects Mice From a Lethal SARS-CoV-2 Infection*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 824728.

110. Pérez, P., et al., *Intranasal administration of a single dose of MVA-based vaccine candidates against COVID-19 induced local and systemic immune responses and protects mice from a lethal SARS-CoV-2 infection*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 995235.
111. Boudewijns, R., et al., *MVA-CoV2-S Vaccine Candidate Neutralizes Distinct Variants of Concern and Protects Against SARS-CoV-2 Infection in Hamsters*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 845969.
112. Lázaro-Frías, A., et al., *Full efficacy and long-term immunogenicity induced by the SARS-CoV-2 vaccine candidate MVA-CoV2-S in mice*. NPJ Vaccines, 2022. **7**(1): p. 17.
113. Chiuppesi, F., et al., *Synthetic multiantigen MVA vaccine COH04S1 protects against SARS-CoV-2 in Syrian hamsters and non-human primates*. NPJ Vaccines, 2022. **7**(1): p. 7.
114. Bošnjak, B., et al., *Intranasal Delivery of MVA Vector Vaccine Induces Effective Pulmonary Immunity Against SARS-CoV-2 in Rodents*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 772240.
115. Americo, J.L., et al., *Intranasal inoculation of an MVA-based vaccine induces IgA and protects the respiratory tract of hACE2 mice from SARS-CoV-2 infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2022. **119**(24): p. e2202069119.
116. Routhu, N.K., et al., *A modified vaccinia Ankara vaccine expressing spike and nucleocapsid protects rhesus macaques against SARS-CoV-2 Delta infection*. Sci Immunol, 2022. **7**(72): p. eabo0226.
117. Evans, J.P., et al., *Neutralizing antibody responses elicited by SARS-CoV-2 mRNA vaccination wane over time and are boosted by breakthrough infection*. Sci Transl Med, 2022. **14**(637): p. eabn8057.
118. Müller, L., et al., *SARS-CoV-2 Infection in Fully Vaccinated Individuals of Old Age Strongly Boosts the Humoral Immune Response*. Front Med (Lausanne), 2021. **8**: p. 746644.

119. Focosi, D., F. Maggi, and A. Casadevall, *Mucosal Vaccines, Sterilizing Immunity, and the Future of SARS-CoV-2 Virulence*. Viruses, 2022. **14**(2).
120. Dangi, T., et al., *Improved control of SARS-CoV-2 by treatment with a nucleocapsid-specific monoclonal antibody*. J Clin Invest, 2022. **132**(23).
121. Zeng, C., et al., *SARS-CoV-2 spreads through cell-to-cell transmission*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2022. **119**(1).
122. López-Muñoz, A.D., et al., *Cell surface SARS-CoV-2 nucleocapsid protein modulates innate and adaptive immunity*. Sci Adv, 2022. **8**(31): p. eabp9770.
123. Fielding, C.A., et al., *SARS-CoV-2 host-shutoff impacts innate NK cell functions, but antibody-dependent NK activity is strongly activated through non-spike antibodies*. Elife, 2022. **11**.
124. Tutukina, M., et al., *IgG Antibodies Develop to Spike but Not to the Nucleocapsid Viral Protein in Many Asymptomatic and Light COVID-19 Cases*. Viruses, 2021. **13**(10).
125. Lutomski, C.A., et al., *Multiple Roles of SARS-CoV-2 N Protein Facilitated by Proteoform-Specific Interactions with RNA, Host Proteins, and Convalescent Antibodies*. JACS Au, 2021. **1**(8): p. 1147-1157.
126. Timani, K.A., et al., *Nuclear/nucleolar localization properties of C-terminal nucleocapsid protein of SARS coronavirus*. Virus Res, 2005. **114**(1-2): p. 23-34.
127. Dangi, T., et al., *Combining spike- and nucleocapsid-based vaccines improves distal control of SARS-CoV-2*. Cell Rep, 2021. **36**(10): p. 109664.
128. Murphy, K. and C. Weaver, *Die T-Zell-vermittelte Immunität*. Janeway Immunologie, 2018: p. 443-515.
129. Tan, A.T., et al., *Early induction of functional SARS-CoV-2-specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients*. Cell Rep, 2021. **34**(6): p. 108728.

130. Jacobsen, H., et al., *Post-vaccination T cell immunity to omicron*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 944713.
131. Tarke, A., et al., *Impact of SARS-CoV-2 variants on the total CD4(+) and CD8(+) T cell reactivity in infected or vaccinated individuals*. Cell Rep Med, 2021. **2**(7): p. 100355.
132. Naranbhai, V., et al., *T cell reactivity to the SARS-CoV-2 Omicron variant is preserved in most but not all individuals*. Cell, 2022. **185**(6): p. 1041-1051.e6.
133. Szeto, C., et al., *The presentation of SARS-CoV-2 peptides by the common HLA-A(*)02:01 molecule*. iScience, 2021. **24**(2): p. 102096.
134. Sanchez-Mazas, A. and J.M. Nunes, *The most frequent HLA alleles around the world: A fundamental synopsis*. Best Pract Res Clin Haematol, 2024. **37**(2): p. 101559.
135. Shomuradova, A.S., et al., *SARS-CoV-2 Epitopes Are Recognized by a Public and Diverse Repertoire of Human T Cell Receptors*. Immunity, 2020. **53**(6): p. 1245-1257.e5.
136. Nielsen, S.S., et al., *SARS-CoV-2 elicits robust adaptive immune responses regardless of disease severity*. EBioMedicine, 2021. **68**: p. 103410.
137. Chen, Z., et al., *T and B cell Epitope analysis of SARS-CoV-2 S protein based on immunoinformatics and experimental research*. J Cell Mol Med, 2021. **25**(2): p. 1274-1289.
138. Lee, E., et al., *Identification of SARS-CoV-2 Nucleocapsid and Spike T-Cell Epitopes for Assessing T-Cell Immunity*. J Virol, 2021. **95**(6).
139. Gasteiger, G., et al., *Cross-priming of cytotoxic T cells dictates antigen requisites for modified vaccinia virus Ankara vector vaccines*. J Virol, 2007. **81**(21): p. 11925-36.

140. Ferretti, A.P., et al., *Unbiased Screens Show CD8(+) T Cells of COVID-19 Patients Recognize Shared Epitopes in SARS-CoV-2 that Largely Reside outside the Spike Protein*. Immunity, 2020. **53**(5): p. 1095-1107.e3.
141. Schulien, I., et al., *Characterization of pre-existing and induced SARS-CoV-2-specific CD8(+) T cells*. Nat Med, 2021. **27**(1): p. 78-85.
142. Habel, J.R., et al., *Suboptimal SARS-CoV-2-specific CD8(+) T cell response associated with the prominent HLA-A*02:01 phenotype*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(39): p. 24384-24391.
143. Kastenmuller, W., et al., *Cross-competition of CD8+ T cells shapes the immunodominance hierarchy during boost vaccination*. J Exp Med, 2007. **204**(9): p. 2187-98.
144. Tao, S., et al., *Sequestration of Late Antigens Within Viral Factories Impairs MVA Vector-Induced Protective Memory CTL Responses*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 2850.
145. Moutaftsi, M., et al., *Vaccinia virus-specific CD4+ T cell responses target a set of antigens largely distinct from those targeted by CD8+ T cell responses*. J Immunol, 2007. **178**(11): p. 6814-20.
146. Graham, B.S., *Rapid COVID-19 vaccine development*. Science, 2020. **368**(6494): p. 945-946.
147. Vitiello, A., et al., *Analysis of the HLA-restricted influenza-specific cytotoxic T lymphocyte response in transgenic mice carrying a chimeric human-mouse class I major histocompatibility complex*. J Exp Med, 1991. **173**(4): p. 1007-15.
148. Samberg, N.L., E.C. Scarlett, and H.J. Stauss, *The alpha 3 domain of major histocompatibility complex class I molecules plays a critical role in cytotoxic T lymphocyte stimulation*. Eur J Immunol, 1989. **19**(12): p. 2349-54.
149. Hamdy, A. and A. Leonardi, *Superantigens and SARS-CoV-2*. Pathogens, 2022. **11**(4).

150. Uraki, R., et al., *Characterization of a SARS-CoV-2 EG.5.1 clinical isolate in vitro and in vivo*. Cell Rep, 2023. **42**(12): p. 113580.
151. Müller, L., et al., *Age-dependent Immune Response to the Biontech/Pfizer BNT162b2 Coronavirus Disease 2019 Vaccination*. Clin Infect Dis, 2021. **73**(11): p. 2065-2072.
152. Ni, B., et al., *SARS-CoV-2 vaccine safety and immunogenicity in patients with hematologic malignancies, transplantation, and cellular therapies*. Blood Rev, 2022. **56**: p. 100984.
153. Wussow, F., et al., *Synthetic multiantigen MVA vaccine COH04S1 and variant-specific derivatives protect Syrian hamsters from SARS-CoV-2 Omicron subvariants*. NPJ Vaccines, 2023. **8**(1): p. 41.
154. Wang, Q., et al., *Deep immunological imprinting due to the ancestral spike in the current bivalent COVID-19 vaccine*. Cell Rep Med, 2023. **4**(11): p. 101258.

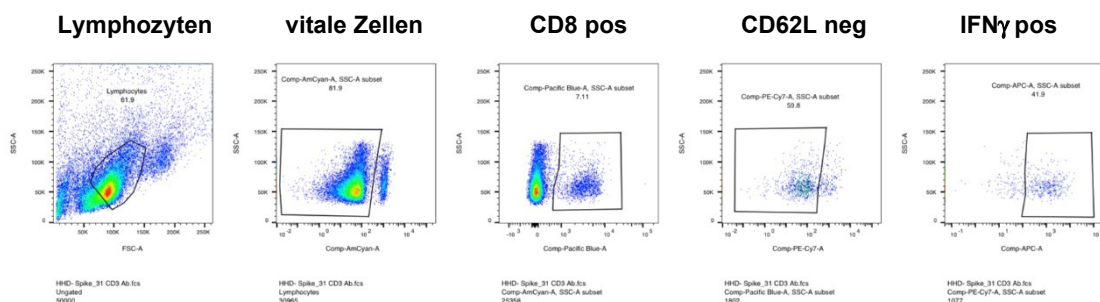
6 Anhang

6.1 FACS Gating Strategie für den Peptide Screening Assay

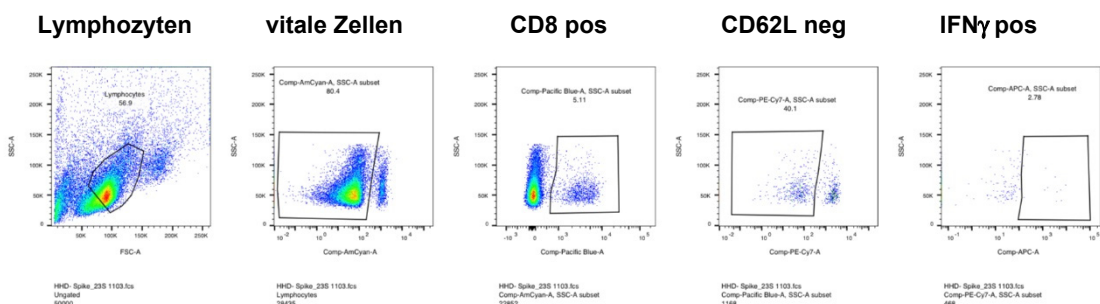
Beispielhafte Darstellung der Auswertung der FACS Analyse des Peptid Screenings (vgl. **Abb. 20**, **Abb. 21**) mit Hilfe des Programms Flow Jo. Zunächst erfolgte eine Selektion der Lymphozytenpopulation (Gate1). Über die Amcyananfärbung konnten avitale Zellen in einem zweiten Schritt von der weiteren Auswertung ausgeschlossen werden (Gate 2: Auswahl vitaler Zellen). Anschließend wurden ausschließlich Pacific Blue gefärbte Zellen, das heißt in diesem Fall Zellen, die CD8 bzw. CD4 positiv sind für die weitere Analyse berücksichtigt (Gate 3). Über die PE-Cy7 Färbung wurden CD62L positive Zellen angefärbt, die von der Auswertung ausgeschlossen wurden (Gate 4: Auswahl CD62L negativer Zellen). Zuletzt erfolgte über APC eine Anfärbung der IFN γ produzierenden T-Zellen. Die im letzten Gate (Gate 5) erfasste IFN γ Produktion bildet somit den prozentualen Anteil aller vitalen CD8 bzw. CD4 positiven, CD62L negativen T-Zellen ab, die über eine Präsentation ihres spezifischen Peptid epitops zur IFN γ Ausschüttung angeregt wurden.

6.1.1 Screening auf immunogene HLA-A2.1 restringierte Spike-Peptide

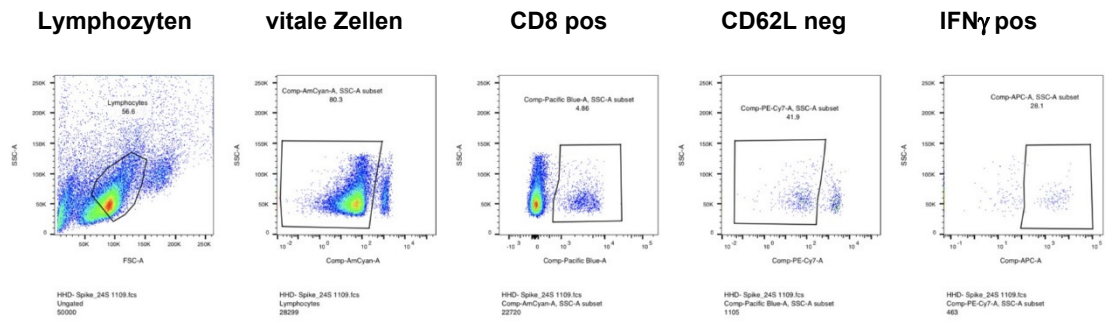
A



B



C



D

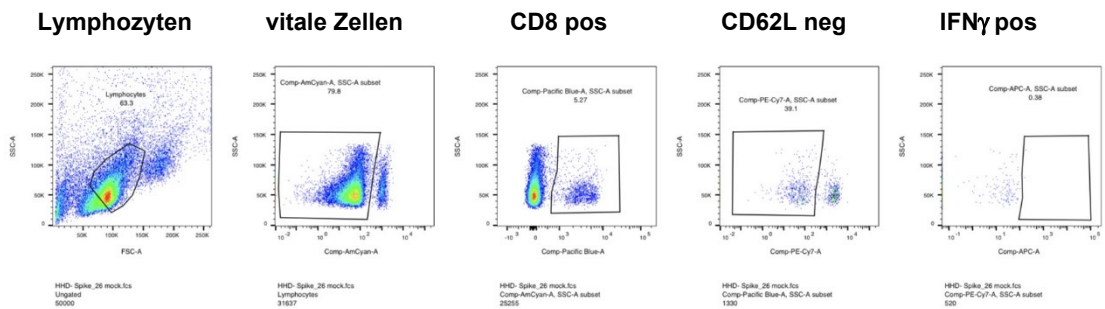
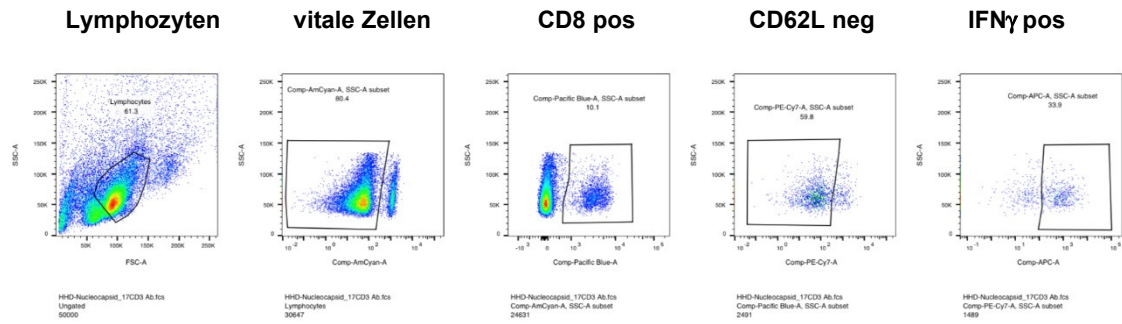


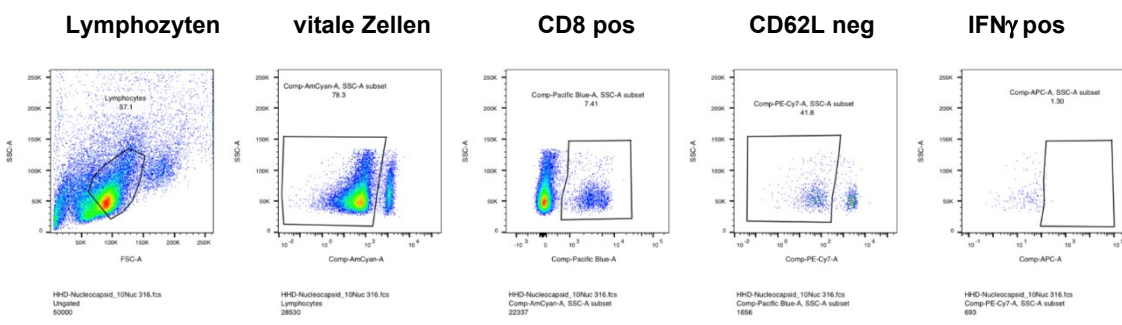
Abb. 23 FACS-Analyse der SARS-CoV-2-Spike-spezifischen HLA-A2.1 restringierten CD8+ T-Zell Antwort nach Impfung mit MVA-Sc und Peptidstimulation *ex vivo*. Dargestellt sind in **A**) Positivkontrolle: über einen CD3 Antikörper stimulierbare CD8+ T-Zellen **B**) S417 (S 1103)-spezifische CD8+ T-Zellen **C**) S976 (S 1109)-spezifische CD8+T-Zellen **D**) Negativkontrolle: nicht stimulierte CD8+ T-Zellen.

6.1.2 Screening auf immunogene HLA-A2.1 restringierte Nukleokapsid-Peptide

A



B



C

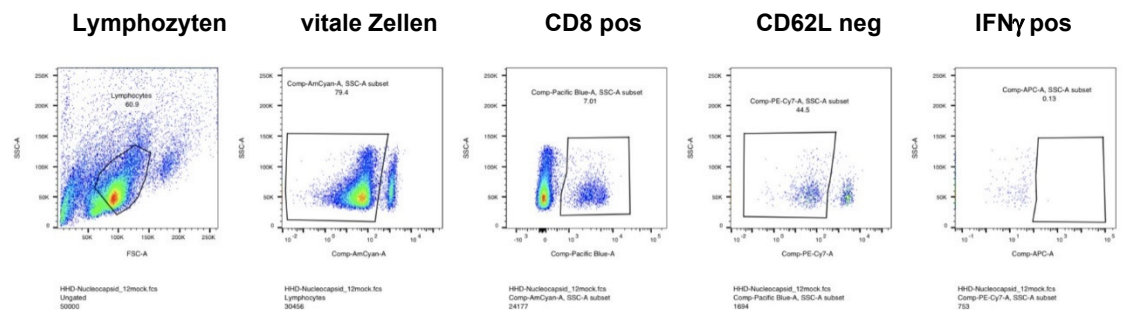
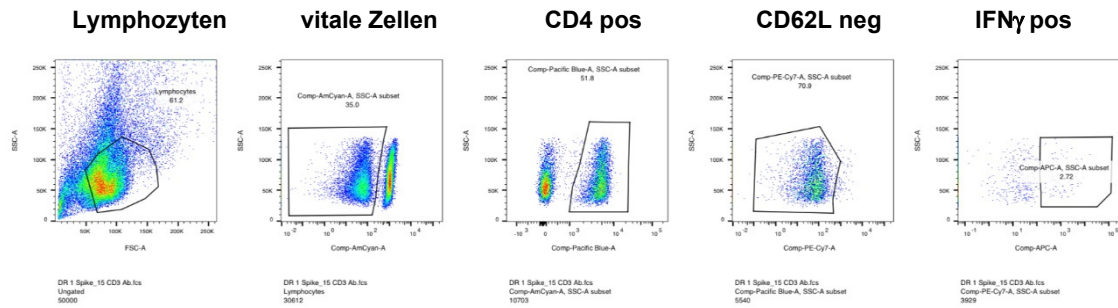


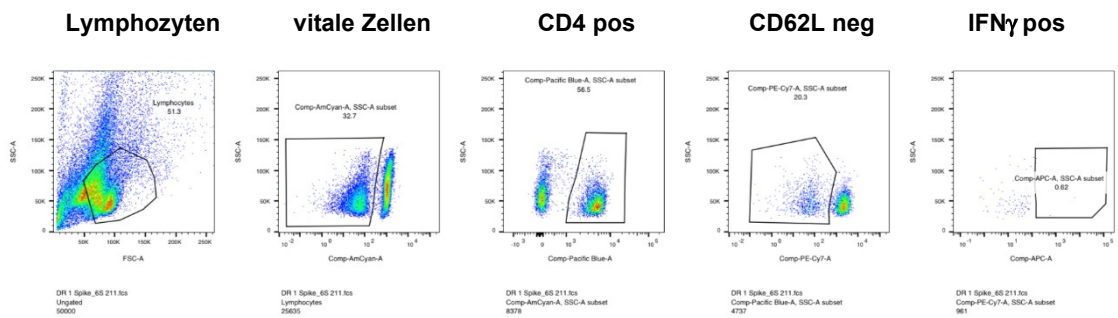
Abb. 24 FACS-Analyse der SARS-CoV-2-Nukleokapsid-spezifischen HLA-A2.1-restringierten CD8+ T-Zell Antwort nach Impfung mit MVA-N und Peptidstimulation *ex vivo*. Dargestellt sind in **A**) Positivkontrolle: über einen CD3 Antikörper stimulierbare CD8+ T-Zellen **B**) Nuc316-spezifische CD8+ T-Zellen **C**) Negativkontrolle: nicht stimulierte CD8+ T-Zellen.

6.1.3 Screening auf immunogene HLA-DR1 restringierte Spike-Peptide

A



B



C

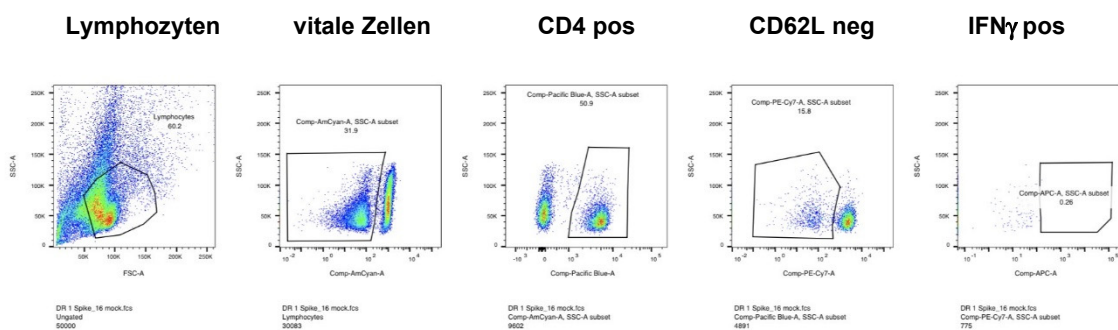
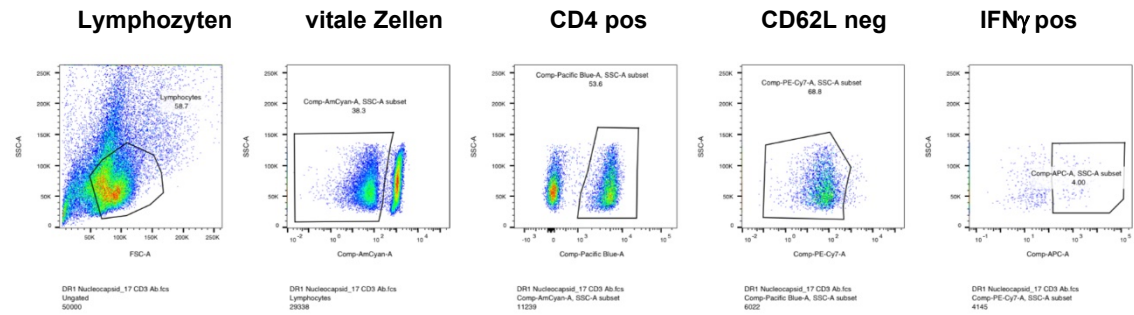


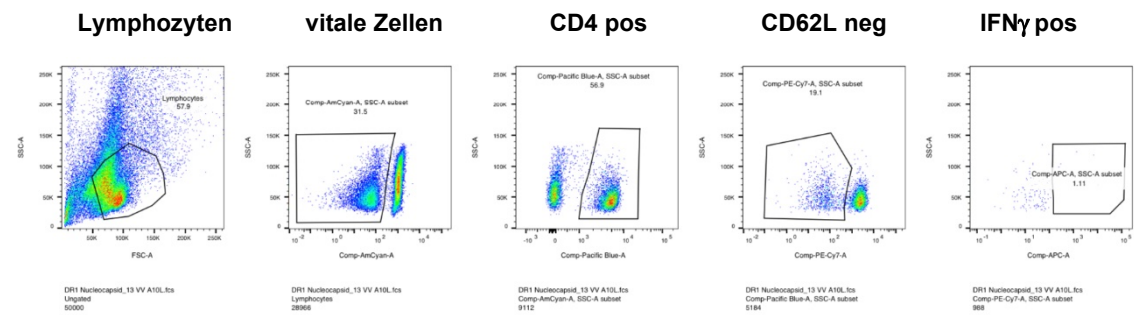
Abb. 25 FACS-Analyse der SARS-CoV-2-Spike-spezifischen HLA-DR1 restringierten CD4+ T-Zell Antwort nach Impfung mit MVA-Sc und Peptidstimulation *ex vivo*. Dargestellt sind in A) Positivkontrolle: über einen CD3 Antikörper stimulierbare CD4+ T-Zellen B) S 211-spezifische CD4+ T-Zellen C) Negativkontrolle: nicht stimulierte CD4+ T-Zellen.

6.1.4 Screening auf immunogene HLA-DR1 restringierte Nukleokapsid-Peptide

A



B



C

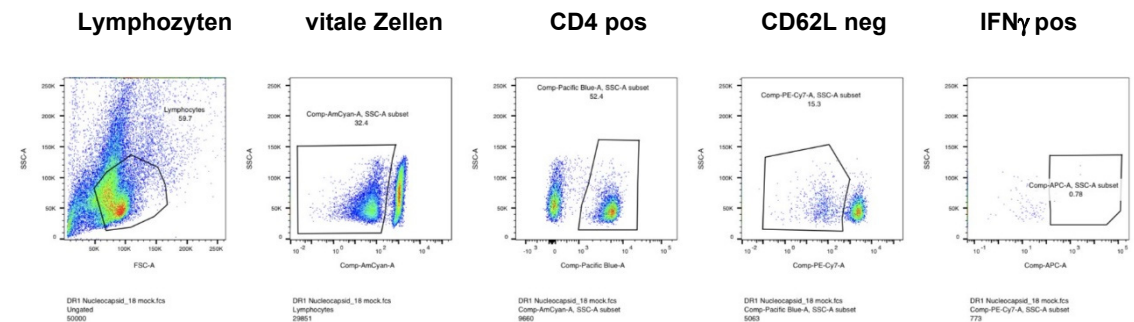


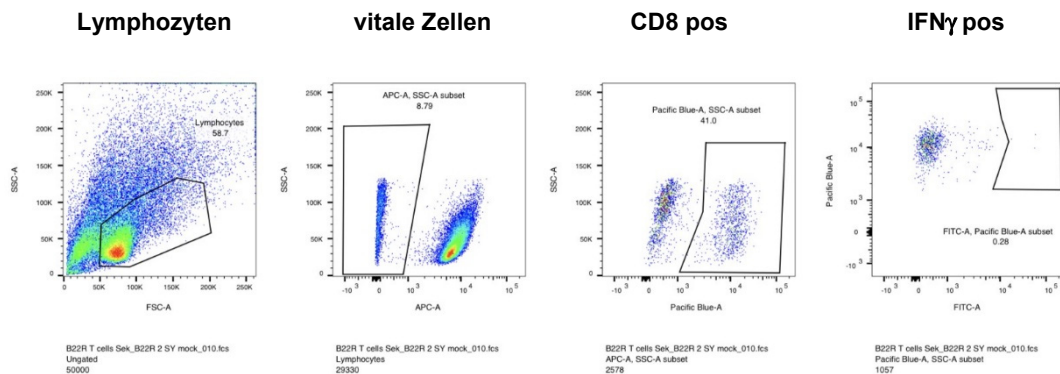
Abb. 26 FACS-Analyse der SARS-CoV-2-Nukleokapsid-spezifischen HLA-DR1-restringierten CD4+ T-Zell Antwort nach Impfung mit MVA-N und Peptidstimulation *ex vivo*. Dargestellt sind in **A)** Positivkontrolle: über einen CD3 Antikörper stimulierbare CD4+ T-Zellen **B)** VVA10L-spezifische CD4+ T-Zellen **C)** Negativkontrolle: nicht stimulierte CD4+ T-Zellen.

6.2 FACS Gating Strategie für den T-Zell-Assay

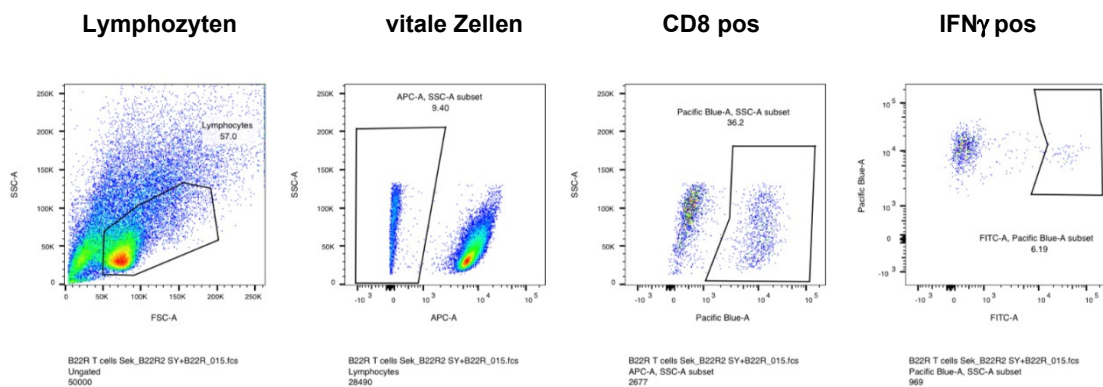
Beispielhafte Darstellung der Auswertung der FACS Analyse der T-Zell-Assays (vgl. **Abb. 22**) mit Hilfe des Programmes Flow Jo. Die Färbung erfolgte bei Passage 1 und Passage 5 über verschiedene Färbeprotokolle. Zunächst erfolgte eine Selektion der Lymphozytenpopulation (Gate 1). Über die APC- (T-Zell-Assay Passage 1) bzw. Amcyanfärbung (T-Zell-Assay Passage 5) konnten avitale Zellen in einem zweiten Schritt von der weiteren Auswertung ausgeschlossen werden (Gate 2: Auswahl vitaler Zellen). Anschließend wurden ausschließlich Pacific Blue gefärbte CD8+ Zellen für die weitere Analyse berücksichtigt (Gate 3). Über FITC (T-Zell-Assay Passage 1) bzw. APC (T-Zell-Assay Passage 5) erfolgte eine Anfärbung der IFN γ -produzierenden T-Zellen. Die im letzten Gate (Gate 4) erfasste IFN γ Produktion bildet somit den prozentualen Anteil aller vitalen CD8+ T-Zellen ab, die über eine Präsentation ihres spezifischen Peptidpitops zur IFN γ Ausschüttung angeregt wurden.

6.2.1 Untersuchung der T-Zell-Reaktivität in T-Zell-Kulturen der Passage Eins

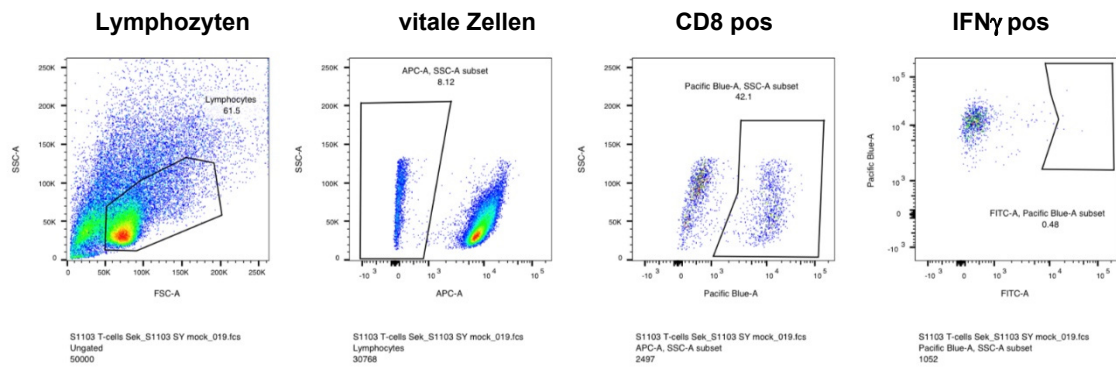
A



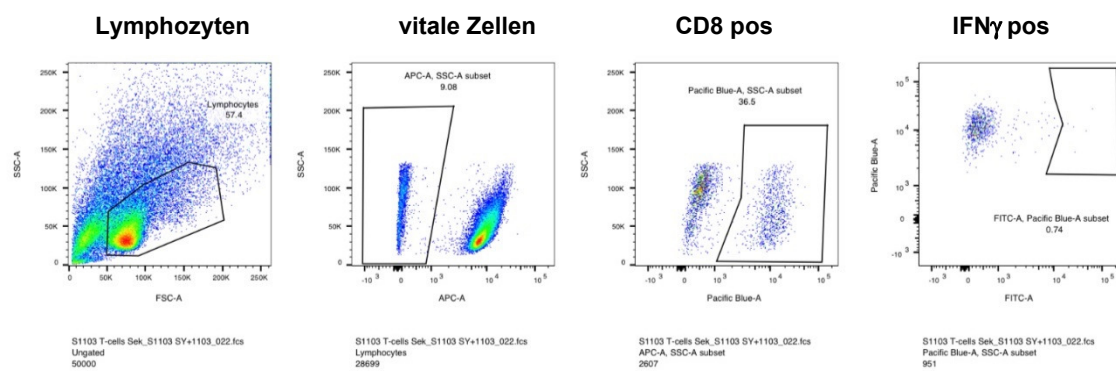
B



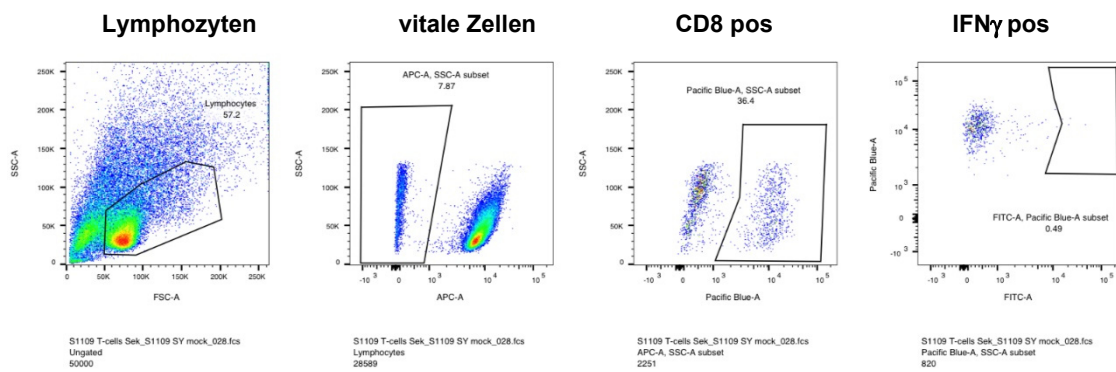
C



D



E



F

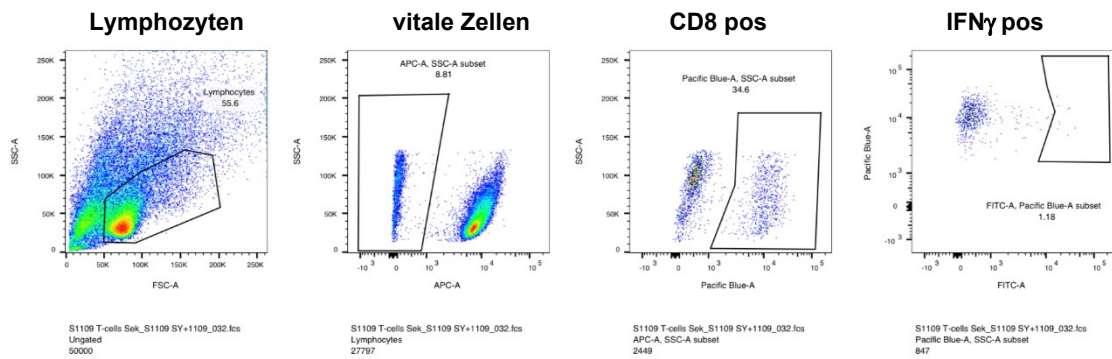
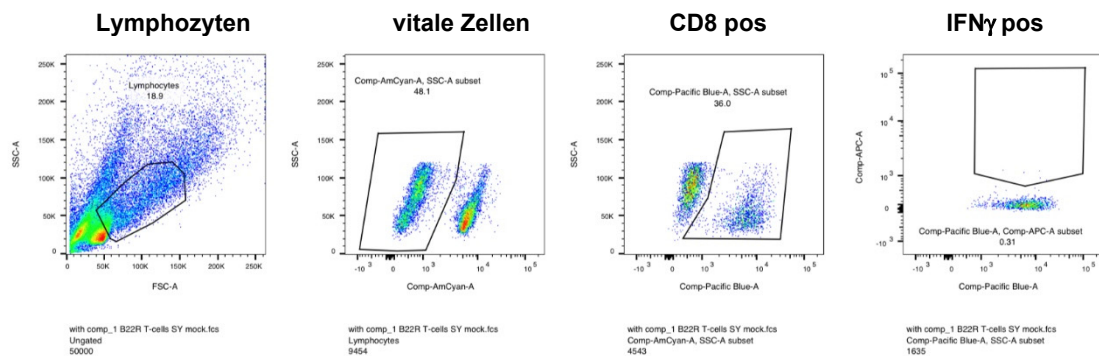


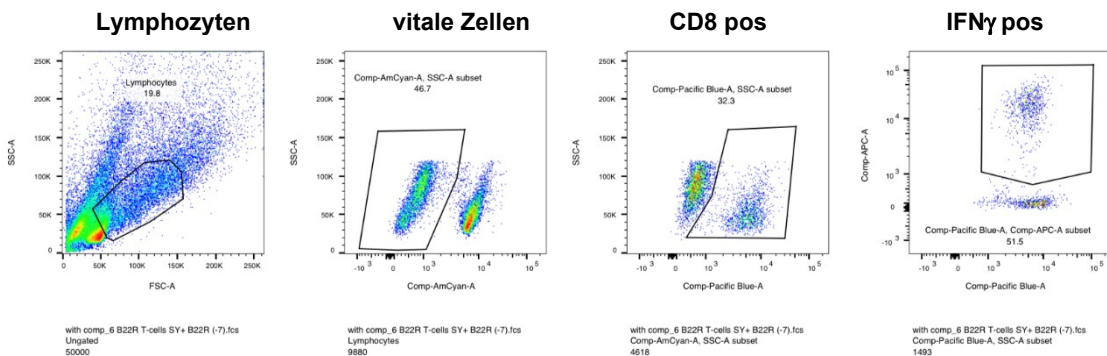
Abb. 27 FACS-Analyse der MVA- bzw. SARS-CoV-2-spezifischen CD8+ T-Zellantworten nach einmaliger Restimulation MVA- und Spike-spezifischer CD8+ T-Zellen *in vitro* und nach Präsentation ihres jeweiligen Peptids durch SY-9287 Zellen. Dargestellt sind in A) nicht stimulierte CD8+ T-Zellen der Linie B22R (mock) B) B22R-spezifische CD8+ T-Zellen nach Stimulation mit ihrem Peptid C) nicht stimulierte CD8+T-Zellen der Linie S417 (S1103) (mock) D) S417 (S 1103)-spezifische CD8+ T-Zellen nach Stimulation mit ihrem Peptid E) nicht stimulierte CD8+ T-Zellen der Linie S976 (S1109) (mock) F) S976 (S1109)-spezifische CD8+ T-Zellen nach Stimulation mit ihrem Peptid.

6.2.2 Untersuchung der T-Zell-Reaktivität der T-Zell-Kulturen in Passage Fünf

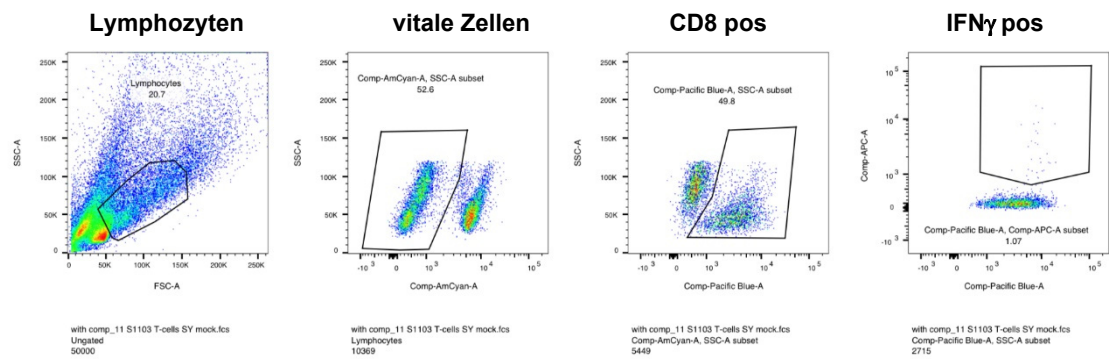
A



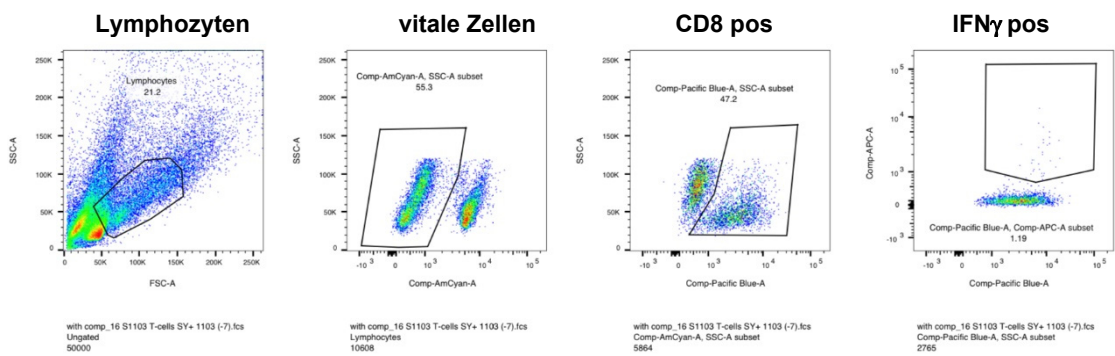
B



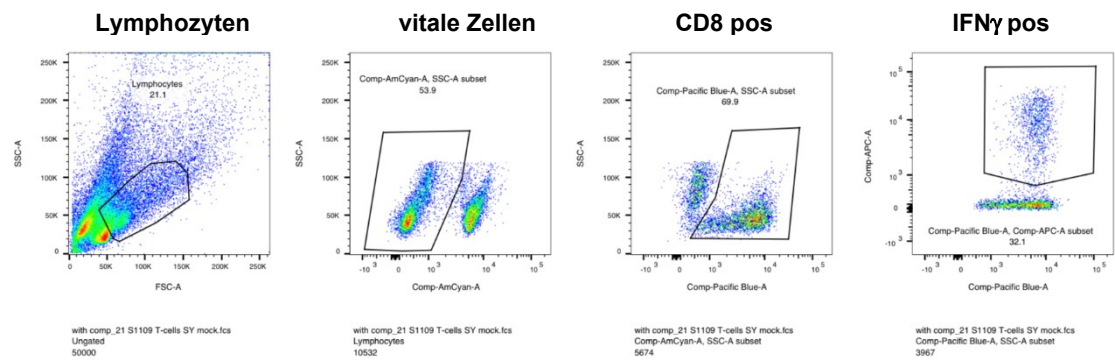
C



D



E



F

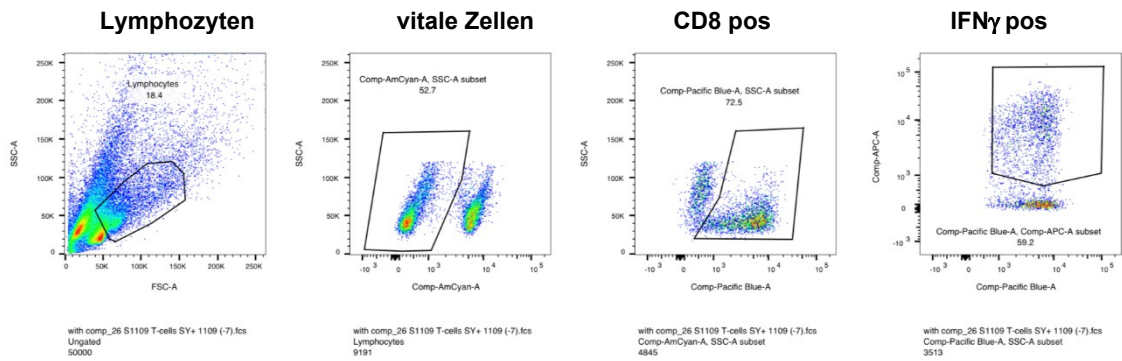


Abb. 28 FACS-Analyse der MVA- bzw. SARS-CoV-2-spezifischen CD8+ T-Zell Antwort nach fünfmaliger Restimulation MVA und Spike-spezifischer CD8+ T-Zellen *in vitro* und nach Präsentation ihres jeweiligen Peptids durch SY-9287 Zellen. Dargestellt sind in A) nicht stimulierte CD8+ T-Zellen der B22R Linie (mock) B) B22R-spezifische CD8+ T-Zellen nach Stimulation mit ihrem Peptid C) nicht stimulierte CD8+T-Zellen der Linie S417 (S 1103) (mock) D) S417 (S1103)-spezifische CD8+ T-Zellen nach Stimulation mit ihrem Peptid E) nicht stimulierte CD8+ T-Zellen der Linie S976 (S 1109) (mock) F) S976 (S1109)-spezifische CD8+ T-Zellen nach Stimulation mit ihrem Peptid.

Danksagung

Zu Beginn der experimentellen Arbeit kamen viele Zweifel auf, ob ich diesen Berg an mir völlig neuen Dingen bewältigen werden kann. Nur dank der Unterstützung durch viele liebe Menschen, die mir in der Zeit sehr ans Herz gewachsen sind, ist all das möglich geworden.

Mein größter Dank gilt dabei meinem Doktorvater Prof. Dr. Ingo Drexler, der mir nicht nur jederzeit bei Fragen zur Seite stand, sondern durch seine motivierende und wertschätzende Art bei mir eine immer größer werdende Begeisterung für das Projekt und die Forschung entfacht hat. Vielen Dank für Alles, vor allem für die vielen Dinge, die ich lernen durfte, das Verständnis und die vielen netten Worte, die mir so manche Zweifel genommen haben!

Daneben möchte ich meiner Co-Betreuerin Prof. Dr. Stefanie Scheu danken, die jederzeit als Ansprechpartnerin bereit stand und sich viel Zeit genommen hat, um mir wertvolle Tipps für das Projekt und die Dissertation mit auf den Weg zu geben.

Außerdem möchte ich mich bei den PhDs Ylenia Longo, Sara Moreno-Mascaraque und Giuseppe Andreacchio bedanken, die immer für mich da waren, wenn ich nicht weiter wusste. Von Beginn an habe ich mich sehr willkommen gefühlt. Für die schöne gemeinsame Zeit bin ich Euch sehr dankbar!

Vielen Dank auch an Ronny Tao, der zum einen durch seine Arbeit und die Herstellung der Impfvektoren nicht nur den Grundstein für das Projekt gelegt hat, sondern mir jederzeit mit seinem Wissen und mit netten Worten zur Seite stand.

Zwar haben wir verhältnismäßig nur eine kurze Zeit am Anfang miteinander verbracht, aber auch bei Annika Voets und Gara Fariq möchte ich mich sehr bedanken, da sie viel Zeit in meine Einarbeitung investiert haben und so ermöglicht haben, dass ich das Projekt nach dem Ende ihrer Arbeit im Labor alleine bewältigen konnte.

Großen Dank auch an Philipp Ostermann und Yvonne Dickschen, die für mich und mit mir den SARS-CoV-2 Neutralisationstest im S3 Labor durchgeführt haben. Die Tage mit Euch haben mir sehr viel Spaß gemacht und ich bin sehr dankbar für die Zeit, die Ihr dafür aufgebracht habt.

Der größte Dank außerhalb des Labors gilt natürlich meinen Eltern, meinem Bruder, meinen beiden Omas, meinen Freundinnen und Philipp, die so einige Hochs und Tiefs während der Zeit miterlebt haben und immer für mich da waren, sei es durch das Ertragen meiner Gefühlsausbrüche, durch aufbauende Worte oder durch schöne Abende oder Ausflüge, die den Kopf zwischendurch haben frei werden lassen.

Die ganze Zeit im Labor ist mir trotz eines Auf und Abs an Gefühlen durchweg sehr positiv in Erinnerung geblieben und hat mich nicht nur an Erfahrung bereichert, sondern auch an lieben Menschen und an Plänen für die berufliche Zukunft.