
Etablierung des Equinen Herpesvirus Typ 1 (EHV-1) als neues virales Vektorsystem

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR.RER.NAT.) DER
NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III -BIOLOGIE UND
VORKLINISCHE MEDIZIN- DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



vorgelegt von
Helga Hofmann-Sieber aus Augsburg
Januar 2008

Die vorliegende Dissertation wurde zwischen Oktober 2003 und Januar 2008 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg durchgeführt.

Promotionsgesuch eingereicht am: 30. 01. 2008

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Ralf Wagner

Prüfungsausschuss

Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. Günter Hauska

Prüfer : Prof. Dr. Ralf Wagner

Prof. Dr. Karl Kunzelmann

Prof. Dr. Wolfgang Seufert

Die vorliegende Arbeit wurde selbstständig, ohne unzulässige Hilfe angefertigt.

Helga Hofmann-Sieber

Meiner Familie

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	10
ZUSAMMENFASSUNG	13
A. EINLEITUNG	15
A.1 Herpesviren	15
A.1.1 Herpesviren allgemein	15
A.1.2 Das Equine Herpesvirus Typ 1	16
A.1.2.1 Allgemein	16
A.1.2.2 Genomorganisation	17
A.1.2.3 Replikationszyklus von EHV-1	17
A.1.2.4 Virusstamm Rach	19
A.2 BAC (Bacterial Artificial Chromosome) Technologie	20
A.2.1 Allgemeine Charakteristika und Herstellung	20
A.2.2 Mutagenese von BACs	22
A.3 Stand der Vakzineentwicklung gegen das Humane Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1)	23
A.3.1 Allgemein	23
A.3.2 Korrelate einer schützenden Immunantwort gegen HIV-1	24
A.4 Vektorsysteme und Vakzinierungsstrategien	26
A.4.1 Allgemein	26
A.4.2 Virale Vektoren	27
A.4.3 DNA-Vektoren	30
A.4.4 Heterologe <i>Prime/ Boost</i> Immunisierungen	31
A.4.5 Limitationen und Hemmnisse aktuell verwendeter viraler Vektorsysteme	32
A.4.6 EHV-1 als virales Vektorsystem	34
A.5 Zielsetzung	35
B. MATERIAL UND METHODEN	36
B.1 Material	36
B.1.1 Zellen	36

B.1.1.1	Prokaryontische Zellen	36
B.1.1.2	Eukaryontische Zellen.....	36
B.1.2	Virus und Bacmid.....	37
B.1.3	DNA	37
B.1.3.1	Oligonukleotide	37
B.1.3.2	Vektoren	39
B.1.4	Antikörper und Peptide	39
B.1.4.1	Primärantikörper	39
B.1.4.2	Sekundärantikörper.....	40
B.1.4.3	Peptide.....	40
B.1.5	Größen- und Molekulargewichtsstandards	41
B.1.6	Kommerzielle Kits	41
B.1.7	Reagenzien und Verbrauchsmaterial	41
B.1.8	Versuchstiere.....	42
B.2	Methoden	42
B.2.1	Mikrobiologische Techniken	42
B.2.1.1	Anzucht und Selektion von Bakterien	42
B.2.1.2	Herstellung kompetenter Bakterien.....	42
B.2.1.2.1	Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien.....	42
B.2.1.2.2	Herstellung elektrokompetenter Bakterien	42
B.2.1.2.3	Herstellung rekombinationskompetenter Bakterien.....	43
B.2.1.3	Transformation von Bakterien.....	43
B.2.1.3.1	Chemische Transformation.....	43
B.2.1.3.2	Elektroporation.....	43
B.2.1.4	Anlegen von Glycerinkulturen	44
B.2.2	Molekularbiologische Arbeitstechniken.....	44
B.2.2.1	Klonierung.....	44
B.2.2.2	DNA-Aufreinigung und Analyse	44
B.2.2.2.1	Plasmid DNA	44
B.2.2.2.2	Bacmid-DNA.....	45
B.2.2.2.3	Genomische/ virale DNA	45
B.2.2.3	PCR-Analyse	45
B.2.2.4	Southern Blot Analyse	45
B.2.2.5	Herstellung von rekombinanten EHV-Bacmiden (En Passant-Methode)....	47
B.2.2.5.1	Herstellung der Transferkonstrukte	47
B.2.2.5.1.1	Herstellung von Transferkonstrukten zur Integration eines Transgens in die Bacmid-Sequenz	47
B.2.2.5.1.2	Herstellung eines Transferkonstrukts zur Deletion von Bacmidsequenz	48
B.2.2.5.2	Einbringen des Transgens in EHV-Bacmid (1. RED-Rekombination).....	49
B.2.2.5.3	Entfernen der Kanamycinresistenz Kassette aus EHV-Bacmid (2. RED-Rekombination).....	49

B.2.3	Proteinbiochemische Methoden	50
B.2.3.1	Aufbereitung von Proteinproben	50
B.2.3.2	Proteinbestimmung nach Bradford	50
B.2.3.3	Analyse der Proteinexpression mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse.....	50
B.2.4	Zellkulturtechniken.....	51
B.2.4.1	Allgemeine Zellkulturtechniken	51
B.2.4.2	CaHPO ₄ —Transfektion	51
B.2.4.3	Generierung von primären Maus-Splenozyten	52
B.2.4.4	Arbeitstechniken mit Virus	52
B.2.4.4.1	Herstellung von infektiösem Virus aus herpesviraler Bacmid-DNA.....	52
B.2.4.4.2	Herstellung hochtitriger Virusstocks	52
B.2.4.4.3	Bestimmung von Infektionsraten	53
B.2.4.4.5	Bestimmung von Virustitern mittels Plaque Assay	53
B.2.5	Immunologische Arbeitstechniken	54
B.2.5.1	Haltung und Immunisierung von Versuchstieren	54
B.2.5.2	Auslesen zellulärer Immunantworten.....	55
B.2.5.2.1	Intrazelluläre IFNy Färbung und Analyse mittels FACS Analyse	55
B.2.5.2.2	Bestimmung IFNy produzierender Splenozyten mittels Elispot Assay	56
B.2.5.3	Auslesen humoraler Immunantworten	57
B.2.5.3.1	Gewinnung von Mausseren.....	57
B.2.5.3.2	Antikörper-ELISA (Ig gesamt/ IgG1/ IgG2a).....	57
B.2.5.4	Auslesen mukosaler Immunantworten.....	58
B.2.5.4.1	Bronchoalveolare Lavage (BAL).....	58
B.2.5.4.2	IgA Antikörper ELISA.....	58
C	ERGEBNISSE.....	60
C.1	Entwicklung und Verifizierung rekombinanter Viren	60
C.1.1	Herstellung rekombinanter Viren	60
C.1.1.1	Allgemein	60
C.1.1.2	Aufbau des Transferkonstrukts	61
C.1.1.3	Homologe Rekombination.....	62
C.1.1.3.2	Entfernen der Kanamycinresistenz-Kassette aus dem rekombinanten BAC (2. RED-Rekombination)	64
C.1.1.4	Überblick rekombinante Bacmide	65
C.1.2	Stabilität der viralen Konstrukte	67
C.1.3	Verifizierung rekombinanter Viren	71
C.1.3.1	Southern Blot Analyse bestätigt erfolgreiche Integration des Transgens in das EHV Bacmid	71
C.1.3.2	Mit rekombinantem EHV infizierte Zellen zeigen gute Expression des viralen Transgens	72
C.1.3.3	Southern und Western Blot Analyse der rekombinanten EHV im Überblick.....	73

C.2 In vivo Applikation rekombinanter Viren	75
C.2.1 Rekombinantes EHV induziert in niedrigen Dosen über verschiedene Applikationswege gute Transgen-spezifische zelluläre Immunantworten	75
C.2.2 Durch kombinierte Applikation von rekombinantem EHV und Plasmid-DNA werden Transgen-spezifische Immunantworten verstärkt.....	78
C.2.3 Mehrfache Applikation von rekombinantem EHV führt zu keiner Verstärkung Transgen-spezifischer Immunantworten	82
C.3 Erhöhung von Vektorsicherheit	86
C.3.1 Allgemein	86
C.3.2 Herstellung von UL48-deletierten Viren.....	87
C.3.2.1 Überblick über UL48-deletierte Bacmide	88
C.3.2.2.2 PCR-Analyse viraler DNA aus infizierten Zellen bestätigt die Deletion des UL48-Leserahmens aus dem viralen Genom	90
C.3.2.2.3 Western Blot Analyse bestätigt Transgen-Expression von UL48-deletierten Viren.....	92
C.3.2 Charakterisierung delta eTIF Mutanten in vitro.....	93
C.3.2.1 Wachstumskinetik UL48-deletierter EHV in lytisch infizierbaren Zellen.....	93
C.3.2.1.1 Infektionskinetiken zeigen Replikationsdefekt UL48-deletierter Viren	93
C.3.2.1.2 Virusinfektion von RK13 Zellen mit UL48-deletiertem Virus ist selbstlimitierend	95
C.3.2.2 Einfluss des UL48-Defekt auf die Infektion humaner Zellen in vitro	96
C.3.2.2.1 UL48-deletiertes Virus zeigt abgeschwächten Infektionsverlauf in humanen Zellen.....	96
C.3.2.2.2 Infizierte humane Zellen zeigen im Verlauf der Infektion mit UL48-deletierten Viren keinen Anstieg der Virusmenge im Zellüberstand	97
C.3.3 Bestimmung des immunogenen Potentials UL48-deletierter Viren <i>in vivo</i>	98
C.3.3.1 Einfache nasale Immunisierung mit UL48-deletierten Viren induziert <i>in vivo</i> schlechtere zelluläre Immunantworten als UL48-haltige Viren.....	98
C.3.3.2 Austestung unterschiedlicher Prime-Boost-Strategien mit UL48-deletiertem Virus.....	100
C.3.3.2.1 Homologe Prime-Boost-Strategien mit UL48-deletierten Viren führen zu keiner Verstärkung Transgen-spezifischer zellulärer Immunantworten in BALB/c Mäusen	100
C.3.3.2.2 Heterologe Prime-Boost Strategien mit UL48-deletierten Viren induzieren gute Transgen-spezifische Immunantworten	103
D. DISKUSSION	105
D.1 Herstellung von rekombinantem EHV-1	105
D.1.1 BAC-Technologie ermöglicht die schnelle und effiziente Herstellung rekombinanter Viren	105
D.1.2 <i>En Passant</i> -Methode zur Mutagenese des EHV-Bacmid ist herkömmlichen Mutagenese-Methoden überlegen	105
D.2 Evaluierung von EHV-1 als virales Vektorsystem	108

D.2.1	Induktion spezifischer Immunantworten	108
D.2.1.1	Geringe Mengen von EHV-syngag induzieren Transgen-spezifische zelluläre Immunantworten	108
D.2.1.2	Heterologer Prime/ Boost mit DNA/ EHV induziert starke Transgen-spezifische Titer von sekretorischem Immunglobulin A (sIgA)	109
D.2.1.3	Heterologer Prime/ Boost mit DNA/ EHV induziert gute Th1-polarisierte systemische Immunantworten	111
D.2.1.4	Heterologer Prime/ Boost mit DNA/ EHV löst im Mausmodell starke Transgen-spezifische CTL- Immunantworten aus	112
D.2.2	Vektorimmunität	114
D.2.3	Vektorsicherheit	115
D.2.3.1	Modellvorstellung zum Replikationsdefekt UL48-deletierter Viren	116
D.2.3.2	Replikationskompetentes versus replikationsdefizientes EHV- Beurteilung des immunogenen Potentials UL48-deletierter Viren	117
D.3	Ausblick	119
D.3.1	Durchführung von Studien zur Biodistribution und Toxizität von EHV-1	119
D.3.2	Weiterentwicklung des Vektors für Vakzinierungsapplikationen	119
D.3.3	Weiterentwicklung des Vektors für gentherapeutische Anwendungen	120
D.3.4	Einsatz von EHV-1 in der Diagnostik	120
Literaturverzeichnis	121	
Publikationen	135	
Danksagung	137	

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AP	Alkalische Phosphatase
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BAL	Bronchoalveolare Lavage
BFA	Brefeldin A
BGH	Bovines Wachstumshormon
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CD	<i>Cellular Determinant</i>
CTB	Choleratoxin Untereinheit B
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	<i>early</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EHV-1	Equines Herpesvirus Typ 1
ER	Endoplasmatisches Retikulum
etc.	<i>et cetera</i>
eTIF	<i>equine trans-inducing factor</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FKS	Fötales Kälberserum
F-Plasmid	Fertilitätsplasmid
G	Guanin
Gag	Gruppenspezifisches Antigen
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
gpt	Guaninphosphoribosyltransferase
h	Stunde
hCMV	Humanes Cytomegalie Virus
HIV-1	Humanes Immundefizienz Virus 1

HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
HRP	Meerrettichperoxidase
HSV-1	Herpes Simplex Virus Typ 1
i.m.	intramuskulär
i.n.	intranasal
IE	<i>immediate early</i>
IFN γ	Interferon gamma
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IL10	Interleukin 10
IL2	Interleukin 2
Iono	Ionomycin
IR	<i>internal repeat</i>
kb	Kilobase
L	<i>late</i>
LPS	Lipopolysaccharid
mCMV	Murines Cytomegalie Virus
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MVA	<i>Modified Vaccinia Ankara</i>
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
NYVAC	<i>New York Vaccinia</i>
ori	<i>origin of replication</i>
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pfu	<i>plaque forming units</i>
PMA	Phorbol 12-Myristat-13-Acetat
POD	Peroxidase
PSM	Positiver Selektionsmarker

Rev	<i>regulator of expression of viral proteins</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
s.c.	Subkutan
sfu	<i>spot forming units</i>
slgA	sekretorisches Immunglobulin A
SV 40	Simianes Virus 40
T	Thymin
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
tpa	<i>tissue plasminogen activator</i>
TR	<i>terminal repeat</i>
TTBS	Tween-haltige Tris-gepufferte Kochsalzlösung
U _L	<i>unique long</i>
U _S	<i>unique short</i>
VZV	Varicella Zoster Virus
WHO	<i>World Health Organisation</i>

Zusammenfassung

Die Anwendung viraler Vektorsysteme für den heterologen Gentransfer ist stark limitiert durch Faktoren wie präexistierende Immunität, Pathogenität oder geringes immunogenes Potential. In der vorliegenden Arbeit wurde daher das Equine Herpesvirus Typ 1 (EHV-1) hinsichtlich seiner Eignung als neues virales Vektorsystem evaluiert. Das Virus infiziert effizient eine große Bandbreite eukaryontischer Zellen und lässt sich *in vitro* in kurzen Replikationszyklen hochtitrig vermehren. Während das Virus im Pferd respiratorische Erkrankungen und Aborte verursacht, deuten alle bislang gewonnenen Daten darauf hin, dass es im Menschen apathogen und in seiner Replikation in humanen Zellen stark beeinträchtigt ist. Aufgrund der extrem niedrigen Prävalenz von EHV-1 im Menschen, ist zudem mit präexistierender Immunität nicht zu rechnen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass neutralisierende Antikörper, die gegen humane Herpesviren gerichtet sind, keine Kreuzreaktivität zu EHV-1 aufweisen.

Vom methodischen Standpunkt aus ermöglichen die Existenz eines EHV- *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC) und das Verfahren der homologen RED-Rekombination eine schnelle und einfache Herstellung rekombinanter Viren. Auf diese Weise wurde im Rahmen dieser Arbeit ein breites Spektrum rekombinanter EHV-Konstrukte hergestellt, die nach Transduktion die eingebrachten Transgene wie z.B. unterschiedliche HIV-1 Antigene oder das grün fluoreszierende Protein (GFP) effizient exprimieren.

Im Verlauf der Arbeit wurden diese Konstrukte hinsichtlich ihres immunogenen Potentials im Mausmodell ausgetestet. Dabei ergab sich, dass bereits geringe Virusmengen in der Größenordnung von 10^4 infektiösen Einheiten nach systemischer oder intranasaler Applikation für die Induktion Transgen-spezifischer Immunantworten ausreichend sind. Als besonders vielversprechend zeigte sich die intranasale Verabreichung des Virus in Kombination mit einer systemisch applizierten Plasmid DNA-Immunisierung. Mit dieser heterologen *Prime/ Boost*-Strategie konnte neben einer verstärkten systemischen Transgen-spezifischen Immunantwort zusätzlich eine sehr gute Schleimhautimmunität induziert werden, die insbesondere hinsichtlich der Wirksamkeit eines HIV-Impfstoffes von großer Bedeutung ist.

Ein weiteres Augenmerk der Arbeit lag auf einer erhöhten Vektorsicherheit. Die Replikation des Virus ist in humanen Zellen zwar stark reduziert, aber nicht völlig unterbunden. Deshalb wurde eine Virusmutante erzeugt, in der der equine trans-induzierende Faktor (eTIF), ein wichtiges Tegumentprotein und verantwortlich für die Transaktivierung des einzigen *immediate early* Gens, deletiert wurde. Die eTIF-deletierten Viren infizieren *in vitro* effizient ein breites Spektrum unterschiedlicher eukaryontischer Zellen, jedoch konnte in humanen Zellen keine Produktion von Nachkommenviren mehr nachgewiesen werden. Gleichzeitig

zeigen Experimente im Mausmodell, dass die guten immunologischen Eigenschaften des Virus bei Verwendung geeigneter heterologer *Prime/ Boost* Vakzinierungsstrategien auch in den eTIF-deletierten Mutanten erhalten bleiben.

Insgesamt sind die in der Arbeit gewonnenen Daten hinsichtlich eines Einsatzes des Equinen Herpesvirus als neues virales Vektorsystem vielversprechend. Aufgrund der guten Immunisierungsergebnisse, die mit heterologen Immunisierungsstrategien erzielt werden, ist das Virus ein aussichtsreicher Kandidat für Vakzineapplikationen. Besonders hebt sich dabei die gute Schleimhautimmunantwort hervor, die durch EHV hervorgerufen wird und gerade im Kontext einer schützenden HIV-Vakzine eine Schlüsselrolle einnimmt, weil dadurch Viren bereits an einer der Haupteintrittspforten abgefangen werden können. Gleichzeitig befürworten die sehr schwachen Transgen-spezifischen zellulären Immunantworten, die durch homologe *Prime/ Boost*-Applikation von UL48-deletiertem EHV hervorgerufen werden, auch den Einsatz des Virus für gentherapeutische Anwendungen. Durch seinen Tropismus für professionelle Antigen-präsentierende Zellen (Monocyten, B-Zellen, Dendriten) ist das Virus darüber hinaus auch für diagnostische Anwendungen, wie z.B. das Auslesen von T-Zell-Immunantworten, einsetzbar.

A. Einleitung

A.1 Herpesviren

A.1.1 Herpesviren allgemein

Herpesviren sind weltweit stark verbreitet und finden sich in fast allen Wirbeltierarten - vom Mensch über Känguruhs und Fledermäuse bis hin zu Fischen und Fröschen (Davison *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 1985; Pearson, 2004; Wibbelt *et al.*, 2007). Trotz der hohen Diversität der Wirtsorganismen weisen die Vertreter der *Herpesviridae* viele Gemeinsamkeiten auf. Alle herpesviralen Partikel bestehen aus einem Core-assozierten, linearen, doppelsträngigen DNA-Genom, das von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben ist. Das Kapsid hat einen Durchmesser von ungefähr 115-130 nm und ist aus insgesamt 162 Kapsomeren aufgebaut (McGeoch *et al.*, 2006). Die Virionen sind umhüllt mit einer von der Wirtszelle abgeleiteten Membran, in die spezifische, Virus-assozierte Glykoproteine eingelagert sind. Zwischen Kapsid und Hülle befindet sich das Tegument, in dem verschiedene regulatorisch aktive Proteine enthalten sind, die zum Zeitpunkt der Infektion mit in die Zelle eingebracht werden (Modrow *et al.*, 2002).

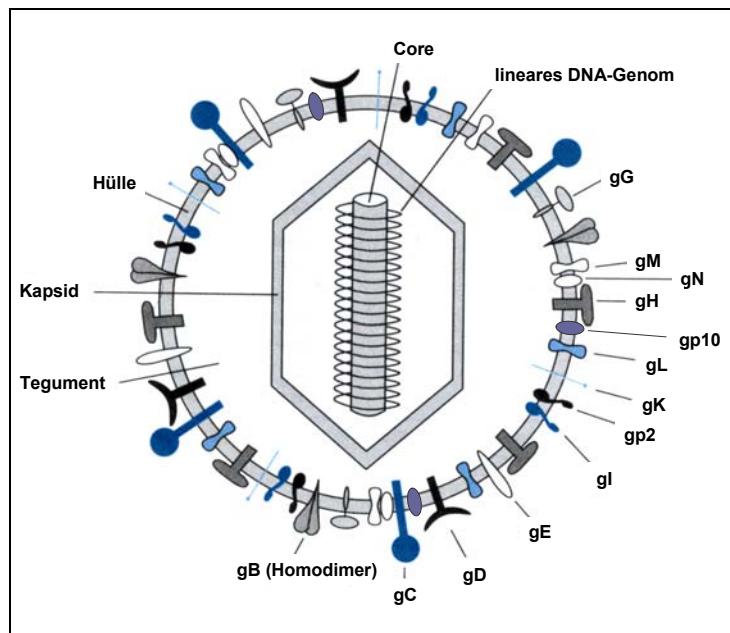


Abb. A-1: Schematische Darstellung des Equinen Herpesvirus Typ 1 (EHV-1) (modifiziert nach Modrow *et al.*, 2002)

Das Virion ist aufgebaut aus den für Herpesviren typischen strukturellen Bestandteilen: Hülle, Tegument, Kapsid und Core.

Das virale doppelsträngige, lineare DNA-Genom liegt Core-assoziert umgeben von dem ikosaedrischen Kapsid vor.

Engelagert in die Hüllmembran befinden sich die dreizehn für EHV-1 beschriebenen Oberflächenproteine (Osterrieder *et al.*, 1999), angedeutet durch die verschiedenen Symbole.

Neben ihren morphologischen Gemeinsamkeiten gleichen sich die *Herpesviridae* auch in ihren grundlegenden biologischen Eigenschaften. Die Synthese der herpesviralen DNA und der Zusammenbau der Kapside findet im Zellkern der Wirtszelle statt, die finale Prozessierung der Partikel im Cytoplasma.

Die Infektion mit Herpesviren erfolgt entweder lytisch oder latent. Der lytische Infektionsverlauf von Herpesviren geht unweigerlich mit der Zerstörung der infizierten Zelle einher. Bei der latenten Infektion verbleiben die Viren dauerhaft ohne Auftreten von

Krankheitssymptome als episomale, zirkuläre DNA-Strukturen im Wirtsorganismus. Während der Latenz werden keine Nachkommenviren gebildet, und nur ein kleiner Teil der viralen Proteine wird prozessiert. Der Übergang von der latenten in die lytische Phase wird als Reaktivierung bezeichnet. Der molekulare Mechanismus einer solchen Reaktivierung ist bislang noch unbekannt (Pellet und Roizman, 2007).

Basierend auf ihrer Pathogenität, ihrem Zelltropismus und ihren replikativen Eigenschaften lassen sich die *Herpesviridae* in drei Unterfamilien einteilen – *Gammaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* und *Alphaherpesvirinae* (Davison et al., 2005).

Gammaherpesvirinae haben ein sehr enges Wirtszellspektrum und infizieren vorwiegend B- oder T-Lymphozyten, in denen sie während der Latenzphase auch persistieren. Man unterscheidet zwei Genera – die *Lymphocryptoviren* (z.B. Epstein Barr-Virus) und *Rhadinoviren* (z.B. Humanes Herpesvirus 8).

Betaherpesvirinae verfügen ebenfalls nur über ein sehr enges Wirtszellspektrum und weisen darüber hinaus sehr lange Replikationszeiten auf. Infizierte Zellen zeigen im Verlauf der Infektion morphologisch eine starke Vergrößerung (Cytomegalie). Typische Vertreter der drei Genera, in die sich *Betaherpesvirinae* unterteilen lassen, sind das humane Cytomegalievirus (Genus *Cytomegalovirus*), das murine Cytomegalievirus (Genus *Muromegalovirus*) und die Humanen Herpesviren 6 und 7 (Genus *Roseolovirus*).

Alphaherpesvirinae zeichnen sich durch kurze Replikationszyklen und ein breites Wirtszellspektrum aus. Latente Stadien entwickelt diese Unterfamilie vorwiegend in sensorischen Ganglien. Die *Alphaherpesvirinae* werden in vier Genera unterteilt: *Simplexvirus*, *Varicellovirus*, *Illovirus* und *Mardivirus*. Die beiden letzteren wurden erst 2004 von dem *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)* als neue Genera der *Alphaherpesvirinae* festgelegt und enthalten ausschließlich aviane Herpesviren.

Der wichtigste Vertreter des Genus der *Simplexviren* ist das humane Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1). Dem Genus der *Varicelloviren* gehören unter anderem das humane Varicella Zoster Virus (VZV) und das Equine Herpesvirus Typ 1 (EHV-1) an (schematische Darstellung siehe Abb. A-1)

A.1.2 Das Equine Herpesvirus Typ 1

A.1.2.1 Allgemein

Das Equine Herpesvirus Typ 1 (EHV-1) wurde erstmals 1932 mit dem spontanen Auftreten von Aborten bei Pferden in Verbindung gebracht (Dimock und Edwards, 1933). Neben Aborten verursacht EHV-1 in Pferden vor allem Erkrankungen der Atemwege und in seltenen Fällen auch neuronale Schädigungen (O'Callaghan und Osterrieder, 1999). Neurotropismus und Latenz in neuronalen Zellen sind für *Alphaherpesvirinae* gut dokumentiert (Baxi et al., 1996; Slater et al., 1994). Neuronale Schädigungen durch eine EHV-1 Infektion sind nach

derzeitigem Stand der Erkenntnis jedoch weniger auf eine Infektion neuronaler Zellen als auf eine Zellschädigung durch Entzündungsreaktionen infizierter Endothelzellen im umliegenden Gewebe zurückzuführen (Edington *et al.*, 1986).

Bevorzugtes Ziel der Infektion, Replikation und Latenz von EHV-1 sind die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) (Kydd *et al.*, 2006; Slater *et al.*, 1994; Welch *et al.*, 1992). Nach Eintritt des Virus in den Organismus über mukosale Epithelzellen (vorwiegend im respiratorischen Trakt) kommt es zur Infektion von PBMC. Dies kann zum einen in einer lytischen Infektion und Virusfreisetzung resultieren, zum anderen kann es aber auch zur Einwanderung der infizierten Zellen in die Lymphknoten und zur Persistenz kommen (Review von Allen *et al.*, 2004).

A.1.2.2 Genomorganisation

Das virale EHV-1 Genom besteht aus einem linearen, doppelsträngigen DNA-Molekül mit einer Größe von etwa 150 Kilobasen (kb). Die DNA ist in ein langes und kurzes Segment unterteilt, die kovalent miteinander verknüpft sind.

Das lange Segment enthält vorwiegend einmalig vorkommende Sequenzabschnitte und wird deshalb auch als *Unique Long Region* bezeichnet (U_L). Das kurze Segment besteht aus einem kurzen, zentralen, nicht-repetitiven Sequenzbereich, der sogenannten *Unique Short Region* (U_S), die von zwei repetitiven Sequenzabschnitten, den *Terminal* und *Inverted Repeats* (TR und IR), flankiert ist (Henry *et al.*, 1981).

Das kurze Segment kann gegenüber dem langen Segment invertieren, so dass das virale Genom in zwei Isoformen vorliegen kann (O'Callaghan und Osterrieder, 1999) (siehe auch Abb. A-2).

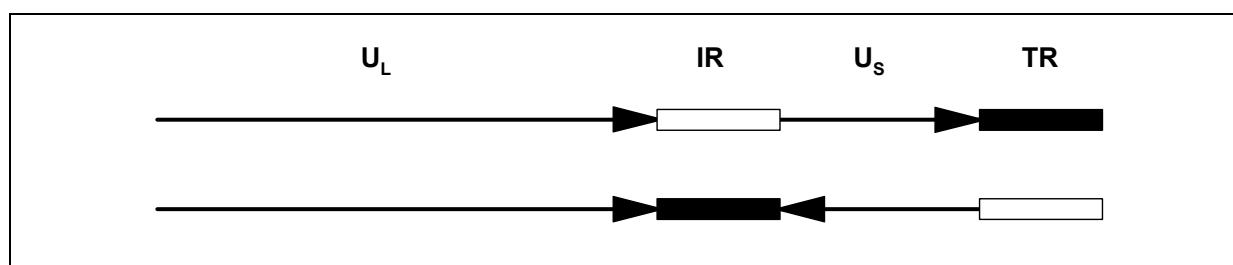


Abb. A-2: Isoformen des EHV-1 Genoms

U_L : Unique Long Region; U_S : Unique Short Region TR: Terminal Repeat Region; IR: Internal Repeat Region

A.1.2.3 Replikationszyklus von EHV-1

Die Replikation von EHV-1 erfolgt nach einem für *Alphaherpesvirinae* typischen Muster (siehe Abb. A-3). Dabei kommt es zunächst in einem zweistufigen Prozess zur Anheftung von EHV-1 an die Wirtszelle. In einem ersten Schritt lagern sich die Glykoproteine gB und gC

des Virus an Heparansulfate auf der Zellmembran der Wirtszelle an (Neubauer *et al.*, 1997; Osterrieder, 1999). Danach bindet das Virus über das Glycoprotein gD (Csellner *et al.*, 2000) an einen bislang unbekannten zellulären Rezeptor (Frampton, Jr. *et al.*, 2005) und das Viruspartikel wird in die Zelle aufgenommen.

Für die Penetration des Virus wurden *in vitro* zwei unterschiedliche Mechanismen nachgewiesen (Frampton, Jr. *et al.*, 2007). In dem einen Fall kommt es zu einer pH-unabhängigen, direkten Fusion der Virushülle mit der Zellmembran und Freisetzung der nackten Nukleokapside ins Cytoplasma. Im anderen Fall wird das Viruspartikel endocytotisch aufgenommen. Dieser Aufnahmeweg entspricht dabei nicht einer klassischen, pH-abhängigen Clathrin- bzw. Calveolae-vermittelten Endocytose, sondern ist sowohl Clathrin- als auch Calveolae-unabhängig (Frampton, Jr. *et al.*, 2007). Die pH-abhängige Aufnahme von EHV-1 entspricht damit einer nicht-klassischen Endocytose bzw. Phagocytose der Partikel.

Unabhängig vom Penetrationsmechanismus resultieren beide Arten der Aufnahme in einer produktiven Infektion der Zelle.

Nach ihrer Aufnahme wandern die Viruspartikel der *Alphaherpesvirinae* entlang der Mikrotubuli zu den Poren des Zellkerns. Hier wird die virale DNA aus dem Kapsid in den Kern entlassen, und es kommt zur Transkription der viralen Gene. Die Transkription ist kaskadenartig reguliert; je nach zeitlichem Auftreten der Transkripte unterscheidet man *immediate early* (IE), *early* (E) und *late* (L) Gene (Modrow *et al.*, 2002).

EHV-1 zeichnet sich dabei dadurch aus, dass es nur ein einziges IE Gen besitzt, von dem die Transkription aller anderen viralen Gene abhängig ist (Gray *et al.*, 1987). Das IE Gen ist in den *Repeat*-Regionen IR und TR im kurzen Segment codiert und liegt demzufolge in zwei Kopien im viralen Genom vor (Grundy *et al.*, 1989).

Die Transkription des IE Gens wird durch Bindung eines Proteinkomplexes an den IE-Promotor aktiviert. Dieser Komplex besteht aus dem viralen *equine Transinducing Factor* (eTIF) und den zellulären Proteinen, Oct-1 und HCF (*Host Cell Factor*) (Elliott und O'Hare, 1995; Grapes und O'Hare, 2000). Bei eTIF handelt es sich um ein Tegumentprotein, das bei der Infektion mit in die Zelle gelangt (Lewis *et al.*, 1993). Während der viralen Replikation wird eTIF selbst erst spät im Infektionszyklus gebildet.

Nach Beginn der DNA-Replikation und Synthese der viralen Strukturproteine bilden sich im Nukleus virale Nukleokapside. Die weitere Prozessierung der *Alphaherpesvirinae* bis zur Freisetzung ist derzeit noch umstritten (Campadelli-Fiume und Roizman, 2006). Am wahrscheinlichsten ist jedoch die Theorie des *Double-Envelopment*-Modells (Mettenleiter, 2004; Skepper *et al.*, 2001). Danach erhalten die Nukleokapside durch einen Knospungsvorgang (*Budding*) an der inneren Kernmembran eine Kernmembran-assoziierte Hülle (primäres *Envelopment*) und wandern in den perinukleären Raum ein. In einem

zweiten Schritt kommt es durch einen Fusionsprozess mit der äußeren Kernmembran zur Abstreifung der Hülle (*Deenvelopment*) und zur Freisetzung nackter Nukleokapside in das Cytoplasma.

In einem komplexen Vorgang wird im Cytoplasma die virale Tegumentstruktur aufgebaut. Die tegumenthaltigen Nukleokapside knospen dann in Trans-Golgi-Vesikel, in denen sie eine Cytoplasma-assozierte Hülle erhalten. An der Tegumentierung und dem sekundären *Envelopment* ist das eTIF-Protein essentiell beteiligt (von Einem *et al.*, 2006). Durch Fusion der Trans-Golgi-Vesikel mit der Zellmembran werden die Virionen schließlich aus der Zelle ausgeschleust (Mettenleiter, 2002).

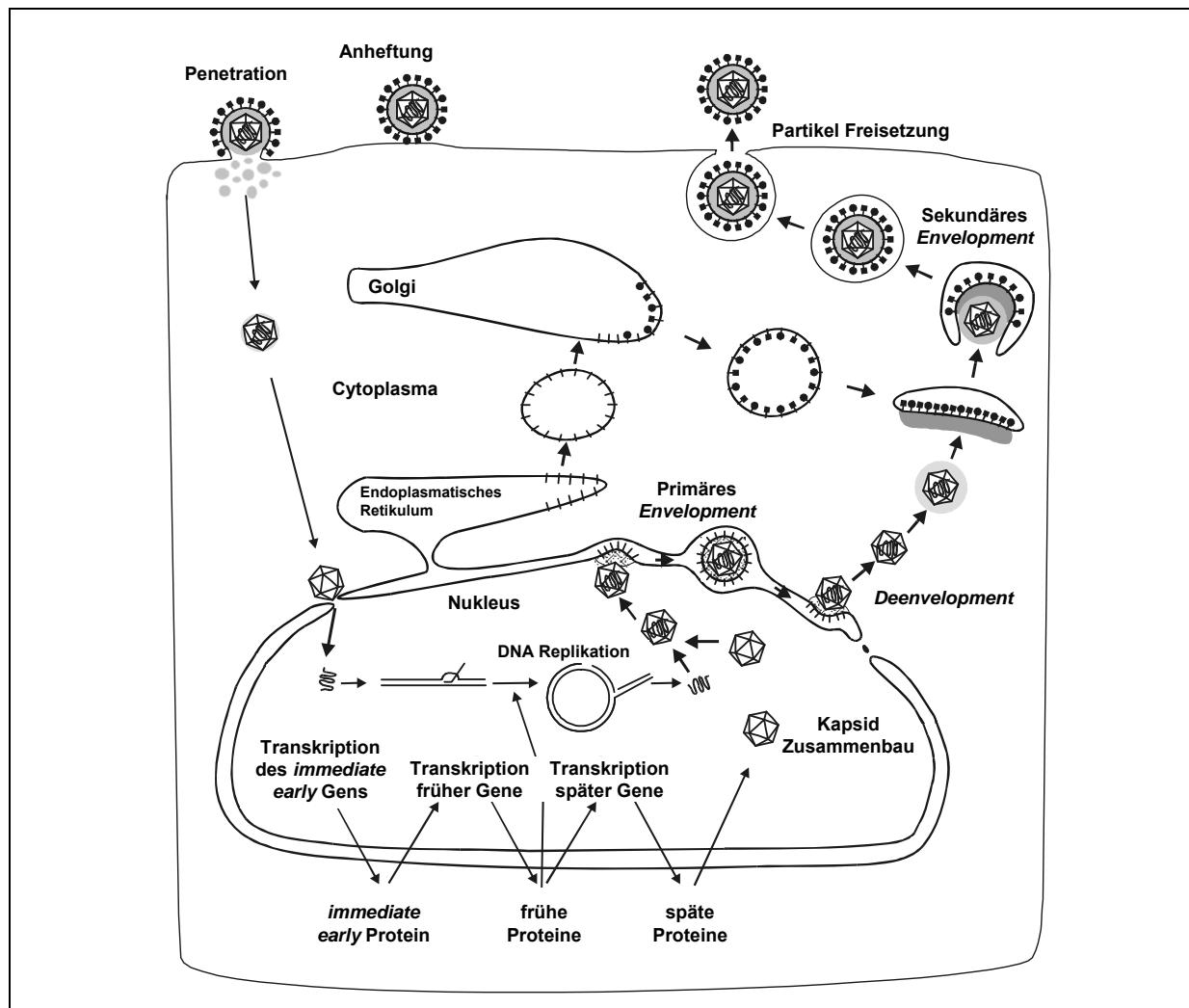


Abb. A-3: Schematische Darstellung des lytischen Replikationszyklus von EHV-1 (modifiziert nach Mettenleiter, 2002)

A.1.2.4 Virusstamm RacH

Der in dieser Arbeit verwendete Virusstamm RacH leitet sich von dem Virusisolat Rac ab, das Mitte des 20. Jahrhunderts aus einem abortierten Fohlen gewonnen wurde. Durch

serielle Passage auf embryonalen Schweinenierenzellen wurden verschiedene Virusstämme hergestellt, die sich in ihrem Attenuierungsgrad stark unterscheiden. Der Stamm RacH entstammt der 256. Passage und ist stark attenuiert (Mayr *et al.*, 1968).

Gegenüber einem anderen hochvirulenten Rac-Derivat (RacL; 12. Passage auf embryonalen Schweinenierenzellen) weist der RacH-Stamm auf DNA Ebene in den beiden *Repeat*-Bereichen IR und TR je eine identische Deletion von etwa 0,9 kb auf (Hubert *et al.*, 1996). Diese Deletionen resultieren in dem Verlust von beiden Kopien des IR6 Gens. Das IR6 Protein wurde als einer der Hauptvirulenzfaktoren von EHV-1 beschrieben (Osterrieder *et al.*, 1996) und ist an dem Behüllungsprozess der Nukleokapside an der inneren Kernmembran beteiligt (Osterrieder *et al.*, 1998).

Demzufolge weist RacH gegenüber RacL auch phänotypisch einige Veränderungen auf. RacH ist hitzesensitiv, eine Erhöhung der Temperatur von 37 °C auf 40 °C verursacht *in vitro* starke Replikationsdefekte für den Virusstamm RacH, nicht jedoch für RacL (Osterrieder *et al.*, 1996). Darüber hinaus hat RacH *in vivo* seine Virulenz und Pathogenität sowohl im Pferd als auch im Hamster-Modell verloren (Mayr *et al.*, 1968).

Das attenuierte RacH-Virus wird deshalb bis heute in Nordeuropa als Impfstoff in Pferden zum Schutz vor bzw. zur Abmilderung des Verlaufs von EHV-1 Infektionen eingesetzt (Prevaccine®®, Intervet).

A.2 BAC (Bacterial Artificial Chromosome) Technologie

A.2.1 Allgemeine Charakteristika und Herstellung

Die Genetik von Herpesviren ist sehr komplex. Im Falle von EHV-1 besteht das Genom aus mindestens 76 Genen, die für unterschiedliche regulatorische und strukturelle Proteine codieren (Telford *et al.*, 1992). Bis heute sind viele der Prozesse, die sich im Verlauf einer herpesvirellen Infektion in der Wirtszelle abspielen, noch nicht vollends aufgeklärt.

Einen wesentlichen Durchbruch in der Erforschung herpesviraler Genetik stellt die Klonierung kompletter viraler Genome als *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC) dar (Messerle *et al.*, 1997). Dabei wird in das virale Genom eine miniaturisierte Form des prokaryontischen Fertilitätsplasmids (mini F-Plasmid) eingebracht, das die stabile Erhaltung, Vermehrung und Mutagenese der viralen DNA im prokaryontischen System ermöglicht (Shizuya *et al.*, 1992). Dabei zeichnen sich die Bacmide durch ihre hohe Stabilität (Shizuya *et al.*, 1992) und ihre große Kapazität (Aufnahme von DNA bis zu einer Größe von 300 kB) (Brune *et al.*, 2000) aus.

Das mini F-Plasmid, das den integralen Bestandteil der BAC-Technologie darstellt, wurde von Shizuya *et al.* (Shizuya *et al.*, 1992) entwickelt. Zentrale Bedeutung in der mini F-Sequenz kommt dabei vier regulatorischen Genen zu, die für den stabilen Erhalt des BAC in der Zelle verantwortlich sind. Sie regulieren die Replikation der Bacmid-DNA und die Anzahl

der Bacmidkopien. Die Gene *oriS* und *repE* vermitteln die unidirektionale Replikation des Plasmids, die Gene *parA* und *parB* sorgen dafür, dass nicht mehr als zwei Plasmidkopien pro Zelle vorliegen. Darüber hinaus ist auf dem mini F-Plasmid ein Gen für eine Chloramphenicolresistenz (cam^R) codiert, die als prokaryontischer Selektionsmarker zur Selektion positiver Transformanten dient.

Durch das Einfügen der Gene für den eukaryontischen Selektionsmarker Guaninphosphoribosyl-Transferase (gpt) (Messerle *et al.*, 1997) und für das Grün-fluoreszierende Protein (gfp) (Adler *et al.*, 2000) sowie das Anfügen von loxP-Sites (Messerle *et al.*, 1997) wurde das mini F-Plasmid weiter entwickelt.

Die Herstellung viraler BACs (Adler *et al.*, 2003) erfolgt zunächst im eukaryontischen System. Dafür werden eukaryontische Zellen gleichzeitig mit Virus infiziert und mit mini F-Plasmid transfiziert. Durch homologe Rekombination zwischen Plasmid und viraler DNA kommt es daraufhin zur Insertion des F-Plasmids in das Virusgenom. Die eukaryontischen Marker, wie Gpt oder GFP, ermöglichen die Selektion auf diese seltenen Rekombinationsereignisse. Indem man die zirkularisierte, rekombinante Virus-DNA aus den

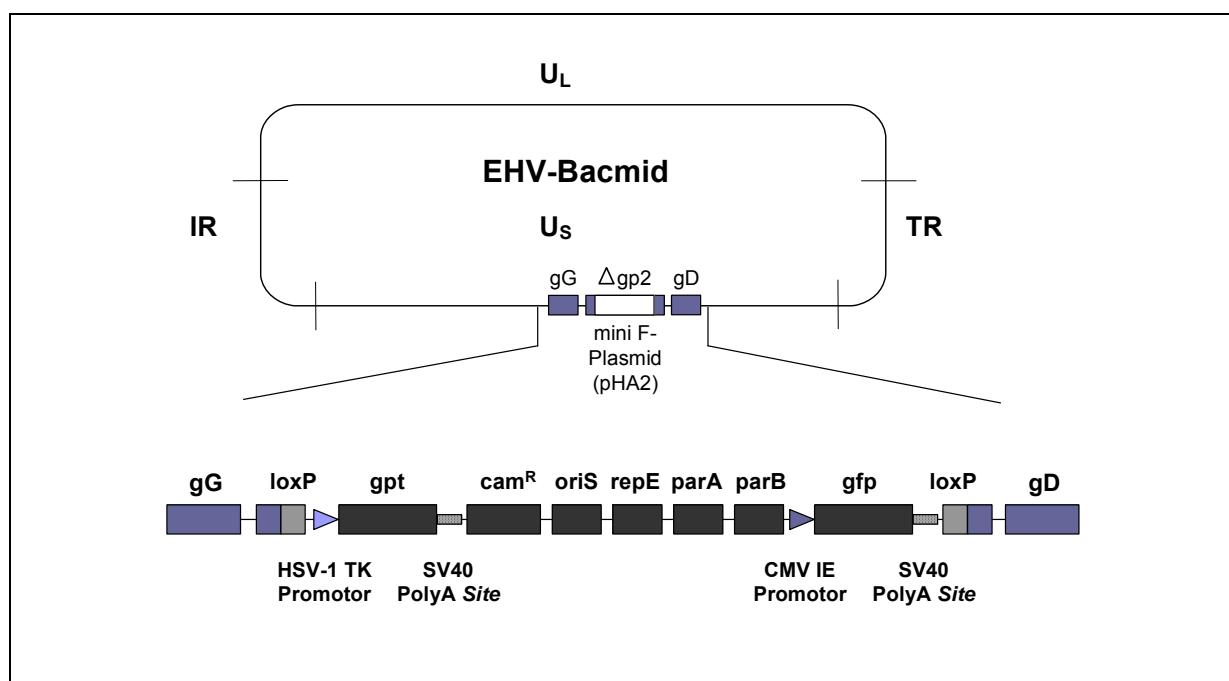


Abb. A-4: Schemadarstellung des EHV-1 Bacmids pRach

Das mini F-Plasmid pHA2 (Adler *et al.*, 2000) wurde in der *Unique Short Region* (U_S) des EHV-1 Genoms im Genlocus des nicht-essentiellen Glykoproteins 2 ($\Delta gp2$) insertiert. Das mini F-Plasmid enthält die regulatorischen Gene *oriS*, *repE*, *parA* und *parB*, die die DNA-Replikation und die Kopienzahl des Plasmids in der Zelle kontrollieren. Darüber hinaus sind in der mini F-Sequenz noch die eukaryontischen Selektionsmarker Guaninphosphoribosyl-Transferase (gpt) und grün-fluoreszierendes Protein (gfp) sowie eine Chloramphenicolresistenz (cam^R) als prokaryontischer Selektionsmarker codiert. Die Gesamtheit aus mini F-Plasmid und viraler EHV-1 Sequenz wird als EHV-BAC (pRach) bezeichnet.

U_L: Unique Long Region; TR: Terminal Repeat Region; IR: Internal Repeat Region; gG: Glykoprotein G; gD: Glykoprotein D; HSV-1: Herpes simplex Typ 1; TK: Thymidinkinase; SV40: Simian Virus 40; CMV: Cytomegalovirus; IE: Immediate Early; loxP: loxP-Site

selektierten Zellen gewinnt und in einen geeigneten Bakterienstamm transformiert, erfolgt der Übergang ins prokaryontische System, in dem das virale BAC beliebig verändert und klonal vermehrt werden kann. Da herpesvirale DNA allein in der Lage ist, eine produktive Infektion in permissiven Zellen auszulösen, kann man infektiöse Virionen durch Transfektion permissiver eukaryontischer Zellen mit aufgereinigter BAC-DNA rekonstituieren.

Basierend auf dieser Technik wurden in den letzten Jahren zahlreiche herpesvirale Genome als BAC kloniert (Adler *et al.*, 2000; Borst *et al.*, 1999; Delecluse *et al.*, 1998; Messerle *et al.*, 1997; Nagaike *et al.*, 2004; Saeki *et al.*, 1998) – darunter auch das Genom des EHV-1 Virusstamms Rach (pRach) (Rudolph *et al.*, 2002). Im Fall von pRach wurde das mini F-Plasmid pH2 (Adler *et al.*, 2000) in den Genlocus des nicht-essentiellen Glykoproteins 2 (gp2) insertiert, der sich in der U_S-Region des viralen Genoms befindet (siehe auch Abb. A-4).

A.2.2 Mutagenese von BACs

Aufgrund der erheblichen Größe herpesviraler BACs von bis zu 220 kB (Messerle *et al.*, 1997) sind klassische Klonierungstechniken (Restriktion, Ligation, Transformation) zur Mutagenese von Bacmid-Sequenzen nicht geeignet. Für die gerichtete Veränderung von Bacmid-Sequenzen werden deshalb vorwiegend Techniken verwendet, die auf homologer Rekombination basieren (*Recombineering*). Aufgrund ihrer Präzision, ihrer hohen Effizienz und den kurzen homologen Bereichen (≥ 50 bp), die für eine erfolgreiche Rekombination ausreichen, werden dabei häufig Phagen-basierte Systeme wie das RED-System aus dem λ -Phagen (Lee *et al.*, 2001) oder das von dem Rac-Prophagen abgeleitete RecET-System (Muyrers *et al.*, 1999) verwendet.

An der RED-vermittelten Rekombination sind die drei λ -Phagenproteine Exo, Bet und Gam beteiligt. Während Gam durch Bindung des prokaryontischen RecBCD Komplexes vorwiegend zur Stabilisierung doppelsträngiger, linearer DNA in der Zelle beiträgt (Murphy, 2007; Murphy, 1991), sind die Proteine Bet und Exo unmittelbar am Rekombinationsprozess beteiligt. Exo besitzt eine Exonukleaseaktivität und baut lineare, doppelsträngige DNA in 5'-3' Richtung ab, so dass einzelsträngige DNA-Überhänge entstehen (Carter und Radding, 1971; Little, 1967). An diese Überhänge bindet das Phagenprotein Bet, stabilisiert sie und vermittelt den Kontakt und die Zusammenlagerung mit homologen, einzelsträngigen Sequenzen (*Annealing*) (Karakousis *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998; Muniyappa und Radding, 1986).

Ein funktionell entsprechender Mechanismus findet sich im RecET-System, in dem die Exonuklease RecE die Aufgaben von Exo und RecT die von Bet übernimmt (Muyrers *et al.*, 2000).

Die stetige Weiterentwicklung und Verfeinerung von *Recombineering*-Techniken ermöglichen mittlerweile die rückstandsfreie Deletion beliebiger Sequenzen ebenso wie die gezielte

Insertion oder Mutation von DNA Sequenzen im Bacmid (Datsenko und Wanner, 2000; Herring *et al.*, 2003; Tischer *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 1998). Dies eröffnet nicht nur neue Möglichkeiten für die Untersuchung viraler Proteinfunktionen und für das Verständnis von Virus/ Wirt-Interaktionen, sondern erschließt darüber hinaus auch ein weites Feld für die Anwendung herpesviraler Vektoren in der Vakzineentwicklung.

Große Bedeutung in der Vakzineentwicklung weltweit kommt der Suche nach einem schützenden Impfstoff gegen das Humane Immundefizienz Virus Typ 1 (HIV-1) zu.

A.3 Stand der Vakzineentwicklung gegen das Humane Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1)

A.3.1 Allgemein

Laut aktueller Zahlen der WHO sind derzeit weltweit etwa 33,2 Millionen Menschen mit HIV infiziert. Im Laufe des Jahres 2007 erlagen 2,1 Millionen Menschen den Folgen der erworbenen Immunschwächekrankheit AIDS und 2,5 Millionen HIV-Neuinfektionen waren zu verzeichnen (UNAIDS und WHO, 2007). Trotz verbesserter antiretroviral Medikamente breitet sich die HIV-Pandemie weiter aus.

Mit ein Grund dafür ist, dass es seit der erstmaligen Beschreibung von AIDS 1981 (Center of Disease Control, 1981) und der Identifizierung des Erregers HIV-1 im Jahr 1983 (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983; Popovic *et al.*, 1984) bislang noch nicht gelungen ist, einen wirksamen Impfstoff gegen das Virus zu entwickeln.

Bewährte Ansätze der Impfstoffentwicklung waren im Fall einer HIV-Vakzine nicht erfolgreich. So induzierten attenuierte, replikationskompetente Erreger im Makakenmodell zwar einen guten Immunschutz, Langzeitbeobachtungen zeigten jedoch, dass alle immunisierten Tiere im Laufe der Zeit durch das Auftreten pathogener Nachkommenviren eine Vakzine-bedingte Immunschwäche entwickelten (Whitney und Ruprecht, 2004). Andere Strategien wie der Einsatz von inaktivierten Viren (Stott, 1994) oder rekombinantem Hüllprotein Env (Gilbert *et al.*, 2005), deren Hauptziel die Induktion breit-neutralisierender Antikörper war, schlugen aufgrund der strukturellen Eigenschaften des HI-viralen Hüllproteins fehl.

Env liegt als Homotrimer auf der Hüllmembran des Virus vor, besitzt viele hochvariable Domänen und ist zudem stark glykosiliert (24-35 Glykosilierungsstellen je Env-Monomer (Li *et al.*, 2005)). Konservierte Bereiche des Env-Proteins werden von den variablen Bereichen und den Zuckerresten thermostabil überlagert und sind so für die Erkennung durch das Immunsystem nicht zugänglich. Neutralisierende Antikörper, die gegen variable Bereiche des Proteins gebildet werden besitzen aufgrund der hohen Mutationsrate, der die Epitope unterliegen, nur begrenzte Wirksamkeit. Auf diese Weise kann das Virus einer breit-

neutralisierenden humoralen Immunantwort entgehen (Kwong *et al.*, 2002; Mascola und Montefiori, 2003).

Klassische Ansätze für die Entwicklung einer Vakzine gegen HIV scheiterten demnach bislang an Sicherheitsmängeln oder Unwirksamkeit der verwendeten Impfstoffe.

A.3.2 Korrelate einer schützenden Immunantwort gegen HIV-1

Ein Schwerpunkt bei der Suche nach einer wirksamen HIV-Vakzine liegt auf der Erforschung immunologischer und genetischer Parameter, die eine Infektion mit dem Erreger verhindern oder den Verlauf einer chronischen Infektion wirkungsvoll kontrollieren. Diese Parameter werden auch als Korrelate einer schützenden Immunantwort bezeichnet (Robinson, 2007; Letvin, 2007; Pantaleo und Koup, 2004).

Von dem Wissen um die genauen Mechanismen, die einer schützenden Immunantwort zugrunde liegen, verspricht man sich ein verbessertes, rationales Design möglicher Vakzinekandidaten.

In den Focus der Forschung rücken dabei Personengruppen, die sich trotz häufiger Exposition nicht mit HIV infizieren (z.B. Kohorten afrikanischer Prostituierter) (Fowke *et al.*, 1996) oder die den Verlauf einer chronischen HIV-Infektion dauerhaft ohne antiretrovirale Therapie so gut kontrollieren, dass ihre Viruslast im Blut über Jahre hinweg unter der diagnostischen Nachweigrenze von 50 Kopien HIV-RNA/ mL Plasma liegt (*Elite Controller*) (Hubert *et al.*, 2000; Walker, 2007).

Dabei ist es bislang noch nicht gelungen, einen einzigen dominanten Schutzmechanismus zu identifizieren, der allen untersuchten Personen gemein ist. Es gibt jedoch einige Gemeinsamkeiten, die statistisch gehäuft auftreten.

Dies zeigt sich zum Beispiel bei der Art der T-Zell-Immunantwort. Die Stärke der HIV-spezifischen T-Zell-Immunantworten in infizierten Individuen, gemessen an der Zahl Interferon γ (IFN γ) produzierender CD4 $^{+}$ - und CD8 $^{+}$ -Zellen, korreliert nicht notwendigerweise mit einer guten Kontrolle der Viruslast (Kiepiela *et al.*, 2007). Vielmehr ist die Qualität der Immunantwort entscheidend. Die T-Zell-Immunantwort ist geprägt vom Auftreten kurzlebiger, IFN γ -produzierender akuter Effektor-T-Zellen und langlebiger IFN γ - und Interleukin 2 (IL2) produzierender, proliferierender *Memory*-T-Zellen (Pantaleo und Koup, 2004; Sallusto *et al.*, 2004). Während bei HIV-Positiven mit progressiver Infektion vorwiegend kurzlebige IFN γ -produzierende akute Effektor T-Zellen auftreten, bleibt bei HIV-*Elite Controllers* die Vielschichtigkeit der T-Zell-Immunantwort in Form von akuten Effektor T-Zellen und *Memory* T-Zellen erhalten (Harari *et al.*, 2004; Champagne *et al.*, 2001).

Ein weiterer Faktor, der die Kontrolle der Viruslast positiv beeinflusst, ist die Art und die Anzahl der verschiedenen HIV-Epitope, die auf MHC-I (*Major Histocompatibility Complex I*) Molekülen infizierter Individuen präsentiert werden.

Die Art der präsentierten Epitope ist abhängig vom jeweiligen HLA (*Human Leukocyte Antigen*)-Typ des Patienten und kann durch eine Vakzine nicht beeinflusst werden. Analysen der HLA-Typen von *HIV-Elite Controllern* ergaben, dass bestimmte HLA-B Allele sich besonders günstig auf die Kontrolle der Viruslast auswirken (Geldmacher *et al.*, 2007; Honeyborne *et al.*, 2007; Kiepiela *et al.*, 2004). Somit kann auch ein günstiger genetischer Hintergrund im Patienten als positives Korrelat einer schützenden Immunantwort angesehen werden.

Positiv wirkt sich auch die Anzahl und Konservierungsgrad der präsentierten HIV-Epitope aus. Werden nur eine kleine Anzahl oder stark variable Epitope präsentiert, so kann es durch Mutationen der Epitope zu einer Immunevasion und damit zur Entstehung sogenannter *Escape*-Mutanten kommen. Je mehr konservierte Epitope präsentiert werden, um so kleiner ist damit die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von *Escape*-Mutanten und um so besser die Kontrolle der chronischen Infektion (Barouch *et al.*, 2002; Peyerl *et al.*, 2004).

Große Bedeutung bei der Verhinderung viraler Erkrankungen kommt breit neutralisierenden Antikörpern zu (Messer *et al.*, 2004; Zinkernagel und Hengartner, 2006). Durch die hohe Variabilität der Struktur und Glykosilierung des HIV-1 Oberflächenproteins Env (gp120/gp41) ist die Induktion breit neutralisierender Antikörper durch die Applikation von rekombinantem Protein oder inaktivierten Viren bisher nicht gelungen (Kwong *et al.*, 2002; Mascola und Montefiori, 2003). Trotzdem finden sich bei einigen wenigen *HIV-Elite Controllern* auch breit neutralisierende Antikörper, die eine Virämie effizient unterdrücken (Stiegler *et al.*, 2001; Muster *et al.*, 1993; Purtscher *et al.*, 1994). Diese Antikörper waren im Makakenmodell sogar dazu in der Lage, durch passive Immunisierung bestehend aus einer Kombination unterschiedlicher Breitneutralisierer eine Infektion mit einem hochinfektiösen, chimären SIV/ HIV-Stamm (SHIV) zu verhindern (Mascola *et al.*, 1999).

Auch im Menschen gibt es Hinweise auf Korrelate steriler Immunität. So finden sich in Kohorten afrikanischer Prostituierter, einer Gruppe mit hoher HIV-Expositionsrate und hohem Infektionsrisiko, einige Individuen in den untersuchten Gruppen, die sich trotz des erhöhten Ansteckungsrisikos über Jahre hinweg nicht mit HIV infizierten (Kimani *et al.*, 2008; Fowke *et al.*, 1996). Nähere Untersuchungen ergaben, dass in dieser Personengruppe gehäuft schwache HIV-spezifische zelluläre Immunantworten beruhend auf reaktiven CD8⁺-Zellen auftraten (Alimonti *et al.*, 2006). Daneben konnten aber auch HIV-spezifische IgA-Antikörper nachgewiesen werden (Kaul *et al.*, 1999; Broliden *et al.*, 2001). Diese Untersuchungsergebnisse sprechen dafür, dass die untersuchten Prostituierten im Laufe der Zeit, einen wirksamen mukosalen und zellulären Immunschutz entwickelten, der durch den häufigen und wiederholten Kontakt mit dem Erreger immer wieder aufgefrischt wurde und so eine Infektion mit HIV effizient verhinderte.

Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass die beschriebenen Korrelate nur einen Anhaltspunkt dafür geben, welche Mechanismen einer effizienten Kontrolle bzw. Prävention einer chronischen HIV-Infektion zugrunde liegen. Bezuglich der Entwicklung einer wirksamen HIV-Vakzine lassen sich jedoch einige wichtige Eckpunkte ableiten. Für einen präventiven Schutz vor HIV kommt der humoralen und mukosalen Immunantwort ein größerer Stellenwert zu als der T-Zellantwort. Qualität und Stärke der T-Zell-Immunantwort nehmen jedoch eine wichtige Rolle in der effizienten Kontrolle einer chronischen HIV-Infektion ein und entscheiden schon zum Zeitpunkt der Primärinfektion über die Schwere des Infektionsverlaufs (Rosenberg *et al.*, 2000).

Eine ideale HIV-Vakzine muss deshalb einen guten, langanhaltenden mukosalen, humoralen und zellulären Immunschutz induzieren. Dabei sollten die Antikörper-vermittelten Immunantworten idealerweise eine breit-neutralisierende Wirkung haben. Die induzierten T-Zellantworten sollten gegen eine große Anzahl konservierter HIV-Epitope gerichtet und quantitativ wie qualitativ gut sein.

A.4 Vektorsysteme und Vakzinierungsstrategien

A.4.1 Allgemein

Neben dem Design geeigneter Antigene für eine HIV-Vakzine, kommt auch der Art des Vektorsystems große Bedeutung zu. Je nach verwendetem Vektorsystem werden unterschiedliche Bereiche des Immunsystems angesprochen. Zelluläre Immunantworten setzen, mit wenigen Ausnahmen, die Expression und Prozessierung eines Antigens in der Zelle und die Präsentation relevanter Epitope auf MHC-I Molekülen voraus. Humorale Immunantworten werden in erster Linie über Präsentation von Antigen auf MHC-II Molekülen ausgelöst. Das Antigen wird dabei in der Regel aus dem extrazellulären Raum in die Zelle aufgenommen, prozessiert und präsentiert (Janeway *et al.*, 2001).

So induziert die Verabreichung von inaktivierten Erregern, rekombinanten Proteinen oder Peptiden im Empfänger in erster Linie eine humorale Immunantwort, da das Antigen nur über Phagozytose-Mechanismen in Antigen-präsentierenden Zellen (APC) aufgenommen, prozessiert und auf MHC-II Molekülen präsentiert wird. Da für eine potentiell wirksame HIV-Vakzine neben einer guten humoralen Immunantwort auch die Induktion einer zellulären Immunantwort eine wichtige Rolle spielt, ist eine Vakzine, die allein auf inaktiviertem Erreger, Protein oder Peptid basiert, wenig erfolgversprechend.

Attenuierte HI-Viren sind dagegen in der Lage, eine breite humorale, mukosale und zelluläre Immunantwort auszulösen. Aufgrund von Sicherheitsrisiken wie möglicher Pathogenität oder Reversion zu virulenten Virusstämmen sind diese attenuierten Viren als HIV-Vakzine jedoch nicht geeignet.

Eine Alternative zu attenuierten Viren bieten rekombinante virale und bakterielle Vektorsysteme oder DNA-Vektoren. Alle drei Systeme ermöglichen die intrazelluläre Antigen-Expression und induzieren sowohl zelluläre als auch humorale Immunantworten. Während bakterielle Vektorsysteme in der Praxis weniger gebräuchlich sind, werden virale Vektoren und DNA-Vektoren bereits in klinischen Studien eingesetzt, die sich mit der Austestung von HIV-Vakzinekandidaten beschäftigen (Gomez *et al.*, 2007b; Trinvuthipong, 2004; Brave *et al.*, 2007a).

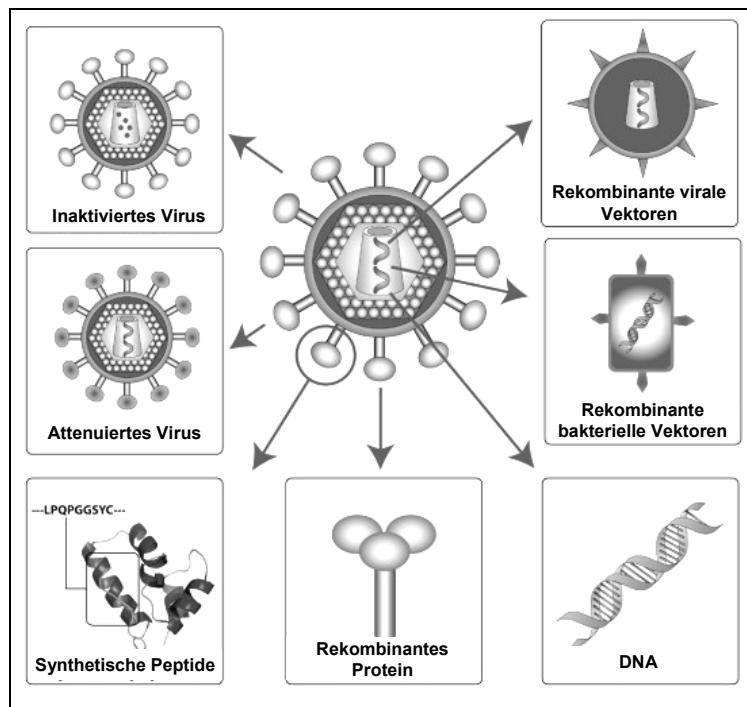


Abb A-5: Unterschiedliche Ansätze zur Induktion eines HIV-Immunschutzes (modifiziert nach Gorry *et al.*, 2007)

A.4.2 Virale Vektoren

Viren sind evolutionär darauf abgestimmt, genetisches Material in eukaryontische Zielzellen zu transportieren. Deshalb eignen sie sich besonders gut dafür, Sequenzen, die für eine bestimmte Vakzine codieren, in eukaryontische Zellen einzuschleusen und deren Expression in der Zelle zu initiieren. Da der Transduktionsprozess sehr effizient und bedingt durch den Zelltropismus der eingesetzten Viren auch sehr gerichtet abläuft, sind rekombinante Viren im Rahmen einer Vakzinierung ein ideales Werkzeug für den heterologen Gentransfer (Brave *et al.*, 2007b).

Im Laufe der letzten Jahre wurden zahlreiche virale Vektorsysteme entwickelt, die sich hinsichtlich der maximal aufnehmbaren Insertgröße, Zelltropismen, Replikationsfähigkeit, Immunevasionsstrategien und ihres immunogenen Potentials unterscheiden (siehe Tab. A-1). Im Rahmen der Entwicklung einer HIV-Vakzine kommen derzeit drei unterschiedliche Arten von viralen Vektoren in humanen klinischen Studien zum Einsatz. Dies sind der replikationsdefiziente, adenovirale Vektor Ad5, die attenuierten Säuger-

Pockenviren, MVA (*Modified Vaccinia Ankara*) und NYVAC (*New York Vaccinia*), sowie die attenuierten avianen Pockenviren, ALVAC (*Canarypox-Virus*) und FPV (*Fowl Pox-Virus*).

Sowohl der adenovirale als auch die pockenviralen Vektoren besitzen zahlreiche Eigenschaften, die sie als Vektorsystem besonders interessant machen.

So hat Ad5 die Fähigkeit, sowohl ruhende als auch sich teilende Zellen zu infizieren. Es kann in großen Mengen hochtitrig hergestellt werden und erfüllt hohe Sicherheitsansprüche, da es weder ins Wirtsgenom integrieren noch in nicht-komplementierenden Zellen replizieren kann. Transgensequenzen können bis zu einer Größe von 7-8 Kilobasen ins virale Genom integriert werden und werden nach Infektion in den transduzierten Zellen in hohen Mengen exprimiert (Robert-Guroff, 2007). Im weiteren ist Ad5 in der Lage, dendritische Zellen zu infizieren und zu aktivieren. Da dendritische Zellen als professionelle Antigen-präsentierende Zellen eine zentrale Rolle in der Stimulation humoraler und zellulärer Immunreaktionen einnehmen, wird so eine gute Immunantwort gegen die adenovirale applizierte Vakzine induziert (Banchereau und Steinman, 1998). Durch seinen Tropismus für Epithelzellen kann Ad5 darüber hinaus auch mukosale Immunantworten induzieren.

Die attenuierten avianen und Säuger-Pockenviren sind in humanen Zellen replikationsdefizient, können aber in embryonalen Hühnerfibroblasten hochtitrig vermehrt werden (Robinson, 2002). Da die Replikation von Pockenviren vollständig im Cytoplasma der Wirtszelle abläuft (Modrow *et al.*, 2002), ist auch hier die Gefahr von Integration der viralen DNA ins Wirtsgenom nicht gegeben. Darüber hinaus zeichnen sich Pockenviren durch eine hohe Verpackungskapazität aus, die die Integration von Transgensequenzen bis über 10 kB ins virale Genom ermöglicht (Robinson, 2002). Unterschiede zwischen avianen und Säuger-Pockenviren ergeben sich jedoch in der Stärke der induzierten Immunantwort (Robert-Guroff, 2007).

Nach Infektion der Wirtszelle mit den pockenviralen Vektoren NYVAC und MVA kommt es zu einer starken Expression der eingebrachten Vakzine und zur Induktion einer guten Immunantwort. Aviane Pockenviren sind weit weniger immunogen als Säuger-Pockenviren. Dies liegt zum einen begründet in der niedrigeren Expression des Transgens und zum anderen in der schlechteren proinflammatorischen Reaktion, die die avianen Viren in der infizierten Zelle auslösen.

Ein generelles Problem viraler Vektoren ist die Tatsache, dass neben der Vakzine-spezifischen Immunantwort auch eine Immunantwort gegen die viralen Proteine des Vektors induziert wird (Vektorimmunität). Dies führt zum einen bereits bei der ersten Applikation des rekombinanten Virus zu einer Abschwächung der Vakzine-spezifischen Immunantwort, da Vakzine-spezifische Epitope mit Vektor-spezifischen Epitopen um die präsentierenden MHC-Moleküle konkurrieren (Robinson, 2007). Zum Anderen schränkt die Vektorimmunität den Nutzen des viralen Vektors für homologe *Prime/ Boost*-Verfahren erheblich ein.

Viraler Vektor	Typ	Insert	Vorteile	Nachteile
Adenoviren	nicht-replizierend; dsDNA	7-8 kB	<i>Gemeinsame Eigenschaften replizierender und nicht-replizierender Adenoviren:</i> Infiziert ruhende und sich teilende Zellen Tropismus für Dendriten Keine Integration Stabil <i>Spezifisch für nicht-replizierendes Virus:</i> Sicher schon für gentherapeutische Anwendungen ausgetestet verschiedene Serotypen und chimäre Formen	Präexistierende Immunität für Ad5 häufig Hohe Menge benötigt für gute Immunantworten
Adenoviren	replizierend; dsDNA	3-4 kB	<i>Spezifisch für replizierendes Virus</i> Nur kleine Dosen nötig Transduktion von Schleimhaut-assoziierten Zellen Induziert langanhaltende Immunität Sicher bei oraler Verabreichung	Nur kleine Inserts möglich Sicherheitsbedenken für intranasale Applikation
Adeno-assoziierte Viren	nicht-replizierend; ssDNA	< 5 kB	Säurestabil verschiedene Serotypen Tropismus für Dendriten nicht-pathogen	Saubere Produktion schwierig, da auf Helfervirus angewiesen Genomische Integration möglich Preexistierende Immunität für AAV2 häufig
Alphavirus (Venezolanisches Equines Enzephalitis Virus)	nicht-replizierend; (+)-Strang ssRNA	< 8 kB	Keine Integration Löst keine Vektorimmunität aus Tropismus für Dendriten Hoch immunogen	Sicherheitsbedenken wegen möglicher Pathogenität Virusproduktion schwierig
Humane Herpesviren	nicht-replizierend; dsDNA	< 50 kB	Breiter Zelltropismus Transduktion von Schleimhaut-assoziierten Zellen Induziert langanhaltende Immunität Induziert Th1-Immunantworten	Präexistierende Immunität; Schwächere Immunogenität als andere Viren
Masernviren	replizierend; (-)-Strang ssRNA	> 5 kB	Induziert langanhaltende Immunität Tropismus für Dendriten und Makrophagen Keine Integration Stabil	Präexistierende Immunität
Pockenviren: Vaccinia	replizierend; dsDNA	> 10 kB	Hohe Immunogenität Breites Wirtszellspektrum	Sicherheitsbedenken in Immunsupprimierten
Attenuierte Pockenviren: NYVAC, MVA	nicht-replizierend; dsDNA	> 10 kB	Hohe Immunogenität Breites Wirtszellspektrum	Präexistierende Immunität in Pockengeimpften Personen
Vogel-Pockenviren: ALVAC, FPV	nicht-replizierend; dsDNA	> 10 kB	Keine präexistierende Immunität	Weniger Immunogen als Säuger-Pockenviren
Vesikuläres Stomatitis Virus	replizierend; (-)-Strang ssRNA	> 5 kB	Keine Integration Hohe Transgenexpression Keine präexistierende Immunität Mukosale Verabreichung	Sicherheit (möglicherweise neurovirulent) Attenuierte Formen weniger immunogen

Tab. A-1: Virale Vektoren für Vakzineanwendungen im Überblick (modifiziert nach Robert-Guroff, 2007)

Unter einem homologen *Prime/ Boost*- Verfahren versteht man die mehrfache Applikation des gleichen Impfstoffes innerhalb eines festgelegten Zeitraums. Die erste Applikation des Impfstoffes wird dabei als Grundimmunisierung (*Priming*), alle nachfolgenden Applikationen als Auffrischimmunisierung (*Boost*) bezeichnet.

Durch dieses Verfahren können humorale Immunantworten gegen einen spezifischen Erreger erheblich gesteigert werden. Bei zellulären Immunantworten dagegen kann es durch das Auftreten von Vektorimmunität zur Beeinträchtigung einer erneuten Antigenpräsentation und der Unterdrückung weiterer Vektor-induzierter, adjuvierender Entzündungsreaktionen kommen (Woodland, 2004).

Das Problem der Vektorimmunität lässt sich durch die Verwendung von DNA-Vektoren umgehen.

A.4.3 DNA-Vektoren

Bei DNA-Vektoren handelt es sich um eukaryontische Expressionsplasmide. Durch das Einbringen einer Expressionskassette, die für eine spezifische Vakzine codiert, entsteht eine DNA-Vakzine.

Es konnte gezeigt werden, dass solche „nackte“ Plasmid-DNA *in vivo* nach intramuskulärer Applikation in Muskelzellen aufgenommen und das eingebrachte Vakzine-Protein exprimiert wird (Wolff *et al.*, 1990). Die intrazelluläre Herstellung und die anschließende Prozessierung des Proteins bewirkt im weiteren im Mausmodell die Induktion Vakzine-spezifischer humoraler (Tang *et al.*, 1992) und zellulärer (Ulmer *et al.*, 1993) Immunantworten. Dadurch dass in den transfizierten Zellen nur das Vakzine-Protein exprimiert wird, ist diese Immunantwort auch nur gegen die Vakzine und nicht gegen das Vektorsystem gerichtet, so dass im Gegensatz zu viralen Vektorsystemen für DNA-Vektoren keine Vektorimmunität auftritt.

Darüber hinaus lassen sich Impfstoffe, die auf DNA-Vektoren basieren, einfach herstellen und haben sich in zahlreichen klinischen Studien als besonders sicher erwiesen. Es kam weder zur Integration der vektoriellen DNA in das zelluläre Genom, noch traten DNA-spezifische Antikörper auf, wie sie in einigen Autoimmunerkrankungen beobachtet werden (Brave *et al.*, 2007b).

Durch Etablierung von Verfahren zur Herstellung synthetischer Gene konnte die Wirksamkeit von DNA-Vakzinen weiter gesteigert werden. Die gezielte Anpassung von Genen an den Codongebrauch und G/C-Gehalt des Wirtsorganismus sowie die Stabilisierung der mRNA durch Vermeidung negativ wirkender *cis*-aktiver Elemente oder inhibitorischer A/U-reicher, Sequenzen unter Beibehalt der ursprünglichen Aminosäuresequenz des Proteins (Graf *et al.*, 2004), ermöglicht eine starke Expressionssteigerung der therapeutischen Gene.

Besonders deutlich zeigt sich dies am Beispiel der Expression später HIV-1 Gene. Experimentell ließ sich zeigen, dass die Expression dieser Gene eng an das regulatorische HIV-Protein Rev gekoppelt ist (Pollard und Malim, 1998). A/U-reiche Sequenzen in ungespleißten oder einfach gespleißten HI-viralen mRNAs bewirken die Retention der RNA im Zellkern und ihre rasche Degradation oder weitere Prozessierung durch nachgelagerte Spleißvorgänge (Chen und Shyu, 1995). Durch Bindung des Rev-Proteins an spezifische *Rev Responsive Element* (RRE) in den HI-viralen mRNAs kommt es zum aktiven Transport der mRNA aus dem Zellkern und zur Expression der viralen Proteine.

Diese Art der Regulation findet sich auch bei dem spät im Infektionszyklus gebildeten HIV gruppenspezifischen Antigen (Gag). Durch Optimierung des Gag-Gens (wtgag) konnte ein DNA-Konstrukt (syngag) hergestellt werden, das eine starke, konstitutive sowie REV-unabhängige Expression von Gag ermöglicht (Graf *et al.*, 2000). Die stärkere Expression des Gag-Proteins wirkt sich im Mausmodell auch unmittelbar auf die Stärke der induzierten zellulären und humoralen Immunantworten aus. Während nach intramuskulärer Applikation des wtgag-Konstrukts nur eine schwache Gag-spezifische Immunantwort induziert wird, ergibt sich mit dem syngag-Konstrukt eine deutlich stärkere Immunantwort (Deml *et al.*, 2001).

Den guten Immunisierungsergebnissen mit DNA-Vakzinen in Mäusen steht in Primaten, trotz hoher Immunisierungsdosen (im mg-Bereich), lediglich eine moderate Induktion zellulärer und humoraler Immunantworten gegenüber (Letvin, 2006; Mwau *et al.*, 2004; Robinson, 2002). Als Hauptgrund dafür gilt die schlechte Aufnahme der intramuskulär applizierten DNA-Vakzine durch die Muskelzellen. Immunisierungsstrategien, die die Aufnahme der DNA mit Hilfe von Elektroporation verbessern sollen, wurden bereits mit guten Ergebnissen im Affenmodell getestet (Luckay *et al.*, 2007) und werden nun auch in ersten klinischen Studien auf Sicherheit und Effizienz hin untersucht (Luxembourg *et al.*, 2007).

Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der durch DNA-Vakzine induzierten Immunantworten ist der Einsatz heterologer *Prime/ Boost*-Immunisierungen.

A.4.4 Heterologe *Prime/ Boost* Immunisierungen

Unter heterologen *Prime/ Boost*-Immunisierungen versteht man die mehrfache Verabreichung des gleichen Antigens innerhalb eines festgelegten Zeitraums unter Verwendung unterschiedlicher Vektorsysteme oder unterschiedlicher Darreichungsformen (Ramshaw und Ramsay, 2000).

Durch diese Art von Immunisierungsstrategie wird eine auf die Vakzine fokussierte Immunantwort induziert und gleichzeitig können die immunstimulatorischen und adjuvierenden Eigenschaften der für *Prime* und *Boost* verwendeten Vektorsysteme zu voller Wirkung kommen. Dabei hat sich in der Praxis gezeigt, dass bei geeigneten *Prime/ Boost*-

Strategien der Einfluss der unterschiedlichen Vektorsysteme auf die Stärke der induzierten Immunantwort nicht nur additiv ist, sondern dass die unterschiedlichen Systeme häufig synergistische Effekte hervorrufen (Woodland, 2004). So konnte z.B. durch heterologen *Prime/ Boost* mit einem DNA-Vektor und einem rekombinanten viralen MVA-Vektor, die beide für die gleiche SHIV-Vakzine codierten, in Rhesus-Makaken eine so starke und breite Immunantwort induziert werden, dass die große Mehrheit der Tiere bei einem rektalen *Challenge* mit einem SHIV-Stamm auch sieben Monate nach der letzten Immunisierung vor einer Infektion geschützt war (Amara *et al.*, 2002).

Gute Immunisierungsergebnisse für heterologe *Prime/ Boost*-Strategien ergeben sich auch im Menschen. In einer aktuellen klinischen Studie (Harari *et al.*, 2008) führte Giuseppe Pantaleo in Zusammenarbeit mit unserer Arbeitsgruppe Immunisierungen an vierzig freiwilligen Probanden durch, um Sicherheit und Immunogenität von HIV-1 Vakzinekandidaten zu bestimmen, die für ein in unserer Arbeitsgruppe entwickeltes und hergestelltes synthetisches HIV-1 Polyprotein (GagPolNef) sowie das Hüllprotein gp120 codieren. Als Vektoren wurden für die Vakzine codierende DNA-Konstrukte, die in unserer Arbeitsgruppe synthetisiert worden waren, bzw. entsprechende rekombinante NYVAC-Konstrukte eingesetzt. Die Studie ergab, dass mittels einer heterologen *Prime/ Boost*-Immunisierung (DNA/ NYVAC) bessere HIV-spezifische T-Zell-Immunantworten induziert werden als mit einer homologen *Prime/ Boost*-Strategie (NYVAC). 90 % der Probanden, die mit einem heterologen *Prime/ Boost* behandelt worden waren, entwickelten spezifische T-Zell-Immunantworten. In der Probanden-Gruppe, die einen homologen *Prime/ Boost* erhalten hatten, waren es dagegen nur 30 %. Eine genauere Untersuchung der Qualität der durch heterologen *Prime/ Boost* induzierten Immunantworten ergab, dass sich neben spezifischen kurzlebigen Effektor T-Zellen auch spezifische langlebige *Memory*-T-Zellen gegen eine breite Anzahl von HIV-Epitopen gebildet hatten, die auch noch 72 Wochen nach der letzten Immunisierung nachweisbar waren.

Trotz dieser vielversprechenden Daten müssen die derzeit in der Klinik verwendeten Vektorsysteme noch einige Hürden überwinden, bevor eine ähnlich gute Immunstimulation in der breiten Mehrheit der Bevölkerung erreicht werden kann.

A.4.5 Limitationen und Hemmnisse aktuell verwendeter viraler Vektorsysteme

Ein Hauptproblem der bislang verwendeten viralen Vektorsysteme ist, dass ein hoher Bevölkerungsanteil präexistierende Immunantworten gegen die verwendeten Vektoren aufweist. Dies bedeutet, dass in Individuen, die bereits zu einem früheren Zeitpunkt mit dem Virus in Kontakt gekommen sind, unter Umständen eine schlechtere Immunantwort gegen die viral eingebrachte Vakzine induziert wird als in Individuen ohne präexistierende Immunantwort.

Zieht man in Betracht, dass in Ostafrika 95 % der Gesamtbevölkerung neutralisierende Antikörper gegen Adenovirus Typ 5 besitzt und in den USA immerhin 50 % der Bevölkerung bereits vollen oder zumindest partiellen Immunschutz gegen gegen das Virus aufweisen (Steinbrook, 2007), wird der Nutzen von Ad5 als universell einsetzbares Vektorsystem in Frage gestellt.

Tatsächlich wurde im September 2007 die klinische HIV-Studie STEP wegen Unwirksamkeit der verwendeten Vakzine gestoppt (News in Brief, 2007). Ziel dieser Studie war die Austestung der Wirksamkeit einer HIV-Vakzine basierend auf den drei HIV-viralen Proteinen Gag, Pol und Nef, die jeweils auf einem replikations-defizienten Adenovirus Typ 5 codiert waren (Steinbrook, 2007). Im Studienverlauf zeigte sich, dass die Vakzine weder vor einer HIV-Infektion schützt noch den chronischen Verlauf der Erkrankung positiv beeinflusst. Nachfolgende Untersuchungen weisen sogar darauf hin, dass männliche Probanden mit präexistierender Immunität gegen Ad5 durch die Verabreichung der Vakzine ein erhöhtes Risiko für eine HIV-Infektion hatten (Ledford, 2007). So infizierten sich in der Placebo-Gruppe männlicher Probanden mit einer präexistierenden Immunantwort gegen Ad5 dreizehn Studienteilnehmer mit HIV, in der entsprechenden Vakzine-Gruppe waren es neunundzwanzig (<http://www.hvtn.org/media/pr/step1207.html>).

Die Frage, ob präexistierende Immunantworten die HIV-Suszeptibilität nach Vakzinierung wirklich erhöhen können, ist noch nicht vollends geklärt. Fest steht jedoch, dass sie sich nicht vorteilhaft auf die Ausbildung eines Vakzine-spezifischen Immunschutzes auswirken und dass sie für viele virale Vektorsysteme vorhanden sind.

So existiert beispielsweise durch flächendeckende Impfungen gegen die Pocken bis in die 70er Jahre des 20. Jahrhunderts in großen Bevölkerungssteilen immer noch ein Immunschutz gegen die attenuierten Säuger-Pockenviren MVA und NYVAC (Robinson, 2002).

Aber auch klinisch weniger weit fortgeschrittene virale Vektorsysteme wie Masernviren, humane Herpesviren oder Adeno-assozierte Viren, sind durch präexistierende Immunantworten in ihrer Wirksamkeit eingeschränkt. So steht zwar die weltweite Eradizierung der Masern dank umfangreicher Impfungen der WHO unmittelbar bevor (de Quadros, 2006), doch werden durch die Impfungen auch in breiten Teilen der Bevölkerung präexistierende Immunantworten gegen mögliche Masern-Vektoren induziert. Gegen humane herpesvirale Vektoren und Adeno-assozierte Vektoren wird präexistierende Immunität durch die naturgemäß hohe Durchseuchung der Bevölkerung mit den jeweiligen Wildtyp-Viren hervorgerufen.

Eine Möglichkeit präexistierende Immunität zu umgehen, stellt die Verwendung von tierpathogenen Viren wie zum Beispiel avianen Pockenviren dar. Die durch die avianen Vektoren ALVAC und FPV induzierten Immunantworten sind jedoch sehr gering (Cao *et al.*, 2003) und es bleibt abzuwarten, ob die Qualität und Stärke der Vakzine-spezifischen

Immunantworten wirklich für einen Immunschutz ausreichen. Andere Vektoren, die auf tierpathogenen Viren basieren, wie zum Beispiel das Venezolanische Equine Enzephalitis Virus, sind zwar hochimmunogen, bergen dafür aber das Risiko von Pathogenität im Menschen (Robert-Guroff, 2007).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass genauso wie beim Antigen-Design für eine schützende HIV-Vakzine auch bei den verwendeten Vektorsystemen noch Forschungsbedarf besteht. Dies kann zum einen durch die Weiterentwicklung bestehender Systeme geschehen zum anderen aber auch durch die Etablierung neuer viraler Vektorsysteme.

A.4.6 EHV-1 als virales Vektorsystem

Das Equine Herpesvirus Typ 1 (EHV-1) ist aufgrund vieler Eigenschaften ein vielversprechender Kandidat als neues virales Vektorsystems.

So infiziert EHV-1 im Pferd vorwiegend PBMC und Schleimhaut-Epithelzellen (Allen *et al.*, 2004). Eine Teilpopulation der PBMC sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen (Monozyten, B-Zellen, dendritische Zellen), die als Zielzellen bei Vakzinierungen besonders interessant sind. Der Grund dafür ist, dass professionelle Antigen-präsentierende Zellen als einzige Zellpopulation in der Lage sind, durch Präsentation von spezifischem Antigen und Expression von kostimulatorischen Signalen CD4⁺ und CD8⁺ Zellen unmittelbar zu stimulieren und damit besonders gute humorale und zelluläre Immunantworten zu induzieren (Janeway *et al.*, 2001). Die Infektion von Schleimhaut-Epithelzellen vermittelt darüber hinaus die Induktion mukosaler Immunantworten.

EHV-1 Infektionen bei Pferden haben normalerweise einen milden Verlauf. Sie verursachen häufig respiratorische Erkrankungen, können aber auch bei trächtigen Stuten zu Aborten führen (O'Callaghan und Osterrieder, 1999). Impfstoffe in Form von attenuierten Viren, die bislang in Pferden zum Schutz vor EHV-1 eingesetzt werden, induzieren jedoch nur einen kurzfristigen Immunschutz (3-6 Monate) in den vakzinierten Tieren (Kydd *et al.*, 2006).

Überträgt man die Eigenschaften von EHV-1 auf den Einsatz als ein mögliches virales Vektorsystem im Menschen, so könnte das Virus aufgrund seines Tropismus in der Lage sein, gute mukosale und systemische Immunantworten zu induzieren und darüber hinaus nur kurzfristige Vektorimmunität auszulösen. Da EHV-1 für den Menschen apathogen ist, wären auch grundlegende Sicherheitsanforderungen an ein potentielles Vektorsystem erfüllt.

In eigenen Vorarbeiten und in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Nikolaus Osterrieder konnte gezeigt werden, dass EHV-1 neben einer großen Bandbreite an humanen Zellen *in vitro* auch primäre humane PBMC effizient infizieren kann (Trapp *et al.*, 2005). Die Replikation von EHV-1 ist dabei aber in humanen Zellen stark eingeschränkt.

Da EHV-1 ein Tierpathogen ist, ist darüber hinaus präexistierende Immunität gegen das Virus im Menschen unwahrscheinlich. Im weiteren konnte sogar gezeigt werden, dass

neutralisierende Antikörper gegen humane Herpesviren keine Kreuzreakтивität zu EHV-1 aufweisen (Trapp *et al.*, 2005).

Die Klonierung des EHV-1-Genoms als BAC (Rudolph *et al.*, 2002), sowie die Entwicklung der *En Passant*-Methode (Tischer *et al.*, 2006), einer *Recombineering*-Technik zur schnellen und einfachen Generierung rekombinanter Bacmide, liefern schließlich die Grundlage für die Herstellung rekombinanter Viren.

Zusammenfassend lässt sich demnach festhalten, dass EHV-1 aufgrund der oben beschriebenen Eigenschaften großes Potential für den Einsatz als neues virales Vektorsystem besitzt.

A.5 Zielsetzung

Viren gelten im Kontext von vakzinologischen Ansätzen als ideale Vehikel für den heterologen Gentransfer in eukaryontische Zellen. Die Anwendungsmöglichkeiten bislang verwendeter viraler Vektorsysteme sind jedoch durch Faktoren wie präexistierende Immunität, Pathogenität oder geringes immunogenes Potential limitiert.

Ziel dieser Arbeit war deshalb die Etablierung eines neuen viralen Vektorsystems basierend auf dem Equinen Herpesvirus Typ 1 (EHV), welches aufgrund seines immunologischen Profils, guter Transduktionseffizienzen bei gleichzeitig niedrigem Pathogenitätsrisiko im Menschen sowie der Verfügbarkeit innovativer Techniken zur Generierung rekombinanter Viren einen erfolgsversprechenden Kandidaten darstellt. Dazu sollten rekombinante Viren unter Verwendung von BAC-Technologie und homologer Rekombination generiert werden, die unter anderem das grün-fluoreszierende Protein (GFP) bzw. das HI-virale gruppenspezifische Antigen (Gag) als Reportergen codieren.

Neben der Untersuchung von Transgenexpression und Replikationsverhalten in infizierten Zellen sollte das Potential zur Induktion Transgen-spezifischer Immunantworten im Mausmodell untersucht werden. Ein Schwerpunkt lag dabei auf der Evaluierung des Einflusses von Immunisierungsdosis, Applikationswegen und unterschiedlichen *Prime/ Boost*-Strategien. Darüber hinaus wurde besonderes die Fragestellung untersucht, ob EHV auch Transgen-spezifische mukosale Immunantworten induzieren kann, die insbesondere im Kontext eines HIV-Impfstoffes von großer Bedeutung sind. Zur Erhöhung der Vektorsicherheit hinsichtlich eines möglichen Einsatzes im Menschen sollte ferner eine replikationsdefiziente EHV-Mutante hergestellt und bezüglich ihres immunogenen Potentials vergleichend untersucht werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen mittelfristig die Palette der aktuell verfügbaren Vektoren insbesondere im Hinblick auf die Vakzine-vermittelte Induktion protektiver, HIV-spezifischer Immunantworten sinnvoll ergänzen.

B. Material und Methoden

B.1 Material

B.1.1 Zellen

B.1.1.1 Prokaryontische Zellen

Zur Klonierung rekombinanter DNA und zur Amplifikation von Plasmiden wurden die Bakterienstämme DH5 α und DH10B verwendet. Zur Herstellung rekombinanter Bacmide kam der Bakterienstamm EL250 zum Einsatz.

Bezeichnung	Genotyp
DH5 α	$F^- supE44 \Delta lacU169 (\phi 80 lacZ\Delta M15) hsdR1 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1$ (Hanahan, 1983)
DH10B	$F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi 80d/lacZ\Delta M15 \Delta/lacX74 deoR recA1 araD139 \Delta(ara,leu)7649 galU galK rspL nupG$ (Gibco BRL)
EL250	$F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi 80d/lacZ\Delta M15 \Delta/lacX74 deoR recA1 araD139 \Delta(ara,leu)7649 galU galK rspL nupG [\lambda cl857 (cro-bioA)<> araC-PBADfpe]$ (Lee et al., 2001)
EL250 pRacHrv pBAD-I-SceI	wie EL250 zusätzlich episomal enthalten EHV-Bacmid Sequenz pRacHrv (siehe Kapitel B.1.2) und pBAD-I-SceI Plasmid (siehe Tab. B-4). EL250 pRacHrv pBAD-I-SceI sind Chloramphenicol (34 μ g/mL)- und Ampicillin (100 μ g/mL)-resistent. Bakterienstamm freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Bernd Karsten Tischer, Cornell University, Ithaca, NY, USA)

Tab. B-1: Übersicht der verwendeten prokaryontischen Zellen

B.1.1.2 Eukaryontische Zellen

Bezeichnung	Kurzbeschreibung
A549	Humane Lungenepithezelzelllinie aus einem Lungenkarzinom (Giard et al., 1973)
RK13	Kaninchen-Nieren-Epithelzelllinie (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Zellbank für Zelllinien in der Veterinärmedizin, Friedrich-Löffler Institut, Insel Riems)
RK13-48/ RK-ETIF	Von RK13-Zellen abgeleitete Zelllinie; konstitutive Expression des EHV-Gens UL48 (von Einem et al., 2006)

Tab. B-2: Übersicht der verwendeten eukaryontischen Zellen

B.1.2 Virus und Bacmid

Die Experimente in der vorliegenden Arbeit basieren auf EHV-1 Stamm RacH. Bei diesem Stamm handelt es sich um ein hoch-attenuiertes Virus (256. Passage auf embryonalen Schweinenierenzellen) (Mayr *et al.*, 1968), das in Nordeuropa als Lebendvakzine gegen EHV-1 in Pferden eingesetzt wird (Prevaccinol®, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim).

Durch Ersetzen des nicht-essentiellen Glykoproteins 2 (Gen 11) durch das mini F-Plasmid pH2 wurde der Virusstamm als Bacmid kloniert (pRacH) (Rudolph und Osterrieder, 2002). In dem in dieser Arbeit verwendeten Bacmid wurde die Plasmidsequenz von pH2 aus pRacH invertiert, wodurch das Bacmid pRacHrv entstand (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Nikolaus Osterrieder, Cornell University). Im weiteren wird pRacHrv als EHV-BAC bezeichnet.

B.1.3 DNA

B.1.3.1 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Verwendung
Primer zur Überprüfung von Transformanten aus der 1. und 2. RED Rekombination		
pRacHrv pEP rev	CGCAGCTTGTATATCGAATT	Bacmid-spezifischer Primer
IIIB syngag 1456fw	CAGAACGAGGAGGCCATC	IIIBsyngag- Transgen-spezifischer Primer
GFPint_142pf	CCCTGAAGTTCATCTGCACC	gfp- Transgen-spezifischer Primer
pRacHrv delta48 fw	CTGGACCCAACGGTTACGAT	Überprüfung der UL48 Deletion im EHV-BAC (PCR, Sequenzierung)
pRacHrv delta48 rev	GGCCAACATGTTAAGTCTGGAA	Überprüfung der UL48 Deletion im EHV-BAC (PCR, Sequenzierung)

Primer für DIG-markierte Sonden

UL48 Sonde fw	GCACAGCGCTTTACCTATCAG	Herstellung einer DIG-markierten UL48 Sonde
UL48 Sonde rev	CGGTCGTTGTACCGTATGACAG	Herstellung einer DIG-markierten UL48 Sonde
syngag_DIG_sonde_pf_260603	CCAGATCTGCCAGGAAG	Herstellung einer DIG-markierten IIIB-syngag Sonde
syngag_DIG_sonde_pb_260603	GACATGCCGGCAC	Herstellung einer DIG-markierten IIIB-syngag Sonde

fortgesetzt nächste Seite

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Verwendung
IIIB wtgag 976-996 fw	GCGAACCCAGATTGTAAGAC	Herstellung einer DIG-markierten IIIB-wtgag Sonde
IIIB wtgag 1556rev	CTCTAAGAGCCGAGCAAGCTTCAC	Herstellung einer DIG-markierten IIIB-wtgag Sonde
Cgpn 2810fw	GAGCAGCATCGTGGGCTGGC	Herstellung einer DIG-markierten C-gpn Sonde
Cgpn 3820rev	TTGCCGATCTTGGTCTC	Herstellung einer DIG-markierten C-gpn Sonde
IIIBsgpn 2942fw	CCTGAAGACCGGCAAGTAC	Herstellung einer DIG-markierten IIIB-gpn Sonde
IIIBsgpn 3549rev	GCTTGTCCACCTGCTCG	Herstellung einer DIG-markierten IIIB-gpn Sonde
gp120 481fw	ACCGTGGTGAGGGACAGGAAGC	Herstellung einer DIG-markierten gp120 Sonde
gp120 1114rev	CTGCTGGCGAACATTGATG	Herstellung einer DIG-markierten gp120 Sonde

Primer zum Einbringen von Deletionen ins EHV-Bacmid

Ep_D48_for	GCTGGTATTTGACGGCGCCCGGC AGCTTCAATAGTTAATACAATAAGT ATGTTAGGGATAACAGGGTAATCGAT TT	Deletion des UL48 ORF aus dem EHV-BAC
Ep_D48_rev	CCAACATGTTAAGTCTGGAAACATAC TTTATTGTATTAAACTATTGAAGCTGC CGGGGCCAGTGTACAAACCAATTAAAC C	Deletion des UL48 ORF aus dem EHV-BAC

Fett: pLAY2 spezifische Sequenz/ Kursiv: interne homologe Region/ Normal: Bereiche, homolog zur Bacmidsequenz

Primer zur Überprüfung der Stabilität viraler EHV-Konstrukte

pRacH_gpt_fw	GCAAGATACCTGGATTGAAC	PCR
IIIB syngag 1456fw	CAGAACAGGAGGCCATC	PCR
Racd71_pf_260503	GTTACTACAGCCGCGTCTAC	PCR

Primer zur Verifizierung/ Sequenzierung

pEP fw	TTCCCAGTCACGACGTTG	Sequenzierung
pEP rev	CAGGAAACAGCTATGACCATG	Sequenzierung
GFPint_516pb	GATCTTGAAGTTCACCTTGATG	Sequenzierung
Sp6	GATTTAGGTGACACTATAGAATAC	Sequenzierung
BGH	AAGGCACAGTCGAGG	Sequenzierung

Tab. B-3: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

B.1.3.2 Vektoren

Bezeichnung	Quelle
pcDNA3.1(+)	Eukaryontisches Expressionsplasmid (Invitrogen, Karlsruhe)
pEP	<i>enPassant</i> Plasmid zur Herstellung von Transferkonstrukten für die Generierung rekombinanter Bacmide (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Bernd Karsten Tischer, Cornell University, Ithaca, NY, USA)
pBAD-I-SceI	Plasmid zur Arabinose-induzierbaren Expression von I-SceI (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Bernd Karsten Tischer, Cornell University, Ithaca, NY, USA)
pLAY2	PCR Template zur Herstellung von Transferkonstrukten für die Generierung rekombinanter Bacmide (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Bernd Karsten Tischer, Cornell University, Ithaca, NY, USA)

Tab. B-4: Übersicht der verwendeten Plasmide**B.1.4 Antikörper und Peptide****B.1.4.1 Primärantikörper**

Bezeichnung	Quelle	Beschreibung
13/5	(Wolf <i>et al.</i> , 1990)	Maus, monoklonal, Erkennung von HIV-1 Kapsidprotein (p24/55 _{IIIB} , aa 147-154) (Verdünnung Western Blot: 1:2000)
Anti-HIV-1 p24 PE-gekoppelt (KC57-RD1)	Beckman Coulter, Krefeld	Maus, monoklonal, Erkennung von HIV-1 Kapsidprotein (p24/55 C/ B) (Verdünnung FACS 1:100)
CB-4/1	Charite Berlin / Prof. Dr. Wolfgang Höhne	Maus, monoklonal, Erkennung HIV-1 C Clade Kapsidprotein (p24) (Verdünnung Western Blot 1:2000)
HIV-1 gp120 MRC #42(CHO)(ARP4 22)		Kaninchen, polyklonal, Erkennung HIV-1 C-Clade Envelope (gp120) (Verdünnung Western Blot 1: 500)
Anti-Maus CD16/32	BD Pharmingen, Heidelberg	Ratte, monoklonal, Erkennung von Maus Fc-Rezeptoren (CD16/ CD32) (Verdünnung FACS 1:200)
Anti-Maus CD8a APC-gekoppelt (Ly-2)	BD Pharmingen, Heidelberg	Ratte, monoklonal, Erkennung von Maus CD8 Oberflächenrezeptoren (Verdünnung FACS 1:200)
Anti-Maus CD4 FITC-gekoppelt	BD Pharmingen, Heidelberg	Ratte, monoklonal, Erkennung von Maus CD4 Oberflächenrezeptoren (Verdünnung FACS 1:200)
Anti-Maus IFN γ PE-gekoppelt	BD Pharmingen, Heidelberg	Ratte, monoklonal, Erkennung von Maus IFN γ (Verdünnung FACS 1:200)

fortgesetzt nächste Seite

Bezeichnung	Quelle	Beschreibung
Anti-Maus IFN γ Biotin-gekoppelt XMG1.2	BD Pharmingen, Heidelberg	Ratte, monoklonal, Erkennung von Maus IFN γ (Verdünnung Elispot 1:500)
Anti-Maus IFN γ R4-6A2	BD Pharmingen, Heidelberg	Ratte, monoklonal, Erkennung von Maus IFN γ (Verdünnung Elispot 1:500)
Anti-Digoxigenin AP-gekoppelt	Roche, Mannheim	Schaf, Fab-Fragmente, Erkennung von Digoxigenin (DIG) (Verdünnung Southern Blot: 1:10000)
Anti-GFP	Takara/Clonetech, Saint-Germain-en-Laye/ Frankreich	Kaninchen, polyklonal, Erkennung von GFP (Verdünnung Western Blot: 1:500)
Anti- β -Actin (AC-15)	Sigma, Deisenhofen	Maus, monoklonal, Erkennung von β -Aktin (Verdünnung Western Blot: 1:5000)

Tab. B-5: Übersicht der verwendeten Primärantikörper

B.1.4.2 Sekundärantikörper

Bezeichnung	Quelle	Beschreibung
Anti-Maus-AP	Bio-Rad, München	Erkennung von Maus IgG, chromogene AP-Färbung (Verdünnung Western Blot: 1:2000)
anti-Maus Ig HRP-gekoppelt	Dako, Hamburg	Kaninchen, polyklonal, (Verdünnung ELISA 1:2000)
Anti-Maus IgG1 HRP-gekoppelt	Dako, Hamburg	Kaninchen, polyklonal, (Verdünnung ELISA 1:2000)
Anti-Maus IgG2a HRP-gekoppelt	Dako, Hamburg	Kaninchen, polyklonal, (Verdünnung ELISA 1:2000)
Anti-Maus IgA Biotin-gekoppelt (C10-1)	BD Pharmingen, Heidelberg	Ratte, monoklonal, spezifische Erkennung von Maus-IgA (Verdünnung ELISA: 1:1000)
Anti-Kaninchen-AP	DAKO, Hamburg	Erkennung von Kaninchen IgG, chromogene AP-Färbung (Verdünnung Western Blot: 1:2000)

Tab. B-6: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper

B.1.4.3 Peptide

Die HIV-1 spezifischen, murinen MHC Klasse-I restringierten Peptide (vgl. Tab. B-7) wurden für das Auslesen der zellulären Immunantworten in BALB/c Mausstudien verwendet. Die

lyophilisierten Peptide wurden in HPLC-*grade* DMSO gelöst (10 mM) und bei -20 °C gelagert.

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
A9I	AMQMLKETI	Biosyntan, Berlin
V3	SERIQRGPGRAFVTIGKI	Biosyntan, Berlin

Tab.B-7: Überblick der verwendeten Peptide

B.1.5 Größen- und Molekulargewichtsstandards

Zur Bestimmung der Größe von DNA-Molekülen mittels Gelelektrophorese wurde der 100 bp DNA Marker (NEB, Frankfurt), der 1 kB DNA Marker (NEB, Frankfurt) oder der DIG-markierte DNA-Standard II (Roche, Mannheim) verwendet.

Zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen mittels SDS-PAGE wurde der *Precision Prestained* Protein Standard (BioRad, München) verwendet.

B.1.6 Kommerzielle Kits

Produkt	Firma
<i>QIAamp DNA Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Endotoxin-free DNA preparations-Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIAGEN Plasmid Maxi/ Midi Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Qiaquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>DIG-PCR Probe Synthesis Kit</i>	Roche, Mannheim
<i>DIG High Prime DNA Labeling und detection Starter Kit II</i>	Roche, Mannheim
<i>Limulus Amebocyte Lysate QCL-1000®</i>	Cambrex, Walkersville, MD, USA

Tab. B-8: Übersicht der verwendeten kommerziellen Kits

B.1.7 Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Sigma und Merck, Zellkulturmaterien von den Firmen Falcon, GibcoBRL und PAN und sonstiges Plastikmaterial von den Firmen Falcon, Sarstedt, Greiner und Eppendorf bezogen. Für

Restriktionsendonukleasen und übrige Enzyme wurden Produkte der Firma New England Biolabs, Frankfurt, verwendet.

B.1.8 Versuchstiere

Die Versuchstiere (weibliche Mäuse der Inzuchtrasse BALB/cAnNCrl (H-2^d)) wurden bezogen von Charles River, Sulzfeld.

B.2 Methoden

B.2.1 Mikrobiologische Techniken

B.2.1.1 Anzucht und Selektion von Bakterien

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in *Luria Bertani* (LB-) Flüssigmedium bzw. auf LB-Agarplatten über Nacht bei 37 °C bzw. für EL250 Bakterien bei 32 °C. Zur Selektion positiver Transformanten wurde entsprechend dem verwendeten Plasmid oder Bacmid ein geeignetes Selektionsmedium mit Ampicillin (100 µg/ mL), Kanamycin (50 µg/ ml), Chloramphenicol (34 µg/ mL) oder eine Kombination der drei Antibiotika eingesetzt.

B.2.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien

B.2.1.2.1 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien

Chemisch kompetente Bakterien wurden nach der RbCl-Methode hergestellt (Hanahan, 1983). Dafür wurde der gewünschte Bakterienstamm bei geeigneter Temperatur und in geeignetem SOC-Selektionsmedium bis zur frühen exponentiellen Wachstumsphase angezogen (OD₆₀₀ 0,2-0,4). Nach Erreichen der optimalen Zelldichte wurde die Zellsuspension geerntet, 10 min bei 3200 xg und 4 °C abzentrifugiert und das Bakterienpellet in eiskaltem RF 1-Puffer (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM Kac, 10 mM CaCl₂, 15 % [v/v] Glycerin pH 5,8; sterilfiltriert) aufgenommen. Die eingesetzte Puffermenge entsprach dabei einem Drittel des Volumens der Bakterienkultur. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut 10 min bei 3200 xg und 4 °C abzentrifugiert und das Pellet in eiskaltem RF2-Puffer (10 mM MOPS 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15 % [v/v] Glycerin, pH 6,8; sterilfiltriert) aufgenommen. Die eingesetzte Puffermenge entsprach dabei einem Zwölftel des Volumens der Ausgangskultur. Die kompetenten Bakterien wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

B.2.1.2.2 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Elektrokompetente Bakterien wurden nach einem adaptierten Protokoll der Methode von Dower (Dower *et al.*, 1988) hergestellt.

Dafür wurde der gewünschte Bakterienstamm bei geeigneter Temperatur und in geeignetem LB-Selektionsmedium bis zur frühen exponentiellen Wachstumsphase angezogen (OD₆₀₀ 0,2-0,4). Nach Erreichen der optimalen Zelldichte wurde die Zellsuspension geerntet, 15 min auf Eis inkubiert, anschließend 10 min bei 3200 xg und 4°C abzentrifugiert und das Bakterienpellet in eiskalter, steriler 10 % Glycerin-Lösung aufgenommen. Die eingesetzte Puffermenge entsprach dabei der Hälfte des Volumens der eingesetzten Bakterienkultur. In zwei weiteren Waschschritten wurde die Menge an 10 %igem Glycerin auf 1/100 des Volumens der eingesetzten Bakterienkultur eingeengt. Elektrokompetente Bakterien wurden stets frisch hergestellt und nicht gelagert.

B.2.1.2.3 Herstellung rekombinationskompetenter Bakterien

Die Herstellung rekombinationskompetenter Bakterien erfolgte analog zur Herstellung elektrokompetenter Bakterien (siehe Kapitel B.2.1.2.2). Zusätzlich wurde jedoch nach dem Erreichen der optimalen Zelldichte für 15 min ein Inkubationsschritt bei 42 °C durchgeführt.

B.2.1.3 Transformation von Bakterien

B.2.1.3.1 Chemische Transformation

100 µL chemisch-kompetente Bakterien (siehe Kapitel B.2.1.2.1) wurden auf Eis aufgetaut, mit Ligationsansatz (siehe Kapitel B.2.2.1) oder Plasmid-DNA (10-100 ng) gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde für 45 s bei 42 °C ein Hitzeschock durchgeführt und der Transformationsansatz danach umgehend für 2 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde 1 mL LB-Medium zu dem Elektroporationsansatz zugegeben und unter Schütteln (350 rpm) 1 h bei 37 °C inkubiert. Zuletzt wurde die Bakteriensuspension auf einem geeigneten Selektionsagar ausplattiert und bei 37 °C inkubiert. Nach 24 bis 48 h wurden Kolonien gepickt und analysiert.

B.2.1.3.2 Elektroporation

Für die Elektroporation wurden 50 µL elektrokompetente oder rekombinationskompetente Bakterien (siehe Kapitel B.2.1.2.2 und B.2.1.2.3) mit DNA gemischt und in eine Elektroporationsküvette (PeqLab, Erlangen) mit 1 mm Elektrodenabstand überführt. Die Bakterien wurden in der Küvette mit Hilfe eines Elektroporationssystems (Gene Pulser, BioRad, München) bei Standardeinstellungen (1,25 kV, 200 Ω, und 25 µF) gepulst. Nach dem Puls wurde 1 mL LB-Medium zu dem Elektroporationsansatz zugegeben und unter Schütteln (350 rpm) 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf

einem geeigneten Selektionsagar ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Nach 24 bis 48 h wurden Kolonien gepickt und analysiert.

B.2.1.4 Anlegen von Glycerinkulturen

5 mL einer frischen Bakterienkultur in exponentieller Wachstumsphase wurden geerntet und für 10 min bei 4 °C und 3800 xg pelletiert. Das Pellet wurde in 500 µL LB-Flüssigmedium resuspendiert, mit 500 µL steriles Glycerin (87 %) gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

B.2.2 Molekularbiologische Arbeitstechniken

B.2.2.1 Klonierung

Soweit nicht anders vermerkt, wurden für Klonierungen in *Escherichia coli* (*E. coli*) Standardmethoden angewendet (Sambrook und Russel, 2001). Alle Klonierungen wurden mittels DNA-Sequenzierung, durchgeführt bei der Geneart AG (Regensburg), nach der Methode von Sanger (Sanger *et al.*, 1977) überprüft.

B.2.2.2 DNA-Aufreinigung und Analyse

B.2.2.2.1 Plasmid DNA

Plasmid-DNA aus einem Kulturvolumen bis 5 mL wurde gemäß dem Protokoll der alkalischen Schnelllyse präpariert (Sambrook und Russel, 2001).

Die präparative Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA Übernachtkultur erfolgte über Anionenaustauscher-Säulen *Qiagen-tip 100* oder *Qiagen-tip 500* (Qiagen, Hilden) nach Anweisungen des Herstellers.

Die Präparation von Plasmid-DNA zur Applikation in Mäusen wurde im Mega- bzw. Giga-Maßstab unter Verwendung des *Endotoxin-free DNA preparations-Kit* (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers präpariert, um Kontaminationen durch immunmodulatorische, bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) zu vermeiden. Plasmid-DNA für Anwendungen *in vivo* wurden in steriles PBS (10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl) aufgenommen.

Die Konzentration der aufgereinigten DNA wurde photometrisch ermittelt und nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ($1 \text{ OD}_{260} = 47,5 \text{ } \mu\text{g dsDNA/mL}$) berechnet. Zur weiteren Analyse wurde je 1 µg DNA mit Hilfe von 10 U geeigneter Restriktionsendonukleasen nach Angaben des Herstellers spezifisch geschnitten, mit 6x DNA-Auftragspuffer (0,001 % [w/v] Bromphenolblau, 0,001 % [w/v] Xylencyanol, 60 mM EDTA, 36 % [v/v] Glycerin) versetzt und mittels Gelelektrophorese auf einem Ethidiumbromid-haltigen TBE-Agarosegel analysiert

(TBE-Puffer: 8,5 mM Tris, 89 mM Borsäure, 0,47 mM EDTA; mit 0,5-1 % Agarose und 50 ng/mL Ethidiumbromid).

B.2.2.2.2 Bacmid-DNA

Bacmid-DNA wurde gemäß dem Protokoll der alkalischen Schnelllyse päpariert (Sambrook und Russel, 2001). Je 1 µg aufgereinigte Bacmid-DNA wurde mit 10 U einer spezifischen Restriktionsendonuklease 2 h bei 37 °C fragmentiert, mit 6x DNA-Auftragspuffer (0,001 % [w/v] Bromphenolblau, 0,001 % [w/v] Xylencyanol, 60 mM Na₂EDTA, 36 % [v/v] Glycerin) versetzt und anschließend mittels Gelelektrophorese 16 h bei 36 V auf einem 0,8 % Agarose-TAE Gel aufgetrennt (TAE-Puffer: 40 mM Tris, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7,8). Durch Behandlung mit Ethidiumbromid (1 µg/mL)-TAE-Puffer (30 min, Raumtemperatur) und anschließendem Entfärbten in TAE-Puffer (10 min, Raumtemperatur) wurde die DNA angefärbt und auf einem UV-Schirm analysiert.

B.2.2.2.3 Genomische/ virale DNA

Die Isolierung genomicscher DNA aus eukaryontischen Zellen bzw. viraler DNA aus infizierten Zellen wurde mit dem *QIAamp DNA Kit* (QIAGEN, Düren) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Konzentration der aufgereinigten DNA wurde photometrisch ermittelt und nach dem Lambert-Beerschen Gesetz (1 OD₂₆₀= 47,5 µg dsDNA/ mL) berechnet. Für anschließende PCR-Applikationen (siehe Kapitel B.2.2.3) wurde 1 µg DNA eingesetzt.

B.2.2.3 PCR-Analyse

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (Saiki *et al.*, 1988), soweit nicht anders angegeben unter Standardbedingungen (primäre Denaturierung 94 °C, 5 min; [Denaturierung 94 °C, 30 s; Annealing 55 °C, 30 s; Extension 72 °C, 60 s/ 1000bp] 30 Zyklen; finale Elongation 72 °C, 15 min) unter Verwendung eines 2x PCR Master Mix (Promega, Mannheim) oder der *Precision Taq* DNA-Polymerase (Stratagene, Heidelberg). Die Sequenzen der als Primer verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. B-3 aufgelistet.

B.2.2.4 Southern Blot Analyse

Spezifische elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente wurden mittels DIG-markierten Sonden im *Southern Blot* nachgewiesen (Southern, 1975).

Dafür wurden die DNA Fragmente in einem 0,8 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und das Gel im Anschluss zweimal für je 15 min in Denaturierungspuffer (0,5 M

NaOH, 1,5 M NaCl) und zweimal für je 15 min in Neutralisierungspuffer (0,5 M Tris, 1,5 M NaCl, pH 7,5) gewaschen. Anschließend wurden die DNA-Fragmente aus dem Gel mittels einer Kapillarblotapparatur bei Raumtemperatur 16-24 h auf eine positiv-geladene Nylonmembran (0,45 µm Biodyne Plus, PALL, Pensacola Florida, USA) übertragen (Transferpuffer 20xSSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M NaCl, pH 7,5). Nach dem Transfer wurde die DNA mit Hilfe eines UV-Crosslinker (UV Stratalinker 2400, Stratagene, Heidelberg) kovalent an die Nylonmembran gebunden (Auto Cross-Link). Danach wurde die Membran 2 h bei 42 °C in Hybridisierungspuffer (25 % [v/v] 20x SSC, 0,1 % [w/v] N-Laurylsarcosin, 0,02 % [w/v] SDS, 50 % [v/v] Formamid, 2 % [w/v] Blocking Reagenz (Roche, Mannheim)) prähybridisiert und nach Zugabe der denaturisierten (68 °C, 10 min) DIG-markierten Sonden (2 µL PCR-Produkt/ mL Hypridisierungspuffer) 16 h bei 42 °C hybridisiert. DIG-markierte Sonden wurden unter Verwendung des *DIG-PCR Probe Synthesis Kit* (Roche, Mannheim) gemäß Herstellerangaben hergestellt (Template und verwendete Primer siehe Tab. B-9).

Template für DIG-markierte Sonde	Primer 1	Primer 2
pcDNA 3.1 IIIBsyngag	syngag_DIG_sonde_pf_260603	syngag_DIG_sonde_pb_260603
pcDNA 3.1 IIIBwtgag	IIIB wtgag 976-996 fw	IIIB wtgag 1556rev
pcDNA Cgpn	Cgpn 2810fw	Cgpn 3820rev
pcDNA 3 IIIBgpn	IIIBsgpn 2942fw	IIIBsgpn 3549rev
pcDNA 3.1 gp120	gp120 481fw	gp120 1114rev

Tab. B-9: Übersicht Herstellung pEP-Transferkonstrukte (Sequenz der verwendeten Oligonukleotide siehe Tab. B-3).

Nach der Hybridisierung wurde die Membran je zweimal für 10 min bei 65 °C in nicht-stringentem Waschpuffer (2x SSC mit 0,1 % [w/v] SDS) gewaschen, gefolgt von zwei Waschschriften unter den gleichen Bedingungen mit hoch-stringentem Waschpuffer (0,2x SSC+ 0,1 % SDS).

Schließlich wurden die hybridisierten Proben mit einem AP-gekoppelten anti-Digoxigenin Fab-Fragment (siehe Tab. B-5) immunodetektiert und dann mit Hilfe des Chemilumineszenzsubstrats CDP-Star (Roche, Mannheim) visualisiert. Die Durchführung erfolgte dabei gemäß Herstellerangaben des *DIG High Prime DNA Labeling und Detection Starter Kit II* (Roche, Mannheim).

B.2.2.5 Herstellung von rekombinanten EHV-Bacmiden (En Passant-Methode)

Die Herstellung rekombinanter EHV-Bacmide erfolgte in einem zweistufigen Rekombinationsprozess nach der *En Passant*-Methode von Tischer (Tischer *et al.*, 2006).

B.2.2.5.1 Herstellung der Transferkonstrukte

B.2.2.5.1.1 Herstellung von Transferkonstrukten zur Integration eines Transgens in die Bacmid-Sequenz

Zum Einbringen von Transgensequenzen in die Bacmid-Sequenz wurde der gewünschte Leserahmen in den Polylinker des pEP Plasmids kloniert (siehe Kapitel B.2.2.1; Übersicht pEP-Plasmide siehe Tab. B-10).

Durch Spaltung von 1 µg Plasmid mit der *Homing* Endonuklease I-CeuI (10 U/µg Plasmid, 3 h, 37 °C), Auf trennung der Fragmente mittels Gelelektrophorese über ein 0,5 %iges Agarose-TBE-Gel (8,5 mM Tris, 89 mM Borsäure, 0,47 mM EDTA; mit 0,5 % Agarose und 50 ng/mL Ethidiumbromid) und anschließende Aufreinigung mit dem *Qiaquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) wurde ein lineares Transferkonstrukt hergestellt. Dieses Transferkonstrukt enthält neben der Expressionskassette für das gewünschte Transgen (CMV-Promotor, Transgen-Leserahmen, BGH-PolyASite) auch eine Schnittstelle für die *Homing* Endonuklease I-SceI sowie Bereiche (A in, B in), die zur Bacmid-Sequenz homolog sind und der gerichteten Integration des Transferkonstrukts während der 1. RED-Rekombination dienen. Eine Kanamycinresistenz-Kassette (*aphI*) dient der Selektion positiver Klone, und interne homologe Bereiche (*aphI* out) ermöglichen die rückstandsfreie Ausrekonstruktion des Selektionsmarkers (*aphI*) während der 2. RED-Rekombination (Schemadarstellung pEP-Plasmid siehe auch Abb. B-1).

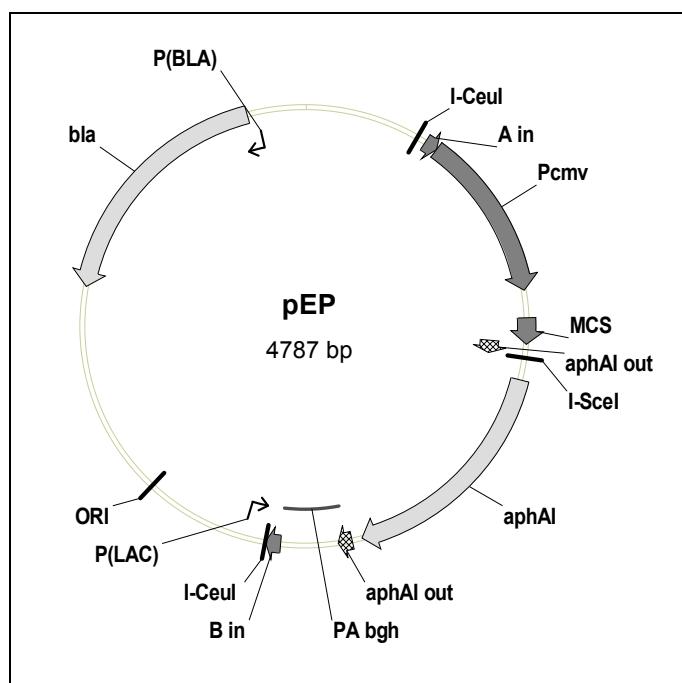


Abb. B-1: Schematische Darstellung des pEP Plasmids

A in, B in: Homologe Bereiche zur Integration in die Bacmid-Sequenz während der 1. RED-Rekombination

aphI out: Interne homologe Bereiche zur Entfernung der Kanamycinresistenz-Kassette (*aphI*) während der 2. RED-Rekombination

P(BLA): Promotor der Ampicillinresistenz-Kassette (bla)

P(LAC): Lactose induzierbarer Promotor

P_{CMV}: CMV-Promotor

ORI: prokaryontischer *Origin of Replication*

MCS: Polylinker

PA bgh: BGH-PolyA-Site

I-CeuI: Schnittstelle der Homing-Endonuklease I-CeuI

I-SceI: Schnittstelle der Homing-Endonuklease I-SceI

Ursprungsvektor	Zielkonstrukt	Schnittstellen
pcDNA 3.1 IIIBsyngag	pEP IIIBsyngag	<i>Kpn</i> I, <i>Bam</i> H I
pcDNA 3.1 IIIBwtgag	pEP IIIBwtgag	<i>Kpn</i> I, <i>Bam</i> H I
pcDNA 3.1 gfp	pEP gfp	<i>Mlu</i> I, <i>Bam</i> H I
pcDNA Cgpn	pEP Cgpn	<i>Kpn</i> I, <i>Xba</i> I
pcDNA 3 IIIBgpn	pEP IIIBgpn	<i>Eco</i> RI, <i>Xba</i> I
pcDNA 3.1 gp120 tpa	pEP gp120 tpa	<i>Mlu</i> I, <i>Not</i> I

Tab. B-10: Übersicht Herstellung pEP-Transferkonstrukte

B.2.2.5.1.2 Herstellung eines Transferkonstrukt zur Deletion von Bacmidsequenz

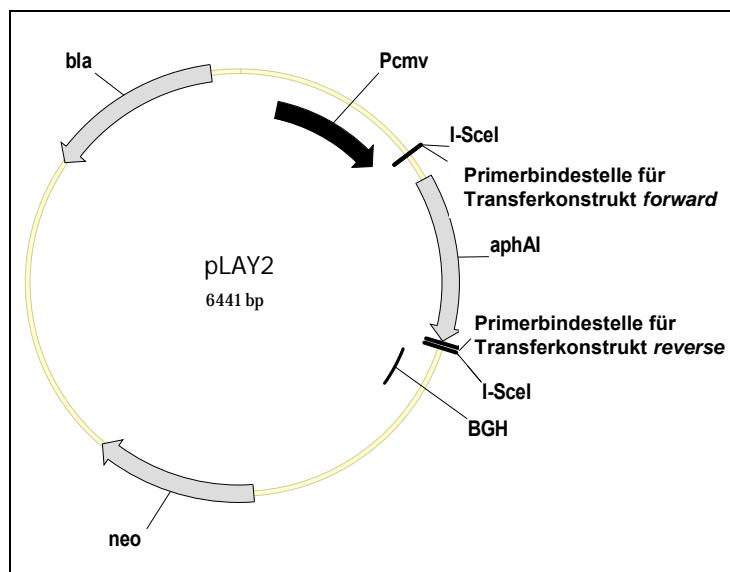


Abb. B-2: Schematische Darstellung des pLAY2 Plasmids

aphAl Kanamycinresistenz-Kassette
 bla: Ampicillinresistenz-Kassette
 neo: Neomycinresistenz-kassette
 P_{CMV}: CMV-Promotor
 BGH: BGH-PolyA-Site
 I-SceI: Schnittstelle der Homing Endonuklease I-SceI

Die Herstellung von Transferkonstrukten zur Deletion von Sequenzen aus dem Bacmid erfolgte mittels PCR (primäre Denaturierung 94 °C, 5 min; [Denaturierung 94 °C, 30 s; Annealing 49 °C, 30 s; Extension 68 °C, 80 s] 10 Zyklen; [Denaturierung 94 °C, 30 s; Annealing/Extension 68 °C, 2 min] 20 Zyklen; finale Elongation 68 °C, 5 min). Als *Template* (100 ng) für die PCR-Reaktion diente das pLAY2 Plasmid (siehe Abb. B-2). Im amplifizierten Bereich befinden sich eine Schnittstelle für die *Homing* Endonuklease I-SceI, sowie eine Kanamycinresistenz-Kassette zur Selektion positiver Klone. Die Primer für die Reaktion haben eine Länge von jeweils 80 bp und sind so beschaffen, dass neben der pLAY2-spezifischen Erkennungssequenz auch Sequenzbereiche an das PCR-Produkt angefügt

werden, die homolog zur Zielsequenz im Bacmid sind, und dass zusätzlich interne homologe Bereiche geschaffen werden, die eine rückstandsfreie Ausrekonkination des Selektionsmarkers (*aphI*) ermöglichen (verwendete Primer siehe Tab. B-3).

Das erhaltene PCR Produkt wurde mittels Gelelektrophorese über ein 0,5 %iges Agarose-TBE-Gel (8,5 mM Tris, 89 mM Borsäure, 0,47 mM Na₂EDTA; mit 0,5 % Agarose und 50 ng/mL Ethidiumbromid) auf seine Spezifität hin überprüft und anschließend mit dem *Qiaquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) gemäß Herstellerangaben aufgereinigt.

B.2.2.5.2 Einbringen des Transgens in EHV-Bacmid (1. RED-Rekombination)

100 ng des linearen Transferkonstrukt (siehe Kapitel B.2.2.5.1) wurden in rekombinationskompetente EL250 pRacHrv pBAD-I-Sce-I (siehe Kapitel B.2.1.2.3) elektroporiert (siehe Kapitel B.2.1.3.2), auf LB-Agar mit Ampicillin (100 µg/ mL), Kanamycin (50 µg/ ml) und Chloramphenicol (34 µg/ mL) ausplattiert und 24 h bei 32 °C inkubiert.

Kanamycinresistente Klone wurden mittels PCR (siehe Kapitel B.2.2.3) unter Verwendung eines Transgen-spezifischen Primers und eines Bacmid-spezifischen Primers auf Integration des Transferkonstruktes überprüft (Sequenzen verwendeter Primer siehe Tab. B-3)

B.2.2.5.3 Entfernen der Kanamycinresistenz Kassette aus EHV-Bacmid (2. RED-Rekombination)

Kanamycinresistente Klone aus der 1. RED-Rekombination wurden 16 h unter Schütteln bei 32 °C in 5 mL LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ mL), Kanamycin (50 µg/ ml) und Chloramphenicol (34 µg/ mL) inkubiert.

100 µL der Vorkultur wurden in 2 mL LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ mL) und Chloramphenicol (34 µg/ mL) überführt und bis zum Erreichen der frühen logarithmischen Phase (2-4 h) bei 32 °C unter Schütteln inkubiert. Durch Zugabe von 2 mL LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ mL), Chloramphenicol (34 µg/ mL) und 1 % [w/v] Arabinose und weiterer Inkubation für 60 min bei 32 °C unter Schütteln wurde dann die Expression des I-Sce-I-Enzyms induziert. Im Anschluss wird durch einen Hitzeschock für 30 min bei 42 °C unter Schütteln das Rekombinationssystem in den EL250 angeschaltet und danach 3 h bei 32 °C unter Schütteln bei 32 °C regeneriert. 2,5 %, 0,25 % und 0,025 % des Kulturvolumens wurden dann auf auf LB-Agar mit Ampicillin (100 µg/ mL), Chloramphenicol (34 µg/ mL) und 1 % [w/v] Arabinose und 48 h bei 32 °C inkubiert.

Kanamycininsensitive Klone wurden mittels geeigneter Selektionsplatten ermittelt und durch PCR-Analyse (siehe Kapitel B.2.2.3) unter Verwendung eines Transgen-spezifischen Primers und eines Bacmid-spezifischen Primers auf Entfernung der Kanamycinresistenz-Kassette hin überprüft (Sequenzen verwendeter Primer siehe Tab. B-3)

Eine weitere Verifizierung der rekombinanten Bacmide erfolgte mittels Analyse spezifischer Restriktionsmuster nach endonukleolytischer Fragmentierung der Bacmid-DNA (siehe Kapitel B.2.2.2.2) und durch *Southern Blot* Analysen (siehe Kapitel B.2.2.4).

B.2.3 Proteinbiochemische Methoden

B.2.3.1 Aufbereitung von Proteinproben

Transfizierte bzw. infizierte eukaryontische Zellen wurden geerntet, einmal mit kaltem PBS (10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl) gewaschen (300 xg; 5 min; 4 °C) und in einem geeigneten Volumen RIPA-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,1 % SDS [w/v]; 1 % Nonidet-40 [w/v]; 0,5 % Na-Deoxycholat [w/v]+ 1 Tablette Proteaseinhibitor/ 15 mL (CompleteTM; Roche, Mannheim)) aufgenommen. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zelllysate 15 min bei 20800 xg und 4 °C abzentrifugiert. Die Überstände wurden in frische Reaktionsgefäße überführt und bei -20 °C gelagert.

B.2.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge in den aufbereiteten Proteinproben erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) und wurde unter Verwendung des *BioRad Protein Assay* Reagenz (BioRad, München) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Proteinmenge wurde relativ, bezogen auf eine BSA-Standardgerade, bestimmt.

B.2.3.3 Analyse der Proteinexpression mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse

Zur Analyse der spezifischen Proteinexpression wurden definierte Proteinmengen (50-100 µg Gesamtprotein) mit 5x SDS Probenpuffer (312,5 mM Tris/ HCl, pH 6,8; 5 % [w/v] SDS, 25 % β-Mercaptoethanol, 2,5 mM EDTA, 25 % [v/v] Glycerin, 0,0125 % [w/v] Bromphenolblau) versetzt, 5 min bei 95 °C erhitzt und über ein SDS-Polyacrylamidgel entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend unter Verwendung einer „*SemiDry-Blotting*“-Apparatur nach Angaben des Herstellers (BioRad, München) aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (Porengröße 0,45 µm) (Schleicher & Schuell, Dassel) überführt. Nach dem Blotten wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran über Nacht bei 4 °C in TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 500 mM NaCl) +5 % [w/v] Magermilchpulver blockiert. Anschließend wurden die Zielproteine mit Hilfe spezifischer primärer Antikörper (verdünnt in TBS) und AP-konjugierter, sekundärer Antikörper (verdünnt in TBS) (Antikörper und Verdünnungen siehe Tab. B-5 und Tab. B-6) nach herkömmlichen Methoden detektiert und analysiert (Sambrook und Russel, 2001). Die Antikörper-Antigen-Komplexe auf der Membran wurden über NBT/BCIP-

Färbereagenz (Roche, Mannheim) (1:500 verdünnt in AP-Färbepuffer (100 mM Tris-HCl, pH 9,5; 50 mM MgCl₂; 100 mM NaCl)) detektiert.

B.2.4 Zellkulturtechniken

B.2.4.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Eukaryontische Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in Komplettmedium kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 bis 1:7,5 subkultiviert.

Komplettmedium

RK13, A549	DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>) mit 10 % inaktiviertem fötalem Kälberserum ¹ (FKS), Penicillin (100 U/mL) und Streptomycin (100 µg/mL)
RK13-48	DMEM mit 10 % inaktiviertem FKS, Penicillin (100 U/mL), Streptomycin (100 µg/mL) und Geneticin (500 µg/mL)

Tab. B-11: Übersicht verwendete Zellkulturmedien

(¹Die Inaktivierung des fötalen Kälberserums erfolgte für 30 min bei 56 °C)

B.2.4.2 CaHPO₄—Transfektion

4 × 10⁵ RK13 oder RK13-48 Zellen wurden in 6-Napf-Schalen (Ø 3 cm) ausgesät und 24 h später durch Calciumphosphat-Präzipitation (Graham und van der Eb, 1973) mit 15 µg Plasmid-DNA bzw. 2 µg Bacmid-DNA transfiziert.

Dafür wurde die entsprechende Menge an DNA in 225 µL 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) vorgelegt, 25 µL 2,5 M CaCl₂ wurden unter Schütteln zugetropft und über Nacht bis zur Bildung eines feinen Präzipitates bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde tropfenweise 250 µL 2xHeBS (280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM Na₂HPO₄, pH 7,03) zugegeben, der Ansatz 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann zu den Zellen gegeben, deren Medium in der Zwischenzeit durch 500 µL serumfreies DMEM +1% Pen/Strep ersetzt worden war. Nach drei bis vierstündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen mit PBS (10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl) gewaschen und für exakt 2 min mit 1,5 mL einer 15 %igen Glycerol/HeBs-Lösung überschichtet. Danach wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen, mit Komplettmedium substituiert und unter Standardbedingungen inkubiert. Zellen und Zellüberstände wurden in der Regel 48 h nach Transfektion geerntet.

Für größere Transfektionsansätze wurde die Menge an eingesetzten Zellen, DNA und Reagenzien entsprechend erhöht (z.B. Petrischale (Ø 10 cm); ausgesät 2×10⁶ Zellen, transfiziert mit 45 µg Plasmid-DNA).

B.2.4.3 Generierung von primären Maus-Splenozyten

Mausmilzen wurden unter Verwendung eines sterilen Präparationsbestecks entnommen und in 5 mL Waschpuffer (PBS/ 1 %FCS) pro Milz aufgenommen. Anschließend wurden die Milzen mitsamt der Flüssigkeit in Petrischalen überführt und zur Gewinnung von Einzelzellsuspension mit dem Stempel einer 5 mL Spritze in einem Nylonfilter (100 µm Porengröße) zerrieben. Nachfolgend wurde die Zellsuspension in ein steriles 50 mL Gefäß überführt und pelletiert (300 xg, Raumtemperatur, 5 min). Zur Entfernung der Erythrozyten (Hämolyse) wurden die Zellen in Lysepuffer (5 mL/ Milz) (150 mM NH₄Cl; 1 mM KHCO₃; 0,1 mM Na₂EDTA; pH 7,2) resuspendiert und sofort pelletiert (300 xg, Raumtemperatur, 5 min). Anschließend wurde zweimal in je 10 mL Waschpuffer gewaschen (300 xg, Raumtemperatur, 5 min). Danach wurden die Zellen in Komplettmedium, bestehend aus RPMI-1640 Medium supplementiert mit 10 % inaktiviertem FKS, Penicillin (100 U/mL), Streptomycin (100 µg/mL), 2 mM Glutaminlösung und 50 µM β-Mercaptoethanol, aufgenommen. Da die primären Zellen ohne Zusatz von Cytokinen innerhalb von 2-3 Tagen absterben, wurden alle weiterführenden Versuche sofort nach der Präparation der primären Zellen angesetzt.

B.2.4.4 Arbeitstechniken mit Virus**B.2.4.4.1 Herstellung von infektiösem Virus aus herpesviraler Bacmid-DNA**

2 µg Bacmid-DNA pro 6-Napf-Loch (Ø 3 cm) wurden mittels Calciumphosphat-Methode in RK13 oder RK13-48 Zellen transfiziert (siehe Kapitel B.2.4.2). Nach Auftreten eines deutlichen cytopathischen Effekts (2-5 Tage nach Transfektion) wurden die Zellen und Zellüberstand geerntet und durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37 °C aufgeschlossen. Danach wurde das Zelllysat zur Abtrennung von Zelltrümmern 10 min bei Raumtemperatur und 800 xg abzentrifugiert, der klare Überstand abgenommen, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

B.2.4.4.2 Herstellung hochtitriger Virusstocks

Konfluente RK13 oder RK13-48 wurden mit einer Virussuspension (MOI 1 oder nicht-titrierten Transfektionsüberständen gemäß Kapitel B2.4.4.1) beimpft und bis zur Ablösung des Zellrasens (nach ein bis drei Tagen) unter Standardbedingungen inkubiert. Danach wurden Zellen und Zellüberstand geerntet und durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37 °C aufgeschlossen. Zur Abtrennung von Zelltrümmern wurde das Lysat 10 min bei Raumtemperatur und 800 xg abzentrifugiert. Die Viren aus dem Überstand wurden im Anschluss mittels Ultrazentrifugation (SW32 Rotor 2 h, 4 °C, 25 000 rpm) über ein 30 %iges Sacharosekissen angereichert. Nach der Zentrifugation

wurde der Überstand verworfen, das Viruspellet in PBS (10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl) aufgenommen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Virussuspension aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Virustiter wurden von jeweils zwei Aliquots im Doppelansatz bestimmt (siehe Kapitel B.2.4.4.5)

B.2.4.4.3 Bestimmung von Infektionsraten

Zur Bestimmung des Anteils infizierter Zellen wurden 4×10^5 RK13 bzw. RK13-48 Zellen in 1 mL Komplettmedium mit einer Virussuspension definierter MOI infiziert und 2 h unter Standardbedingungen inkubiert. Danach wurde das Medium gewechselt und der Anteil der infizierten Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mittels FACS Analyse ermittelt.

Im Falle von EHV-gfp infizierten Zellen wurden die Zellen geerntet, einmal in PBS (10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl) gewaschen, in einer geeigneten Menge FACS-Puffer (PBS mit 1 % FKS und 1 mg/mL NaN₃) aufgenommen und dann der Anteil GFP-positiver Zellen im FACS bestimmt (FACScalibur, BD Bioscience).

EHV-syngag infizierte Zellen wurden nach der Ernte zunächst mittels eines Gag-spezifischen PE-gekoppelten Antikörpers (siehe Tab. B-5) intrazellulär angefärbt. Dafür wurden die geernteten Zellen zunächst zweimal in FACS-Puffer gewaschen (5 min, 4 °C, 300 xg) und dann in 250 µL Cytofix/Cytoperm (PBS mit 4 % PFA und 1 % Saponin) aufgenommen. Nach 20 min Inkubation bei 4 °C wurden die Zellen zweimal in Perm/Wasch-Puffer (PBS mit 0,1 % Saponin) gewaschen (5 min, 4 °C, 500 xg) und anschließend für 25 min mit 100 µL Antikörper-Lösung (Verdünnung 1:100 in Perm/Wasch-Puffer) bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten in Perm/Wasch-Puffer (5 min, 4 °C, 500 xg) wurde das Zellpellet in einer geeigneten Menge FACS-Puffer aufgenommen und die Probe im Durchflusszytometer analysiert.

B.2.4.4.5 Bestimmung von Virustitern mittels Plaque Assay

Die Bestimmung von Virustitern wurde mit RK13 bzw. RK13-48 Zellen in 12-Napf-Schalen durchgeführt. Hierzu wurde das Medium der konfluenten Zellen quantitativ entfernt und durch unterschiedliche Verdünnungen an infektiösem Zellkulturüberstand oder aufgereinigtem Virus ersetzt (Gesamtvolumen 150 µL). Anschließend wurde 1 h bei gelegentlichem Schwenken unter Standardbedingungen inkubiert. Danach wurde das Medium gewechselt und durch 2 mL 0,25x Methocelmedium ersetzt. Nach Auftreten deutlicher Plaques im Zellrasen 2 bis 4 Tage nach Infektion wurde das Methocelmedium abgenommen, der Zellrasen einmal mit PBS (10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl) gewaschen und die Zellen im Anschluss mit Kristallviolettfixierer (PBS mit

5 % (v/v) Formalin) 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Die nachfolgende Färbung des Zellrasens wurde mit Kristallviolettfärbelösung (1,5 g/L Kristallviolett, 8,5 % (v/v) Ethanol, 25 % (v/v) Formalin) durchgeführt. Nach einer Einwirkzeit von 5-10 min wurde die Färbelösung entfernt, der Zellrasen mit bidest. Wasser gewaschen, getrocknet und Plaques ausgezählt. Der Virustiter berechnet sich gemäß der Formel:

$$\text{Virustiter [pfu/ mL]} = \frac{\text{Anzahl ausgezählte Plaques pro 12-Napf} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{0,125 \text{ mL}}$$

Abb. B-3: Formel zur Berechnung von Virustitern

(1x Methocelmedium: 25 g/L (w/v) Methylzellulose, 9,4 g/L (w/v), MEM-Pulver 26 mM NaHCO₃, 2 mM Glutamin; Gebrauchslösung (0,25x Methocelmedium) entspricht 1x Methocelmedium 1:4 verdünnt im jeweiligen Komplettmedium)

B.2.5 Immunologische Arbeitstechniken

B.2.5.1 Haltung und Immunisierung von Versuchstieren

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Immunisierungsstudien wurden weibliche Mäuse der Inzuchtrasse BALB/cAnNCrl (H-2^d) im Alter von 40-45 Tagen verwendet. Die Tiere wurden in der Tierversuchsanlage H4 des Universitätsklinikums Regensburg gehalten.

So weit nicht anders vermerkt, wurden die Tiere im Alter von acht Wochen grundimmunisiert, gefolgt von zwei *Booster*-Immunisierungen fünf und neun Wochen nach dem *Priming*.

Zur intramuskulären (i.m.) und nasalen (i.n.) Immunisierung wurden die Tiere zunächst mittels des Inhalationsnarkotikums Isoflurane (Baxter, Unterschleißheim) betäubt.

Für intramuskuläre Immunisierungen wurde die Region um die Einstichstelle rasiert und die gewünschte Menge eines entsprechenden Antigens in einem Volumen von je 50 µL langsam in beide Schienbeinmuskeln (*tibialis anterior*) injiziert. Bei der nasalen Applikation wurde die gewünschte Menge eines entsprechenden Antigens in einem maximalen Volumen von 25 µL in die Nase der betäubten Mäuse eingetropft.

Für eine subkutane Verabreichung (s.c.) wurde das entsprechende Antigen in einem Gesamtvolumen von 200 µL unter die Haut am Schwanzansatz der unbetäubten Mäuse injiziert.

B.2.5.2 Auslesen zellulärer Immunantworten

Die Population der Maussplenozyten setzt sich größtenteils aus B-Lymphozyten (50-60 %), CD4⁺ T-Zellen (ca. 25 %) und CD8⁺ T-Zellen (ca 12 %) sowie Monozyten/ Makrophagen und dendritischen Zellen (10 %) zusammen. Die übrigen Anteile entfallen auf neutrophile Granulozyten, natürliche Killer-Zellen und Fibroblasten.

Die Menge an IFN γ produzierenden CD8⁺-Zellen, die nach Restimulation der Splenozyten mit einem geeigneten Peptid auftritt, ist ein Maß für die Stärke der durch die Immunisierung induzierten zellulären Immunantwort. Die Bestimmung IFN γ produzierender Zellen erfolgte mittels intrazellulärer IFN γ Färbung CD8⁺ Zellen mit anschließender FACS Analyse oder durch Nachweis IFN γ produzierender Zellen im Elispot Assay.

B.2.5.2.1 Intrazelluläre IFN γ Färbung und Analyse mittels FACS Analyse

Zur Bestimmung von IFN γ produzierenden CD8⁺ Zellen in der Splenozytenpopulation wurde mit Hilfe Fluoreszenz-gekoppelter, spezifischer Antikörper eine Oberflächenfärbung der CD4- und CD8-Rezeptoren sowie eine intrazelluläre Färbung von IFN γ durchgeführt.

Dazu wurden die präparierten Maussplenozyten (siehe Kapitel B.2.4.3) auf eine Konzentration von 2×10^7 Zellen/ mL eingestellt und je 100 μ L in eine Vertiefung einer 96-Napf Zellkulturplatte überführt. Anschließend wurden unterschiedliche Stimulationsansätze vorbereitet. Dafür wurden spezifische (A9I) bzw. unspezifische (V3) Peptide (10 mM) je 1:500 in RPMI Medium verdünnt und 100 μ L der Verdünnungen zu den Splenozyten gegeben. Als weitere Negativkontrolle wurden Splenozyten ausschließlich mit 100 μ L RPMI Medium behandelt. Als Positivkontrolle wurden Splenozyten mit 100 μ L einer PMA/Iono-Lösung behandelt, die unspezifisch eine starke IFN γ -Produktion induziert (PMA/Iono-Lösung: 0,1 μ g/mL Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), 1 μ g/mL Ionomycin (Iono) in RPMI Medium). Die Zugabe von 1 μ g Brefeldin A (BFA) zu allen Stimulationsansätzen verhindert die IFN γ Sezernierung und ermöglicht so die intrazelluläre Anfärbung des Proteins in den stimulierten Zellen. Nach Inkubation der Zellen mit den jeweiligen Stimulationsansätzen für 6 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen zweimal mit 200 μ L FACS-Puffer (PBS mit 1 % FKS und 1 g/L Na₃N) gewaschen (5 min, Raumtemperatur, 300 xg) und anschließend in eine 96-Napf-Rundbodenplatte überführt. Um die Fc-Rezeptoren zu blockieren, wurde je 100 μ L einer CD16/32 Antikörperlösung (1:100 verdünnt in FACS-Puffer; siehe auch Tab. B-5) zu den Splenozyten gegeben und 10 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die CD4- und CD8-Oberflächenproteine durch Zugabe von 10 μ L einer Antikörperverdünnung von CD4-FITC (1:20 verdünnt in FACS-Puffer, siehe auch Tab. B-5) und CD8-APC (1:20 verdünnt in FACS-Puffer, siehe auch Tab. B-5) angefärbt. Nach einer Inkubation für 25 min bei 4 °C im Dunkeln wurden die Proben zweimal mit FACS-Puffer-II (PBS mit 1 mg/mL Na₃N) gewaschen (5 min, Raumtemperatur, 300 xg). Danach wurden die Proben in 250 μ L

Cytofix/Cytoperm (PBS mit 4 % PFA und 1 % Saponin) aufgenommen. Nach 20 min Inkubation bei 4 °C wurden die Zellen zweimal in Perm/Wasch-Puffer (PBS mit 0,1 % Saponin) gewaschen (5 min, 4 °C, 500 xg) und anschließend für 25 min mit 100 µL IFN γ -PE Antikörper-Lösung (Verdünnung 1:200 in Perm/Wasch-Puffer; siehe auch Tab. B-5) bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten in Perm/Wasch-Puffer (5 min, 4 °C, 500 xg) wurde das Zellpellet in einer geeigneten Menge FACS-Puffer aufgenommen und die Probe im Durchflusscytometer analysiert (FACScalibur; BD Pharmingen, Heidelberg).

B.2.5.2.2 Bestimmung IFN γ produzierender Splenozyten mittels Elispot Assay

Alternativ zur intrazellulären IFN γ -Färbung kann die Bestimmung der Anzahl IFN γ -sezernierender Zellen auch im Elispot Assay erfolgen.

Dafür wurden zunächst mit Nitrozellulose beschichtete 96-Napf Zellkulturplatten (MAHA-S45 Millipore, Eschborn) mit 100 µL einer Anti-Maus IFN γ (R4-6A2) Antikörperverdünnung (1:500 verdünnt in PBS; siehe auch Tab. B-5) über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit *Blocking* Reagenz (PBS +1 % FKS) unter sterilen Bedingungen, wurde die Platte 1 h bei 37 °C mit 200 µL *Blocking* Reagenz blockiert. Anschließend wurde das *Blocking* Reagenz quantitativ entfernt und je 100 µL unterschiedlicher Stimulationsreagenzien in den preinkubierten Wells vorgelegt. Die Stimulationsreagenzien enthielten entweder spezifisches (A9I) oder unspezifisches (V3) Peptid (10 mM) je 1:500 in RPMI Medium verdünnt. Als weitere Negativkontrolle für die Stimulation diente RPMI Medium. Als Positivkontrolle wurde eine PMA/Iono-Lösung verwendet, die unspezifisch eine starke IFN γ -Produktion induziert (PMA/Iono-Lösung: 0,1 µg/mL Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), 1 µg/mL Ionomycin (Iono) in RPMI Medium). Danach wurden 100 µL einer frisch präparierten Splenozytensuspension (1x10⁷ Zellen/ mL) zu den Stimulationsansätzen gegeben und 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach der *in vitro* Restimulation wurden die Zellen durch sechsmaliges Waschen mit Wasch-/Lysepuffer (PBS mit 0,05 % Tween-20) lysiert. Anschließend wurden je 100 µL eines sekundären biotinylierten Anti-Maus IFN γ Antikörpers (XMG1.2) (1:1000 verdünnt in PBS; siehe auch Tab. B-5) zugegeben und weitere 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Elispot-Platte erneut zehnmal mit Wasch-/Lysepuffer gewaschen, 100 µL eines Streptavidin-AP-Konjugats (1:5000 verdünnt in PBS) (Roche, Mannheim) zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach weiterem zehnmaligem Waschen mit Wasch-/Lysepuffer wurde durch Zugabe von je 50 µL AP-Färbelösung (100 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH9,5) gefärbt. Nach deutlicher Entwicklung von lila-gefärbten Spots auf der Nitrozellulosemembran, wurde die Färbereaktion durch Waschen mit deionisiertem Wasser abgestoppt, die Platten getrocknet

und die Anzahl der SFU (*spot forming units*) im Elispot-Reader (Bioreader-2000, Biosys GmbH, Karben) quantifiziert.

B.2.5.3 Auslesen humoraler Immunantworten

B.2.5.3.1 Gewinnung von Mausseren

Den Versuchstieren wurde einen Tag vor der Grundimmunisierung und eine Woche nach der zweiten *Booster*-Immunisierung durch Anritzten der Schwanzvene mit einem sterilen Skalpell Blut entnommen (100-500 µl). Zur Serumgewinnung wurde das Blut zunächst 1 h bei 37 °C und anschließend 1 h bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Blutproben zentrifugiert (5.200 xg; 4 °C; 10 min) und der klare Überstand als Serum in frische Probengefäße überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Serum bei -20°C gelagert.

B.2.5.3.2 Antikörper-ELISA (Ig gesamt/ IgG1/ IgG2a)

Die Bestimmung der Antikörpertiter von Gag-spezifischen Gesamtimmunglobulinen und der Subtypen IgG1 und IgG2a erfolgte mittels Endpunkttdilutions-ELISA.

Dafür wurden 96-Napf Maxisorb Platten (Nunc, Wiesbaden) mit je 100 ng VLP HIV-1 IIIB Pr55^{Gag} in 100 µL Carbonatpuffer (0,2 M NaHCO₃ pH 9,5 eingestellt mit 0,2 M Na₂CO₃) beschichtet (finale Proteinkonzentration je Napf 1 µg/mL) und über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer inkubiert.

Die Seren der Versuchstiere wurden in Verdünnungspuffer (PBS; 2 % (v/v) FCS; 3 % (v/v) Tween-20) seriell verdünnt (1:100/ 1:200/ 1:400/ 1:800/.../1:204800).

Nach fünfmaligem Waschen der preinkubierten 96-Napf Platten mit Waschpuffer (PBS; 0,05% Tween-20) wurden je 100 µL der hergestellten Serumverdünnungen auf die Platten aufgetragen und 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Platten sechsmal mit Waschpuffer gewaschen und mit je 100 µL einer geeigneten Verdünnung eines HRP-gekoppelten Antikörpers (siehe Tab. B-6) 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem sechsmaligem Waschen wurden je 100 µl TMB-Substratlösung (BD, Heidelberg) zugegeben. Im Dunkeln wurden die Proben bei Raumtemperatur so lange inkubiert, bis eine deutliche blaue Farbentwicklung eintrat. Dann wurde die Reaktion mit 100 µL 0,5 M H₂SO₄ abgestoppt und die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch bestimmt.

Der Antikörpertiter wurde bestimmt als der reziproke Wert der Serumverdünnung, bei der die gemessene OD gerade noch zweimal so hoch ist, wie die eines auf derselben Platte parallel gemessenen Negativserums. Als Negativserum dienten Seren von nicht immunisierten Mäusen.

B.2.5.4 Auslesen mukosaler Immunantworten**B.2.5.4.1 Bronchoalveolare Lavage (BAL)**

Zehn Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Mäuse mit CO_2 getötet und auf Styropor fixiert. Der Halsbereich wurde mit Ethanol desinfiziert, Fell und Gewebe entfernt und die Trachea freigelegt. Durch einen kleinen, kopfnahen Schnitt in der Luftröhre wurde eine abgestumpfte Kanüle ca. 6 mm tief eingeführt und mit einem Stück Bindfaden fixiert. Anschließend wurde die Lunge mit insgesamt 1 mL PBS (10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4 , 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl) zweimal gespült und die Spülflüssigkeit in einem geeigneten Probengefäß gesammelt.

Zur weiteren Aufbereitung der bronchoalveolaren Lavagen wurde die Spülflüssigkeit für 15 min bei 4 °C und 20 000 xg abzentrifugiert und der klare Überstand in frische Probengefäße überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die BALs bei -20 °C gelagert.

B.2.5.4.2 IgA Antikörper ELISA

Die Bestimmung der Antikörpertiter von Gag-spezifischen IgA erfolgte mittels Endpunkt-dilutions-ELISA.

Dafür wurden 96-Napf Platten (Nunc, Wiesbaden) mit je 100 ng VLP HIV-1 IIIB Pr55^{Gag} in 100 μL Carbonatpuffer (0,2 M NaHCO_3 pH 9,5 eingestellt mit 0,2 M Na_2CO_3) beschichtet (finale Proteinkonzentration je Napf 1 $\mu\text{g/mL}$) und über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer inkubiert.

Die bronchoalveolaren Lavagen der Versuchstiere wurden in Verdünnungspuffer (PBS; 2 % (v/v) FCS; 3 % (v/v) Tween-20) seriell verdünnt (1:10/ 1:20/ 1:40/.../ 1:1280).

Nach fünfmaligem Waschen der preinkubierten 96-Napf Platten mit Waschpuffer (PBS; 0,05% Tween-20) wurden je 100 μL der hergestellten Verdünnungen auf die Platten aufgetragen und 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Platten sechsmal mit Waschpuffer gewaschen und mit je 100 μL eines Biotin-gekoppelten anti-Maus IgA Antikörpers (1:1000 verdünnt in Verdünnungspuffer; siehe auch Tab. B-6) 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem zehnmaligem Waschen wurden je 100 μL Streptavidin-POD (1:2000 verdünnt in Verdünnungspuffer) auf die Platten aufgetragen. Nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten erneut sechsmal gewaschen und anschließend 100 μL TMB-Substratlösung (BD Pharmingen, Heidelberg) zugegeben. Im Dunkeln wurden die Proben bei Raumtemperatur so lange inkubiert, bis eine deutliche blaue Farbentwicklung eintrat. Dann wurde die Reaktion mit 100 μL 0,5 M H_2SO_4 abgestoppt und die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch bestimmt.

Der Gag-spezifische IgA Antikörpertiter wurde festgelegt als der reziproke Wert der BAL-Verdünnung, bei der die gemessene OD gerade noch zweimal so hoch ist, wie die einer auf

derselben Platte parallel gemessenen Negativkontrolle. Als Negativkontrolle dienten bronchoalveolare Lavagen von nicht immunisierten Mäusen.

C Ergebnisse

C.1 Entwicklung und Verifizierung rekombinanter Viren

C.1.1 Herstellung rekombinanter Viren

C.1.1.1 Allgemein

Die Herstellung der rekombinanten EHV beruht auf einer Kombination der BAC-Technologie und einem zweistufigen RED-vermittelten, homologen Rekombinationsprozess.

Dabei wird in einem ersten Schritt eine Expressionskassette für ein gewünschtes Transgen und ein geeigneter prokaryontischer Selektionsmarker mittels homologer Rekombination in die Bacmid-Sequenz einre kombiniert (1. RED-Rekombination). Nach der Selektion positiver

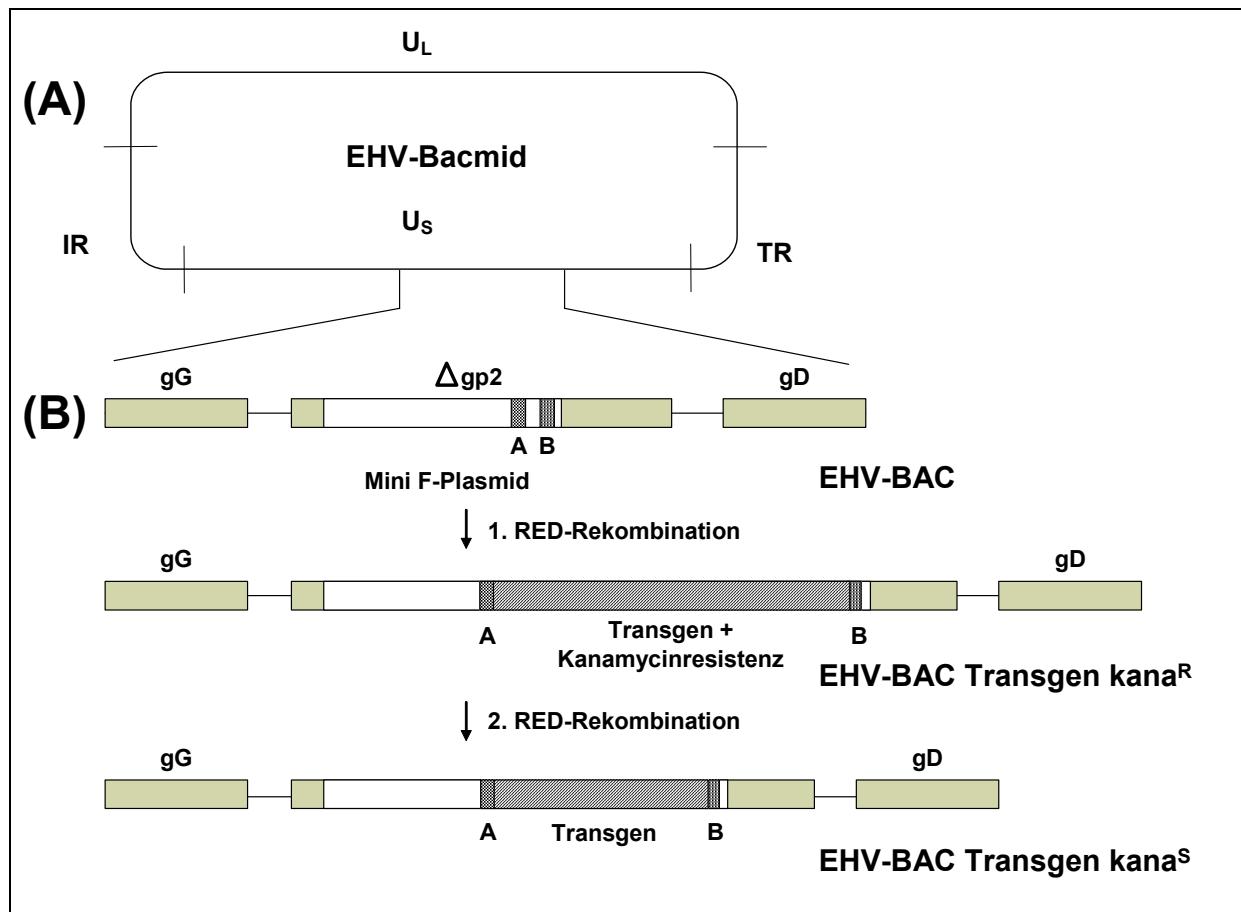


Abb. C-1: Schematischer Überblick der Herstellung eines rekombinanten EHV-Bacmids
 (A) Dargestellt ist das Bacmid des Equinen Herpesvirus Typ 1 bestehend aus der *unique short Region* (Us), *unique long Region* (UL), *terminal repeat Region* (TR) und *internal repeat Region* (IR).
 (B) Im Bereich des Gens für das nicht-essentielle Glykoprotein 2 (gp2) befindet sich ein miniF-Plasmid (pHA2). In ihm liegen die homologen Bereiche A und B, über die das Transferkonstrukt mittels homologer Rekombination ins Bacmid integrieren kann. Es entsteht ein rekombinantes Bacmid (EHV-BAC Transgen kana^R), das neben der Transgen-Kassette auch für eine Kanamycinresistenz codiert. Durch eine zweite, RED-vermittelte homologe Rekombination innerhalb des Transferkonstruktks, kommt es zur Ausrekonkombination der Kanamycinresistenz. Dies resultiert in einem rekombinanten Bacmid, das als einziger fremden Bestandteil nur noch die Expressionskassette für das Transgen trägt (EHV-BAC Transgen kana^S).

Klon wird dann in einem nächsten Schritt der Selektionsmarker wieder ausrekombiniert (2. RED-Rekombination), so dass ein rekombinantes BAC entsteht, das spezifisch nur noch die gewünschte Transgenkassette enthält. Im Falle des EHV-Bacmids erfolgt die Insertion des Transgens in den Leserahmen des gfp-Gens im mini F-Plasmidanteil des Bacmids. Der mini F-Plasmidanteil liegt in der *Unique Short Region* im Bereich des Gens für das nicht-essentielle Glykoprotein 2 (gp2) (siehe Abb. C-1).

Durch Transfektion der Bacmid-DNA in permissive eukaryontische Zellen wird im letzten Schritt des Herstellungsprozesses funktionales Virus produziert. Da die Bacmid-DNA spezifisch aus einem prokaryontischen Klon gewonnen wird, ist eine weitere Aufreinigung der Viren mittels Plaqueaufreinigung nicht notwendig.

C.1.1.2 Aufbau des Transferkonstrukts

Bei dem Transferkonstrukt handelt es sich um ein lineares, doppelsträngiges DNA-Fragment (siehe Abb. C-2). Es enthält eine Expressionskassette für ein gewünschtes Transgen und eine Kanamycinresistenz-Kassette. Die am 5' bzw. 3' befindlichen Bereiche A (46 bp) und B (52 bp) sind homolog zur Bacmidsequenz und vermitteln die gerichtete Insertion des Transgens ins Bacmid mittels homologer RED-Rekombination. Bei dem Bereich C (50 bp) handelt es sich um einen internen homologen Sequenzbereich. Er ist Bestandteil der BGH PolyA-Site und dient der Ausrekonkination der Kanamycinresistenz nach erfolgreicher Insertion des Transferkonstruktins ins Bacmid. Die Ausrekonkination der Kanamycinresistenz-Kassette wird durch Restriktion der Bacmid-DNA an der I-Sce I-Schnittstelle initiiert. Nach Einführung des Doppelstrangbruchs durch Arabinose-induzierte Expression der *Homing* Endonuklease I-Sce I und Anschalten des Rekombinationssystems durch

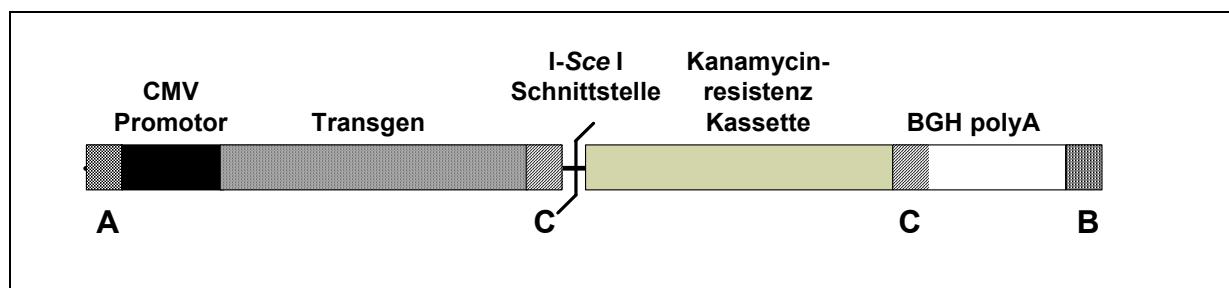


Abb. C-2: Schematische Darstellung eines Transferkonstruktins zum Einbringen von DNA-Sequenzen in das EHV-Bacmid

Das Transferkonstrukt enthält eine Expressionskassette für ein gewünschtes Transgen und eine Kanamycinresistenz. A und B sind homolog zur Bacmidsequenz und vermitteln die gerichtete Insertion des Transferkonstruktins ins Bacmid. C bezeichnet interne homologe Sequenzbereiche, die der Ausrekonkination der Kanamycinresistenz dienen.

Die I-Sce I Schnittstelle ist die Erkennungssequenz für die gleichnamige *Homing* Endonuklease. Durch Schneiden der Bacmid-Sequenz an dieser Stelle wird das Bacmid linearisiert und die Ausrekonkination der Kanamycinresistenz initiiert.

Temperaturerhöhung auf 42 °C kommt es zu einer intramolekularen homologen Rekombination über die internen homologen Sequenzbereiche C, wodurch die Kanamycinresistenz Kassette rückstandsfrei ausrekombiniert wird.

C.1.1.3 Homologe Rekombination

Beide Stufen des Rekombinationsprozesses lassen sich mit Hilfe eines PCR Assays darstellen (siehe Abb. C-3). Die Primer für die PCR sind so gewählt, dass der eine Primer im Transgen und der andere Primer in der Bacmid Sequenz bindet. Ein PCR-Produkt entsteht deshalb nur bei erfolgreicher 1. RED-Rekombination.

Nach Ausrekombination der Kanamycinresistenz-Kassette bei der 2. RED-Rekombination verringert sich die Größe des PCR-Produkts um den Anteil des Selektionsmarkers (1 kB).

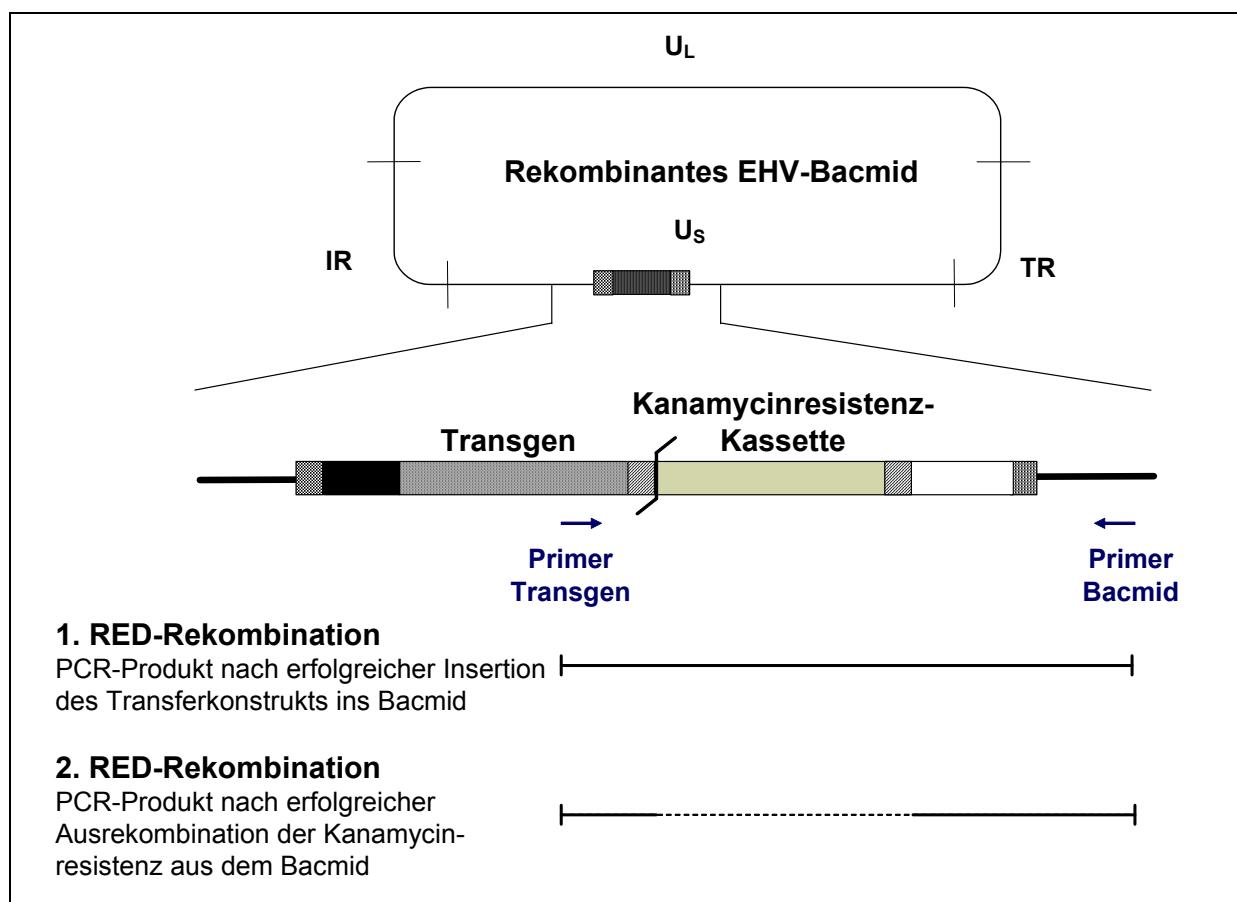


Abb. C-3: Schematischer Überblick zur PCR gestützten Analyse rekombinanter Bacmide

Nach erfolgreicher Integration des Transferkonstruktins ins Bacmid (1. RED-Rekombination) liefern ein Bacmid-spezifischer Primer (Primer Bacmid) und ein Transgen-spezifischer Primer (Primer Transgen) ein definiertes PCR-Produkt. Nach Ausrekombination der Kanamycinresistenz-Kassette (2. RED-Rekombination) ist dieses PCR-Produkt um die Größe der Kanamycinresistenzkassette (1 kb) reduziert (gestrichelter Bereich). Auf diese Weise lassen sich mittels PCR sowohl erfolgreiche Integration des Transferkonstruktins als auch Ausrekombination der Kanamycinresistenz-Kassette darstellen.

U_L: Unique Long Region; U_S: Unique Short Region TR: Terminal Repeat Region; IR: Internal Repeat Region

Im folgenden sind die Ergebnisse für die PCR Analyse der Rekombinationsprozesse exemplarisch für ein EHV-gfp Konstrukt aufgeführt.

C.1.1.3.1 Einbringen des Transferkonstrukts ins Bacmid (1. RED-Rekombination)

Im dargestellten Beispiel wurde eine Expressionskassette für das grün-fluoreszierende Protein (GFP) unter Kontrolle eines CMV-Promotors und einer BGH-PolyA-Site in das bereits zuvor hergestellte EHV-BACmod Konstrukt (nähere Beschreibung siehe Tabelle C-1) eingebracht. Nach erfolgreicher Integration des Transferkonstrukts in die Bacmidsequenz ergibt sich in der PCR-Analyse mit einem Bacmid-spezifischen und einem GFP-spezifischen Primer ein PCR-Produkt mit einer Größe von 2 kB. Von insgesamt 7 untersuchten kanamycinresistenten Klone ergaben 5 Klone in der PCR-Analyse ein PCR-Produkt der entsprechenden Größe (siehe Abb. C-4). Die Spezifität der Banden wurde durch Sequenzierung bestätigt.

Bezüglich der Integration des Transferkonstrukts (1. RED-Rekombination) ergibt sich damit für das dargestellte Beispiel eine Rekombinationseffizienz von 71 %.

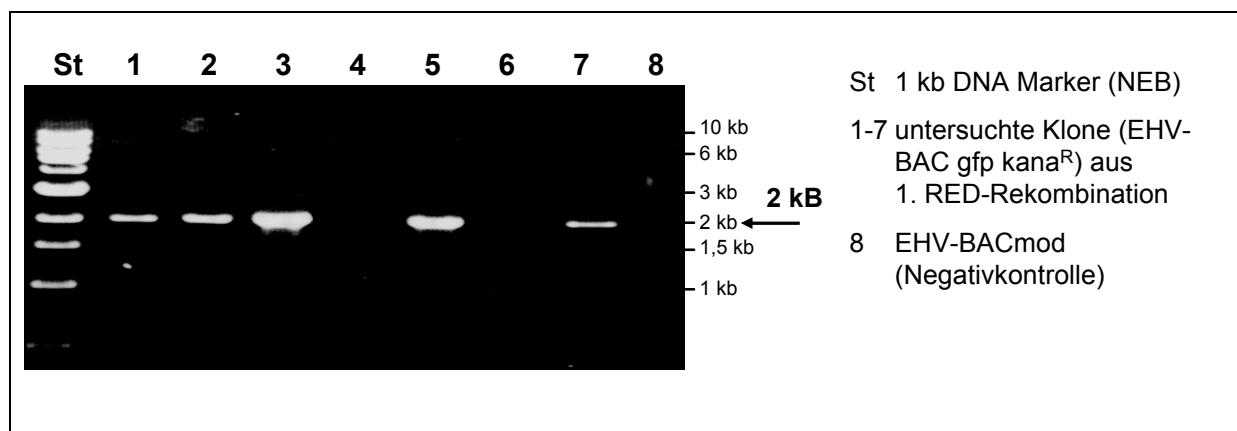


Abb. C-4: Untersuchung auf Integration des Transferkonstrukts (1. RED-Rekombination) ins EHV-Bacmid mittels PCR

Untersucht wurden sieben Kanamycin-resistente Klone (Spur 1-7), von denen fünf die spezifische PCR-Bande in der Größe von 2 kB aufwiesen und somit positiv bezüglich der Integration des Transferkonstrukts sind (Spur 1-3, 5, 7).

Als Ausgangsbasis für die Herstellung des EHVgfp-Bacmids diente ein modifiziertes EHV Bacmid, mit deletierter gfp-Sequenz sowie deletierter SV40 PolyA-Site (EHV-BAC mod)

Auf die gleiche Art und Weise wurden fünf weitere rekombinante Bacmide hergestellt, die jeweils für unterschiedliche Transgene codieren (siehe Tab. C-1) Je nach Konstrukt lag die Effizienz der 1. RED-Rekombination bezüglich der Anzahl positiver Klone zwischen 57 und 100 %.

C.1.1.3.2 Entfernen der Kanamycinresistenz-Kassette aus dem rekombinanten BAC (2. RED-Rekombination)

Zwei positive EHV-BAC gfp kana^R Klone (Klon 1 und 3) aus der 1. RED-Rekombination wurden in die 2. RED-Rekombination eingesetzt. Durch Arabinose-induzierte Expression der *Homing Endonuklease I-SceI* wurden die jeweiligen Bacmide dabei *in vivo* linearisiert und die internen homologen Bereiche für das RED-Rekombinationssystem zugänglich gemacht, so dass es in der Folge zur Ausrekonkombination der Kanamycinresistenz-Kassette kam. Bedingt durch die Ausrekonkombination reduziert sich die Größe des spezifischen PCR-Produkts, das sich mit dem Bacmid-spezifischen und dem GFP-spezifischen Primer ergibt, auf 1 kB.

Zur Identifizierung positiver Rekombinanten und zur Bestimmung der Rekombinationseffizienz der 2. RED-Rekombination wurde die Bacmidsequenz von insgesamt 6 kanamycinsensitiven Klonen mittels PCR-Analyse untersucht. Alle analysierten Klonen wiesen in der PCR eine spezifische Bande in der erwarteten Größe von 1 kB auf und waren damit positiv bezüglich der Ausrekonkombination der Kanamycinresistenz-Kassette (siehe Abb. C-5). Die Spezifität der Banden wurde durch Sequenzierung bestätigt.

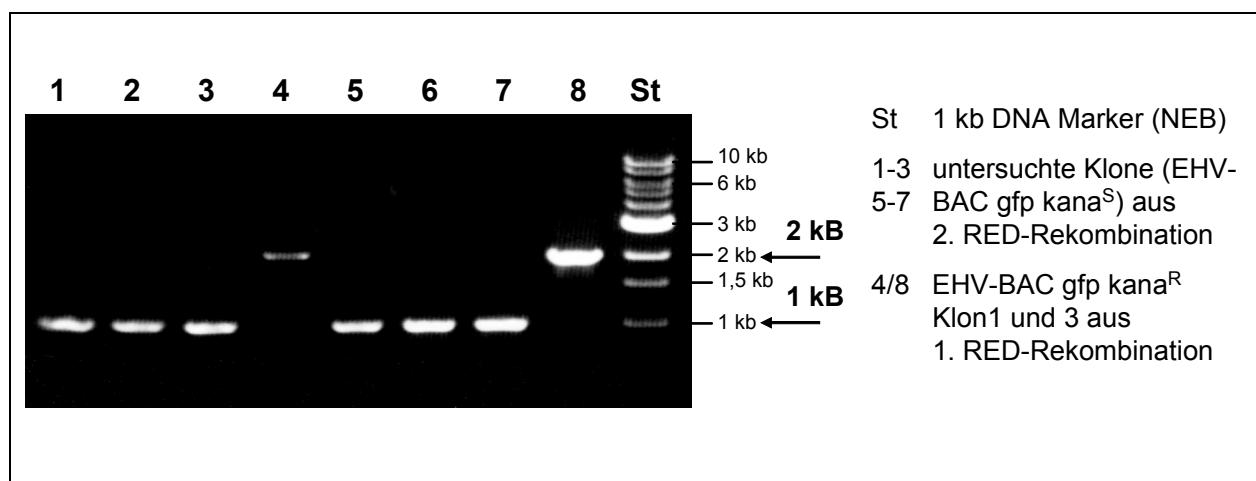


Abb. C-5: Untersuchung auf Ausrekonkombination der Kanamycin-Resistenz (2. RED-Rekombination) aus dem EHV-BAC gfp kana^R mittels PCR

Untersucht wurden je drei Kanamycinsensitive Klonen (Spur 1-3, 5-7), die von zwei unterschiedlichen EHV-BAC gfp kana^R-Vorläuferkonstrukten abstammen (Spur 4,8). Alle untersuchten Klonen sind positiv bezüglich der Ausrekonkombination der Kanamycinresistenz-Kassette und zeigen im Vergleich zum kanamycinresistenten Ausgangskonstrukt eine um 1 kB reduzierte Bande von 1 kb.

Abhängig von dem hergestellten Konstrukt ergab die PCR Analyse für die 2. RED-Rekombination eine Rekombinationseffizienz zwischen 14 und 100 % (siehe Tab. C-1).

C.1.1.4 Überblick rekombinante Bacmide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt sieben Bacmide hergestellt, die für unterschiedliche Transgene codieren.

Bei diesen Transgenen handelt es sich zum einen um die codierende Sequenz für das grün-fluoreszierende Protein (GFP) und im weiteren um verschiedene HIV-1 Antigene (siehe Tab. C-01).

Konstruktname	Effizienz der Rekombination (x/y)		Kurzbeschreibung
	1. RED	2. RED	
EHV-BAC gfp	5/7	6/6	gfp: grün-fluoreszierendes Protein (GFP) (27 kDa) aus <i>Aequorea victoria</i> ; DNA-Sequenz optimiert auf Säugetier-spezifischen Codongebrauch.
EHV-BAC mod	6/9	8/8	Deletion der GFP-Expressionskassette im miniF-Plasmid (GFP-Expressionskassette: CMV-Promotor, gfp-ORF und SV40-PolyA Site)
EHV-BAC IIIBwtgag	5/7	8/8	IIIBwtgag: Gag-Protein (55 kDa) HIV-1 Subtyp B; HIV-spezifischer Codongebrauch.
EHV-BAC IIIBsyngag	6/7	1/7	IIIBsyngag: Gag-Protein (55 kDa) HIV-1 Subtyp B; DNA-Sequenz optimiert auf Säugetier-spezifischen Codongebrauch.
EHV-BAC Cgpn	12/12	1/6	Cgpn: synthetisches Polyprotein GagPolNef (160 kDa) HIV-1 Subtyp B/C; DNA-Sequenz optimiert auf Säugetier-spezifischen Codongebrauch.
EHV-BAC gp120	4/7	1/4	gp120: Glycoprotein 120 (120 kDa) HIV-1 Subtyp B/C mit heterologem ER-Lokalisationssignal tpa (<i>tissue plasminogen activator</i>); DNA-Sequenz optimiert auf Säugetier-spezifischen Codongebrauch
EHV-BAC IIIBgpn	10/14	10/11	IIIBgpn: synthetisches Polyprotein GagPolNef (160 kDa) HIV-1 Subtyp B; DNA-Sequenz optimiert auf Säugetier-spezifischen Codongebrauch.

Tab. C-1: Überblick rekombinante Bacmide

Dargestellt sind die rekombinanten EHV-Bacmide mit einer Kurzbeschreibung des jeweils codierten Transgens. Die Effizienz der Rekombination erschließt sich aus dem Verhältnis positiv auf Insertion des Transgens (1. RED) bzw. Ausrekombination der Kanamycinresistenz-Kassette (2. RED) getester Klonen (x) bezogen auf die Anzahl der jeweils untersuchten Klone (y).

Dabei dienen das EHV-gfp Bacmid und das für das HIV-1 gruppenspezifische Antigen (Gag) codierende EHV-IIIB syngag Bacmid als Reporterkonstrukte für die Charakterisierung und Austestung wichtiger molekularbiologischer und immunologischer Eigenschaften des potentiellen Vektorsystems EHV. Die DNA-Sequenz des IIIBsyngag Transgens ist auf einen Säugetier-spezifischen Codongebrauch optimiert, wodurch eine starke, konstitutive Expression des Gag-Proteins ermöglicht wird. Im Gegensatz dazu steht das EHV IIIBwtgag Bacmid. Das enthaltene Transgen wtgag codiert zwar auch für HIV-1 Gag, hat aber im Gegensatz zu dem syngag Konstrukt einen HIV-1 spezifischen Codongebrauch. Die dadurch bedingten AU-reichen Sequenzabschnitte destabilisieren die wtgag-mRNA und führen zu ihrer schnellen Degradation. Nur in Anwesenheit des HIV-1 RNA Transporterproteins REV und spezifischer, in der verwendeten wtgag-Sequenz nicht enthaltener RNA-Strukturelemente wird die RNA aus dem Kern ins Cytoplasma transportiert und das Gag-Protein exprimiert (Graf *et al.*, 2000). Das Rational für die Generierung von wtgag und syngag EHV Konstrukten war die Bestätigung früherer Ergebnisse der Arbeitsgruppe, dass die Anpassung eines HIV-Transgens an den Säugetier-spezifischen Codongebrauch sich positiv auf die Proteinexpression und die Stärke der im Tiermodell induzierten Immunantworten auswirkt (Graf *et al.*, 2004). Darüber hinaus sind Methodik und Reagenzien zum Auslesen von Gag-Expression und Gag-spezifischen Immunantworten in der Arbeitsgruppe gut etabliert, was Gag zu einem idealen Reporterkonstrukt für die Evaluierung von EHV-1 als Vektorsystem macht.

Um einen Vergleich zwischen EHV-1 und bereits gut etablierten Vektorsystemen (wie z.B. NYVAC oder MVA) ziehen zu können, wurden im weiteren EHV-Bacmide hergestellt, die für potentielle HIV-1 Vakzinekandidaten codieren. Dazu gehören das für das Polyprotein GagPolNef (gpn) codierende EHV-Cgpn Bacmid und das für das HIV-1 *Envelope* Protein (gp120) codierende EHV-gp120 Bacmid. Entsprechende rekombinante NYVAC und MVA befinden sich zur Zeit in der klinischen Testung (Harari *et al.*, 2008) und lassen damit einen unmittelbaren Vergleich zu den EHV-Konstrukten zu.

Die verwendeten Transgene Cgpn und gp120 haben einen Säugetier-spezifischen Codongebrauch und werden konstitutiv exprimiert. Der genetische Hintergrund der beiden Konstrukte entspricht dem chimären C/B-Typ HIV-1 Isolat CN54, das in China isoliert wurde und im asiatischen Raum eine der vorherrschenden Virusvarianten darstellt (Su *et al.*, 2000). Erweitert wird das Set an viralen Konstrukten schließlich noch durch ein EHV-IIIBgpn Bacmid, das wie das EHV-Cgpn Bacmid für ein konstitutiv exprimiertes GagPolNef Transgen codiert, vom genetischen Hintergrund allerdings wie das wtgag und syngag Konstrukt einer Subtyp B HIV-1 Chimäre der Isolate HXB2 und BH10 entspricht (Ratner *et al.*, 1987).

Das Bacmid EHV-BACmod, in dem die gfp-Expressionskassette aus dem miniF-Plasmid deletiert wurde, hat für die Erhebung von Expressions- bzw. immunologischen Daten keine

Relevanz, sondern stellt lediglich ein Hilfskonstrukt zur Herstellung eines neuen, genetisch stabilen EHV-gfp Bacmids dar (siehe dazu auch Kapitel C.1.2).

C.1.2 Stabilität der viralen Konstrukte

Untersuchungen zur Expression des Transgens in infizierten Zellen mittels *Western Blot* Analyse zeigten, dass abhängig von der verwendeten Virus-Charge starke Unterschiede in der Expressionsstärke des Transgens bis hin zu einem fast vollständigen Verlust der Transgenexpression auftraten (siehe Abb. C-6).

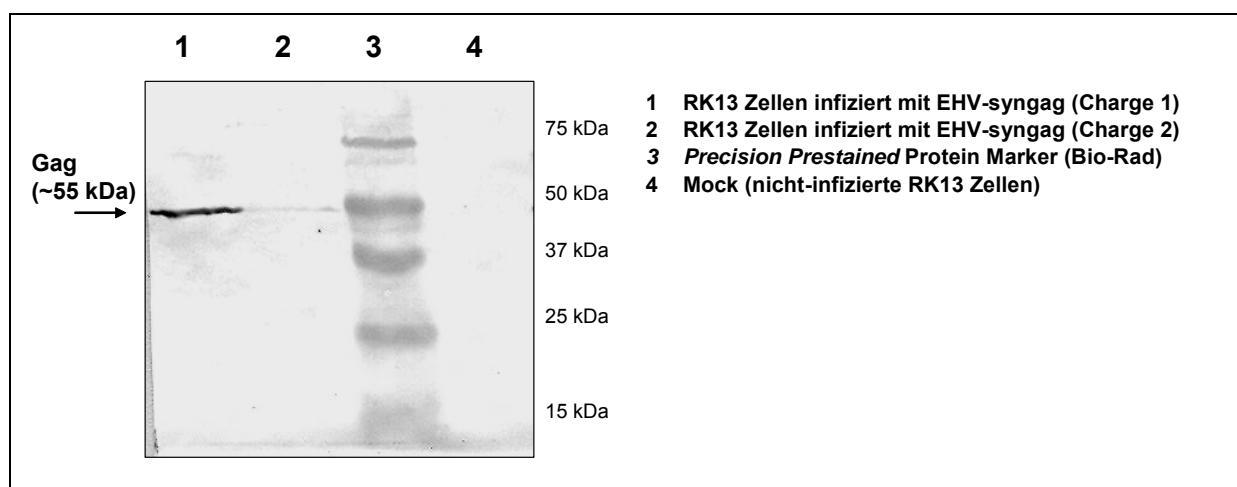


Abb. C-6: Western Blot Analyse von RK13 Zellen nach Infektion mit unterschiedlichen EHV-syngag Chargen

RK13 Zellen wurden mit EHV-syngag MOI 1 infiziert und 10 h nach Infektion geerntet. 100 µg Gesamtprotein wurden mittels Gelelektrophorese auf einem 12,5 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Gag-Expression unter Verwendung eines Gag-spezifischen Antikörpers (13/5) im *Western Blot* untersucht. Abhängig von der eingesetzten Virus-Charge ergibt sich eine deutliche Gag-spezifische Bande in Höhe von 55 kDa (Spur 1) bzw. ein fast vollständiger Verlust der Expression (Spur 2).

Die wahrscheinlichste Ursache für dieses Phänomen sind genetische Instabilitäten der viralen Konstrukte, die auf intramolekularen homologen Rekombinationsereignissen beruhen.

So besteht die Expressionskassette in der ersten Generation rekombinanter Viren aus dem offenen Leserahmen des Transgens, einem CMV-Promotor und einer SV40-PolyA-Site. Eine weitere SV40 PolyA-Site befindet sich hinter dem 5' aufwärts gelegenen Selektionsmarker Guaninphosphoribosyltransferase (gpt). Eine homologe Rekombination zwischen diesen beiden Bereichen würde zur Ausrektion des Transgens führen und den im *Western Blot* beobachteten Expressionsverlust erklären (siehe Abb. C-7).

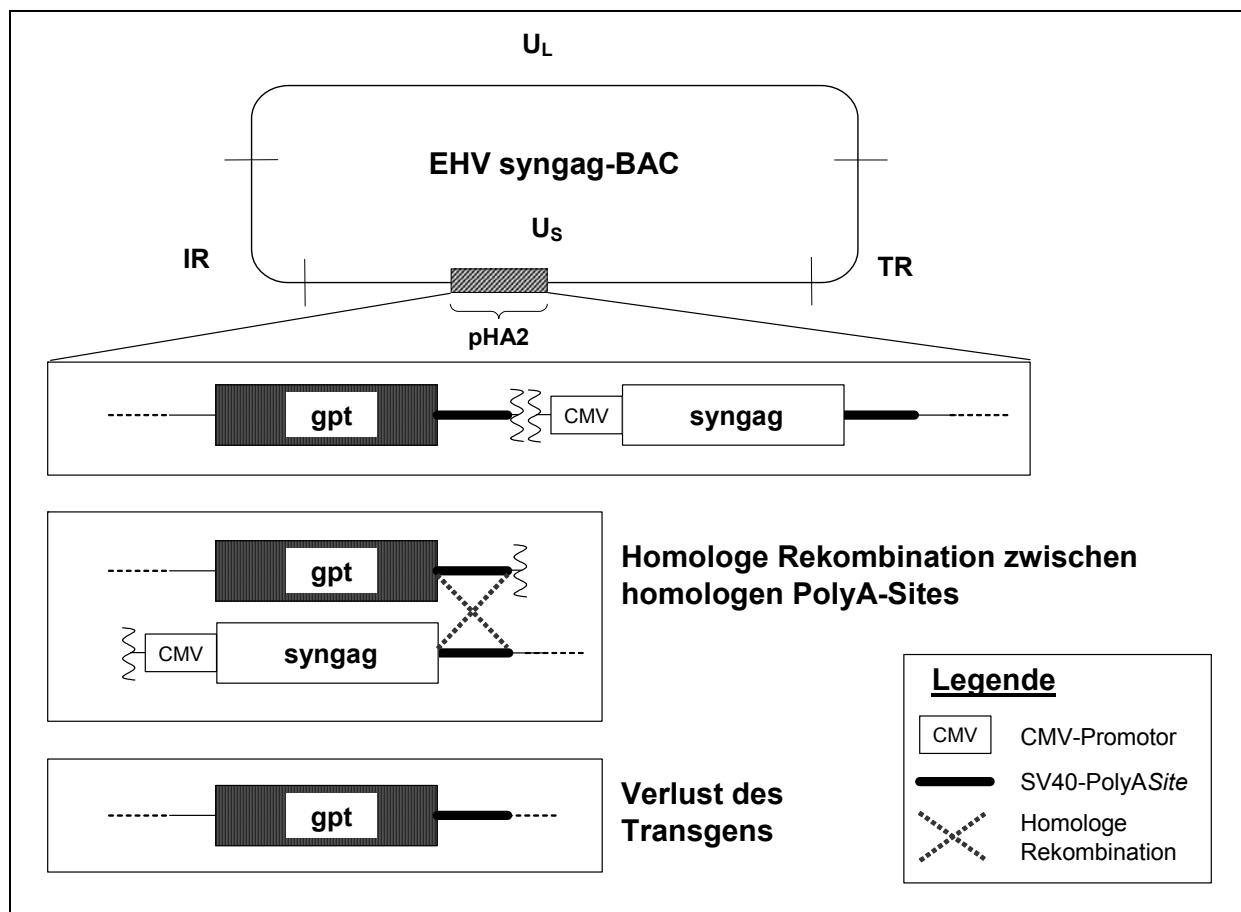


Abb. C-7: Mechanismus der Ausrekonkination des Transgens aus dem EHV-Bacmid

Die Integration des Transgens ins Bacmid erfolgt über homologe Rekombination in das miniF-Plasmid (pHA2). In der ersten Generation der hergestellten Bacmide besteht die Expressionskassette aus der Gensequenz des Transgens unter Kontrolle eines CMV-Promotors und einer SV40-PolyA Site. Eine weitere SV40 PolyA-Site findet sich hinter dem 5' aufwärts gelegenen Selektionsmarker Guaninphosphoribosyltransferase (gpt). Eine homologe Rekombination zwischen diesen beiden Bereichen führt zur Ausrekonkination des Transgens und Expressionsverlust.

U: Unique Long Region; U_S: Unique Short Region TR: Terminal Repeat Region; IR: Internal Repeat Region

Diese Hypothese wurde mit einem PCR basierten Assay überprüft. Dafür wurden zwei Primerpaare generiert, die je nach Sequenzzustand spezifische PCR-Produkte liefern. Liegt keine Ausrekonkination des Transgens vor entsteht ein PCR-Produkt mit einer Größe von 446 bp und ein theoretisches PCR-Produkt mit einer Größe von 8300 bp, das aufgrund der gewählten PCR-Bedingungen jedoch nicht gebildet werden kann. Bei vollständiger Ausrekonkination entsteht nur ein PCR-Produkt mit einer Größe von 330 bp. Liegt eine teilweise Ausrekonkination des Transgens vor, entstehen sowohl das 330 bp als auch das 446 bp umfassende PCR-Produkt.

Die Untersuchung viraler DNA aus infizierten Zellen ergab, dass bei allen rekombinanten Viren der ersten Generation eine teilweise Ausrekonkination des Transgens durch homologe Rekombination der SV40 PolyA-Sites vorlag (siehe Abb. C-8). Dies wurde sowohl durch die Größe als auch durch die Sequenz der auftretenden PCR-Produkte belegt.

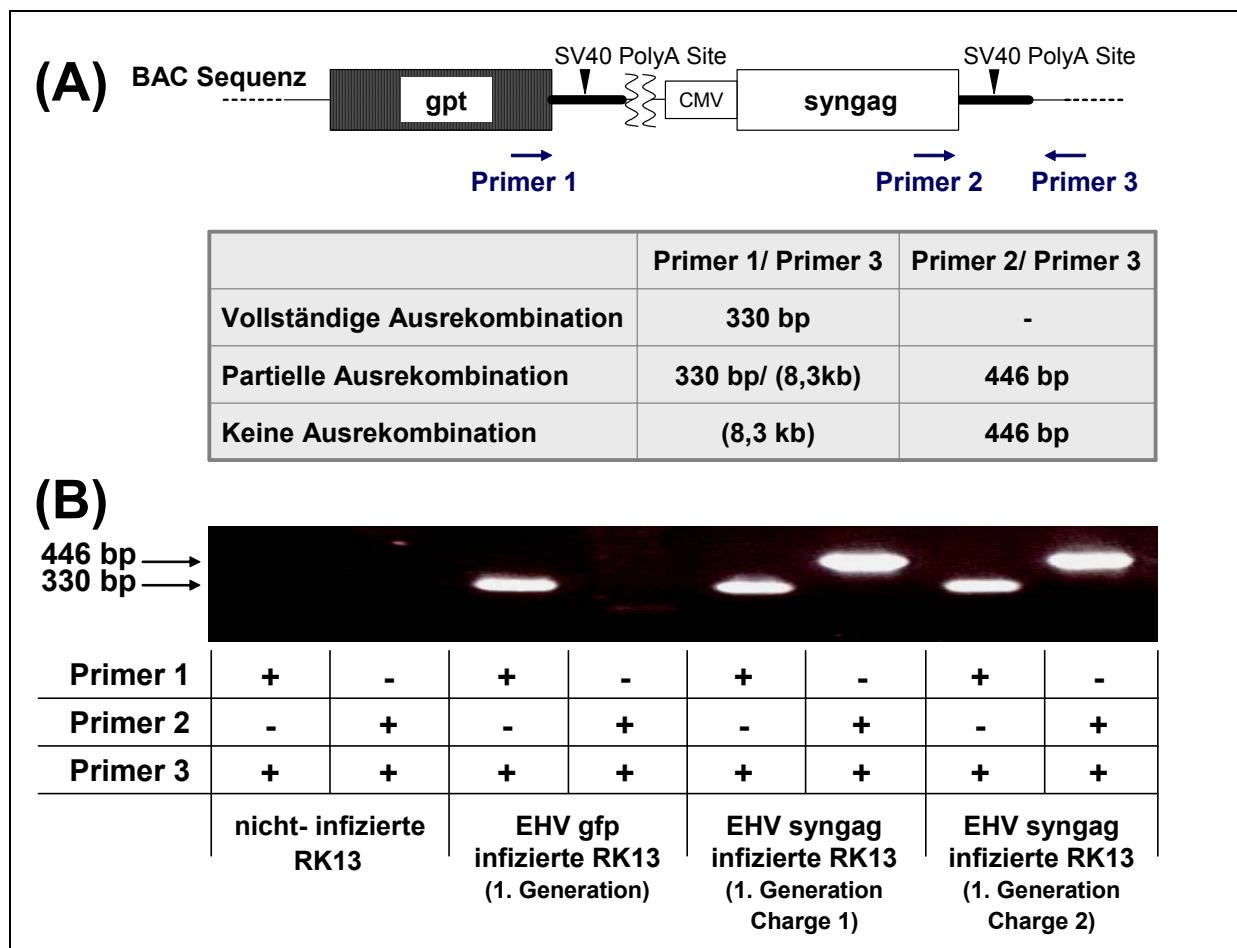


Abb. C-8: PCR-Analyse unterschiedlicher EHV-syngag Chargen der ersten Generation auf Ausrekombination des Transgens

(A) Dargestellt sind die Primer-Bindungsstellen im EHV-syngag Bacmid und die erwarteten PCR-Produkte im Falle von kompletter, teilweiser oder keiner Ausrekombination des Transgens durch homologe Rekombination der zwei SV40 PolyA-Sites.

(B) RK13-Zellen wurden mit EHV-syngag MOI 1 infiziert und 16 h nach Infektion geerntet. Virale DNA wurde präpariert und 1 ug DNA für die anschließende PCR-Analyse eingesetzt. Alle untersuchten EHV-syngag Chargen zeigen eine teilweise Ausrekombination des Transgens.

Als Negativkontrolle für Primer 1-3 dienen nicht infizierte RK13-Zellen. Als Negativkontrolle für den Gag-spezifischen Primer 2 dienen EHV-gfp infizierte RK13 Zellen. Größe und Sequenz des PCR-Produkts für EHV-gfp infizierte RK13 mit den Primern 1 und 3 zeigen, dass bei den EHV-gfp Viren der ersten Generation eine Ausrekombination des Transgens auftritt.

Primer 1: pRacH_gpt_fw; Primer 2: IIIB syngag 1456fw; Primer 3: Racd71_pf_260503 (siehe auch Tabelle B-3)

In einer zweiten Generation von Viren wurde deshalb die SV40 PolyA-Site im Transferkonstrukt durch eine BGH PolyA-Site ersetzt. Die derartig veränderten Viren weisen unabhängig von der verwendeten Virus-Charge eine starke Expression des Transgens auf und zeigen im PCR-Assay nur die Bande, die entsteht, wenn keine Ausrekombination des Transgens vorliegt (siehe Abb. C-9).

Alle weiteren Experimente wurden deshalb mit rekombinanten Viren durchgeführt, in denen die ursprüngliche SV40 PolyA-Site durch eine BGH PolyA-Site ersetzt wurde.

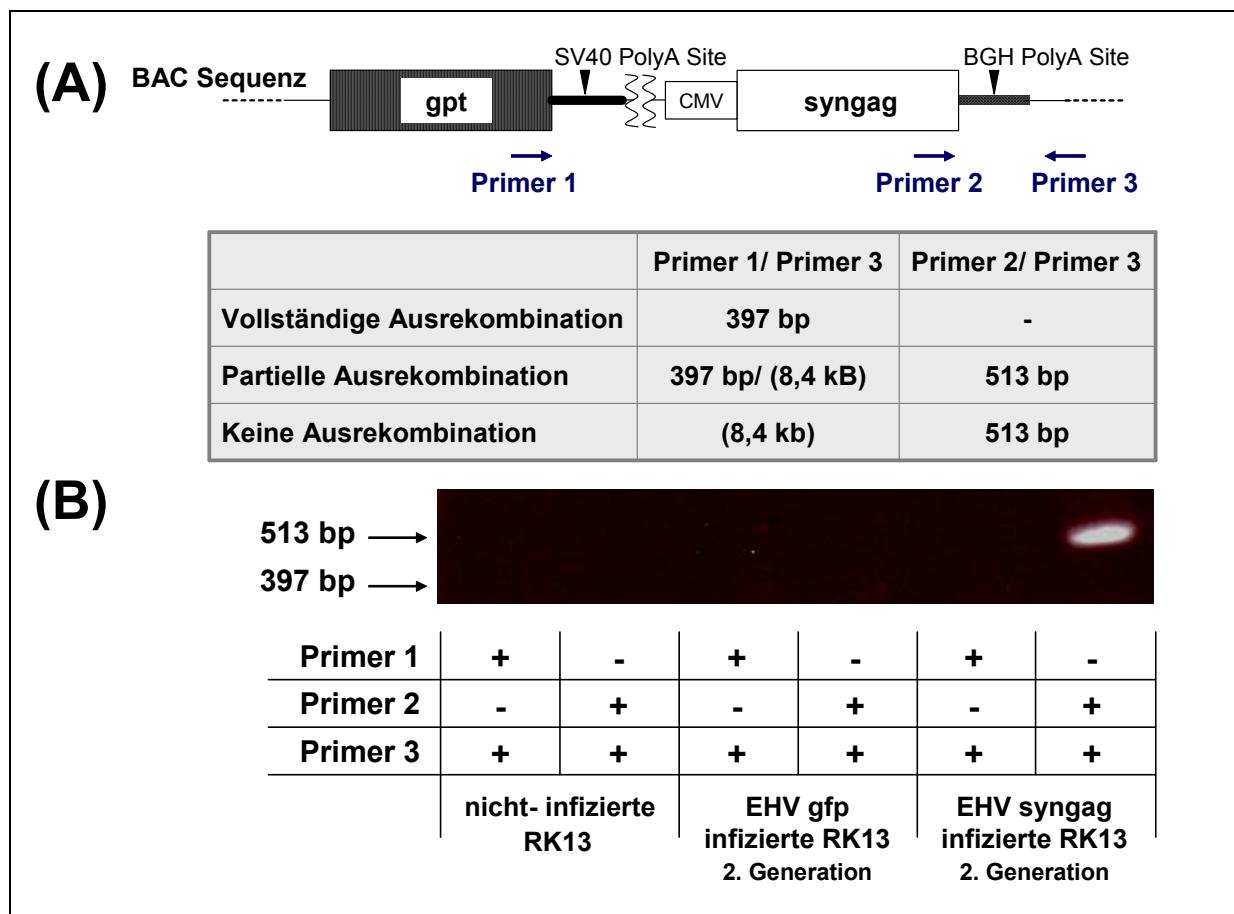


Abb. C-9: PCR-Analyse unterschiedlicher EHV Chargen der zweiten Generation auf Ausrekombination des Transgens

(A) Dargestellt sind die Primer-Bindungsstellen im Bacmid und erwartete PCR-Produkte im Falle von kompletter, teilweiser oder keiner Ausrekombination des Transgens im Bereich der beiden unterschiedlichen PolyA-Sites.

(B) RK13-Zellen wurden mit EHV-syngag oder EHV-gfp MOI 1 infiziert und 16 h nach Infektion geerntet. Virale DNA wurde präpariert und 1 µg DNA für die anschließende PCR-Analyse eingesetzt. Die untersuchte EHV-syngag Charge ist stabil und zeigt keine Ausrekombination des Transgens. Als Negativkontrolle für Primer 1-3 dienen nicht infizierte RK13-Zellen. Als Negativkontrollen für den gag-spezifischen Primer 2 dienen EHV-gfp infizierte RK13 Zellen. Die Abwesenheit eines PCR-Produkts für EHV-gfp infizierte RK13 mit den Primern 1 und 3 zeigt, dass die EHV-gfp Viren der zweiten Generation im untersuchten Bereich ebenfalls keine Ausrekombination mehr aufweisen.

Primer 1: pRacH_gpt_fw; Primer 2: IIIB syngag 1456fw; Primer 3: Racd71_pf_260503 (siehe auch Tabelle B-3)

C.1.3 Verifizierung rekombinanter Viren

C.1.3.1 *Southern Blot Analyse bestätigt erfolgreiche Integration des Transgens in das EHV Bacmid*

Zur Verifizierung wurden die rekombinanten Bacmid Konstrukte auf ihr spezifisches Restriktionsmuster hin untersucht und mittels *Southern Blot* die Integration des Transgens sowie Ausrekombination der Kanamycinresistenz-Kassette überprüft. Im folgenden sind die Ergebnisse für das EHV-BAC IIIBsyngag Konstrukt exemplarisch dargestellt.

Bacmid DNA von dem Wildtyp EHV-BAC, dem kanamycinresistenten Intermediat EHV-BAC IIIBsyngag kana^R sowie dem finalen EHV-BAC IIIBsyngag kana^S wurde mit der Restriktionsendonuklease *Dra*I spezifisch geschnitten und auf einem Agarosegel analysiert. Im Anschluss wurde die DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen und mittels einer IIIBsyngag-spezifischen DIG-markierten Sonde auf Integration des Transgens untersucht. IIIBsyngag-spezifische Banden treten nur für Bacmide auf, die IIIB-syngag als Transgen enthalten. Dabei ist die Bande für das kanamycinresistente Intermediat

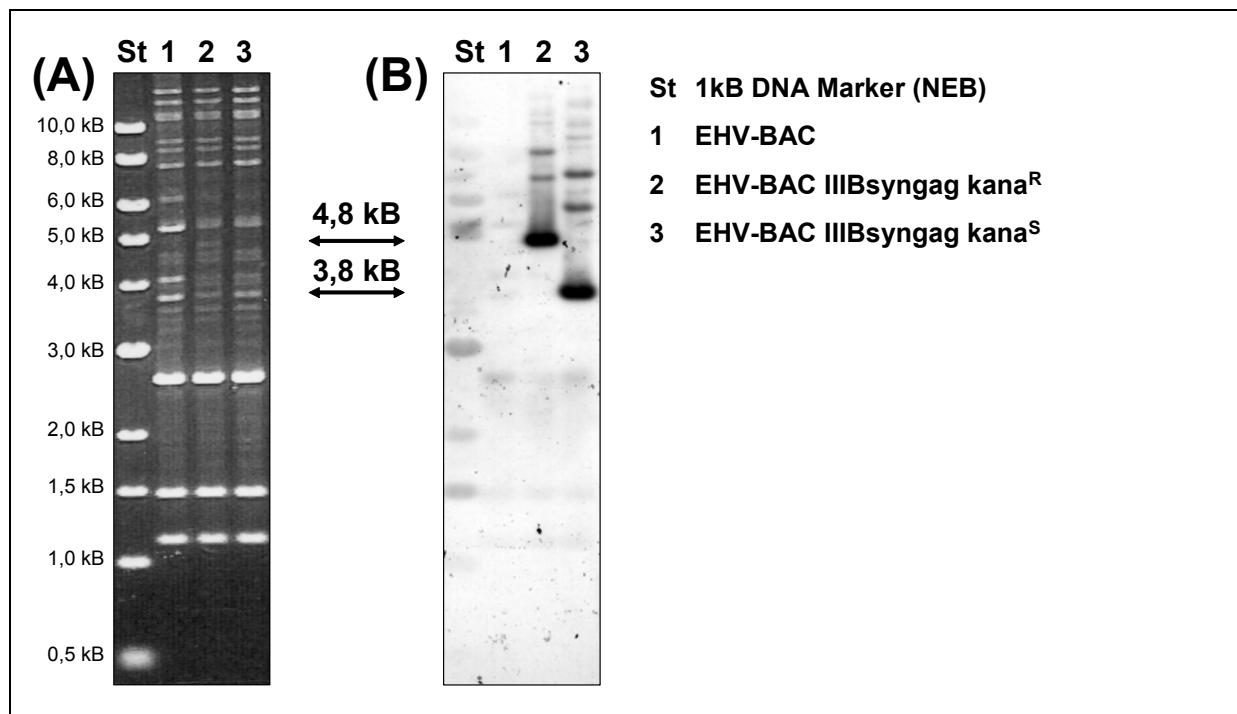


Abb. C-10: Verifizierung von rekombinanten EHV-Bacmiden mittels spezifischem Restriktionsmuster und *Southern Blot* Analyse (exemplarisch dargestellt am Beispiel von EHV-BAC IIIBsyngag)

(A) BAC-DNA wurde aus dem Bakterienstamm EL250 isoliert, je 10 µL wurden mit dem Restriktionsenzym *Dra*I fragmentiert und mittels Gelelektrophorese auf einem 0,8 % Agarose-Gel aufgetrennt. Unterschiede im Restriktionsmuster sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

(B) *Southern Blot* Analyse von rekombinantem EHV-BAC mit DIG-markierter IIIB-syngag-spezifischer Sonde. Der Blot zeigt spezifische Banden für EHV-Bacmide, die IIIB-syngag als Transgen enthalten. Für das kanamycinresistente Intermediat EHV-BAC IIIBsyngag kana^R ist diese Bande um 1 kB größer als für das finale kanamycininsensitive EHV-BAC IIIBsyngag kana^S Konstrukt. Dieser Unterschied entspricht der Größe der Kanamycinresistenz-Kassette und bestätigt ihre Ausrekombination während der 2. RED-Rekombination (St: DNA Größenstandard 1kb *ladder* New England Biolabs (NEB), Frankfurt)

EHV-BAC IIIBsyngag kana^R um ca. 1 kB größer als für den finalen EHV-BAC IIIBsyngag kana^S. Der Größenunterschied ergibt sich durch die Ausrekonstruktion der Kanamycinresistenz-Kassette während der 2. RED-Rekonstruktion. Die Restriktionsendonuklease zur Fragmentierung der Bacmid-DNA wurde so gewählt, dass Transgen und Resistenzkassette auf demselben DNA-Fragment liegen. Nach Ausrekonstruktion der Resistenz-Kassette, die eine Größe von 1 kB hat, verkleinert sich das spezifische DNA-Fragment dementsprechend um diese Größe (siehe Abb. C-10).

C.1.3.2 *Mit rekombinantem EHV infizierte Zellen zeigen gute Expression des viralen Transgens*

Zur weiteren Verifizierung wurden die rekombinanten Viren hinsichtlich der Transgenexpression untersucht. Dafür wurden im *Western* Blot infizierte RK13 Zellen analysiert. Im folgenden sind die Ergebnisse für EHV-gfp und EHV-syngag exemplarisch dargestellt.

Zelllysate infizierter RK13 Zellen zeigen entsprechend des eingesetzten viralen Viruskonstrukts im *Western* Blot Gag- bzw. GFP-spezifische Banden. Dasselbe Bandenmuster ergibt sich für Zelllysate von RK13 Zellen, die mit entsprechenden DNA Konstrukten transfiziert wurden und als Positivkontrolle fungieren. Nicht-infizierte Zellen dienen als Negativkontrolle und weisen keine spezifischen Banden im *Western* Blot auf. Der Nachweis von β -Actin im *Western* Blot zeigt, dass gleiche Proteinmengen eingesetzt wurden (siehe Abb. C-11).

Die Expression der viralen Transgene war in allen durchgeführten *Western* Blots unabhängig von der eingesetzten Viruscharge vergleichbar stark.

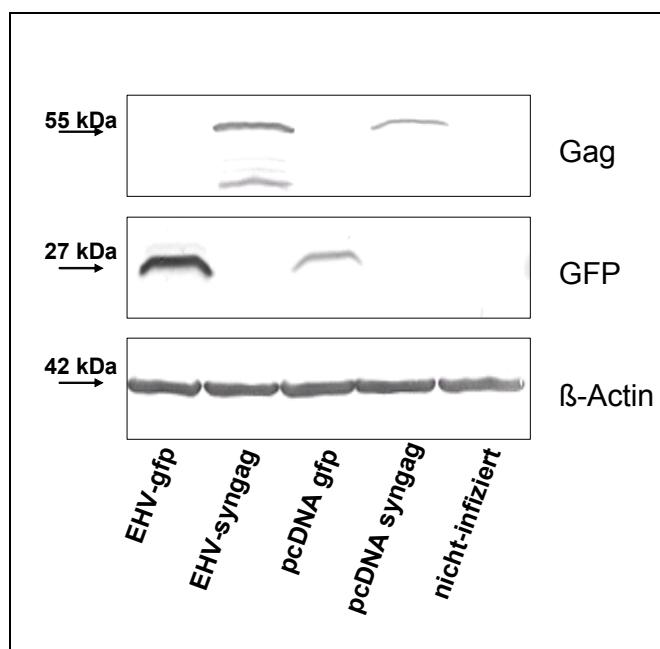


Abb. C-11 : Nachweis von Transgen-Expression verschiedener rekombinanter EHV-Konstrukte mittels *Western* Blot Analyse

RK13 Zellen wurden mit den angegebenen Viren infiziert (MOI 1) bzw. mit den angegebenen DNA-Plasmiden transfiziert. 24 h nach Infektion und 48 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet. 50 μ g Gesamtprotein wurden mittels 12,5 % SDS-PAGE aufgetrennt und im *Western* Blot mit spezifischen Antikörpern auf Gag-, GFP- und β -Actin-Expression untersucht.

RK13 Zellen exprimieren die spezifischen viralen Transgene Gag und GFP nach Infektion mit den entsprechenden rekombinanten Viren. Mit DNA transfizierte Zellen dienten als Spezifitätskontrolle für die jeweiligen Antikörper. Der Nachweis von β -Actin diente als Ladekontrolle für die eingesetzte Proteinmenge.

C.1.3.3 *Southern und Western Blot Analyse der rekombinanten EHV im Überblick*

Nachdem in den vorhergehenden Kapiteln die Verifizierung der rekombinanten EHV exemplarisch am Beispiel von EHV-gfp und EHV-syngag ausführlich dargestellt wurde, sind in Abb. C-12 die Daten für die übrigen synthetisierten Bacmide bezüglich Integration der Transgenkassette, Ausrekombination der Kanamycinresistenz sowie Expression des Transgens zusammengefasst.

Die Integration der Transgenkassette sowie die Ausrekombination der Kanamycinresistenz-Kassette wurden mittels *Southern Blot* Analyse bestätigt. Dafür wurde jeweils DNA von dem EHV-BACgfp, dem kanamycinresistenten rekombinanten Intermediat sowie von dem jeweiligen finalen kanamycinsensitiven, rekombinanten EHV-BAC analysiert. Die DNA wurde mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease spezifisch geschnitten, die DNA-Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt, auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen und mittels einer Transgen-spezifischen DIG-markierten Sonde auf Integration des Transgens untersucht (Herstellung der DIG-markierten DNA-Sonden siehe Kapitel B.2.2.4). Die verwendete Restriktionsendonuklease zur Fragmentierung der Bacmid-DNA wurde dabei so gewählt, dass Transgen und Kanamycinresistenz-Kassette auf demselben DNA-Fragment liegen. Nach Ausrekombination der Resistenz-Kassette, die eine Größe von ca. 1 kB hat, verkleinert sich das spezifisch detektierte DNA-Fragment für das kanamycinsensitive, finale EHV-Konstrukt entsprechend.

Die für EHV-BAC Cgpn/ IIIBgpn/ gp120/ IIIBwtgag/ IIIBsyngag gewonnenen Daten zeigen, dass spezifische Banden in der erwarteten Größe nur für Bacmide auftreten, die das jeweilige Transgen auch enthalten. Dabei ist die Bande für das kanamycinresistente Intermediat wie erwartet in allen Fällen um ca. 1 kB größer als die des finalen, kanamycinsensitiven EHV-BAC (siehe auch Abb. C-12 A). Auf diese Weise konnte für alle untersuchten Bacmide die Integration der Transgenkassette sowie die anschließende Ausrekombination der Kanamycinresistenz-Kassette belegt werden. Durch anschließende Sequenzierung der Transgensequenz und des umliegenden Bereichs wurden diese Ergebnisse weiter abgesichert.

Der Nachweis der Expression des jeweiligen Transgens erfolgte im *Western Blot*. Dafür wurden RK13 Zellen mit den jeweiligen rekombinanten Viren (MOI 1) infiziert bzw. mit entsprechenden DNA-Plasmiden transfiziert (nur für syngag- und wtgag-Konstrukte). 24 h nach Infektion und 48 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet, 50 µg Gesamtprotein wurden mittels 7,5 % (EHV-Cgpn/ IIIBgpn/ gp120) bzw. 12,5 % (EHV-wtgag/syngag) SDS-PAGE aufgetrennt und im *Western Blot* mit Transgen-spezifischen Antikörpern analysiert (siehe dazu Auflistung B1.4.1).

Die *Western Blot*-Daten zeigen, dass die Transgene Cgpn, IIIBgpn, gp120 und IIIBsyngag in infizierten Zellen sehr gut exprimiert werden. Für EHV-wtgag lässt sich nach Infektion jedoch

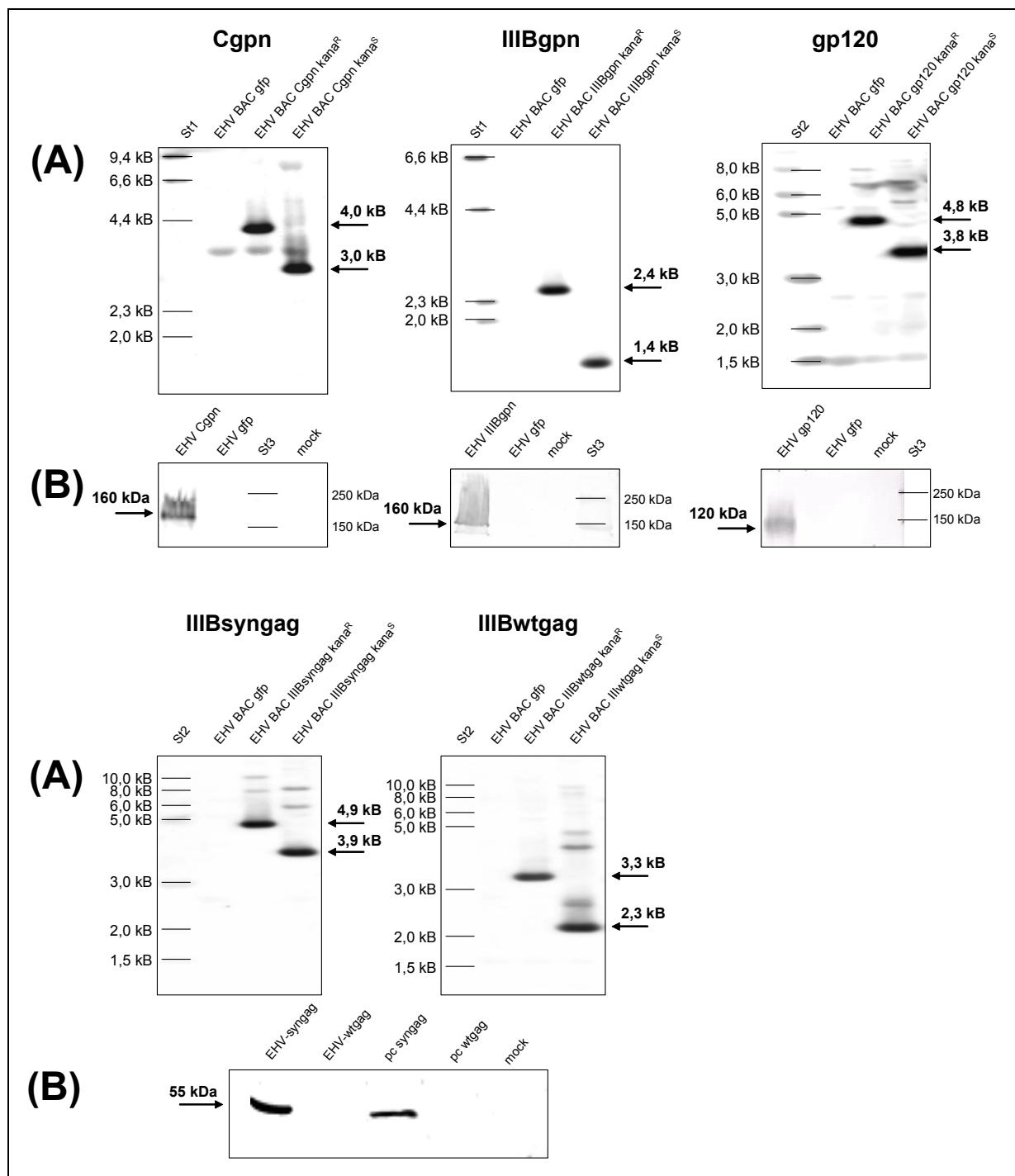


Abb. C-12: Southern und Western Blot Analyse der rekombinanten EHV im Überblick

(A) Verifizierung rekombinanter Bacmid-DNA mittels *Southern Blot Analyse*; Je 10 µL Bacmid DNA wurden mit dem Restriktionsenzym *Dra*I (EHV BAC gp120/ III Bsyngag/ III Bwtgag) bzw. *Bgl*II (EHV BAC III Bgpn/Cgpn) fragmentiert, mittels Gelektrophorese auf einem 0,8 % Agarose-Gel aufgetrennt und mit Transgen-spezifischen Sonden im *Southern Blot* analysiert (Herstellung der DIG-markierten Sonden siehe auch B.2.2.4) Die für das jeweilige Transgen spezifischen Banden sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

(B) Nachweis von Transgen-Expression unterschiedlicher rekombinanter EHV mittels *Western Blot Analyse*; RK13 Zellen wurden mit den angegebenen Viren infiziert bzw. mit entsprechenden DNA-Konstrukten (pc-wttag transzisiert. 24 h nach Infektion und 48 h nach Transfektion wurden die infizierten bzw. transzistierten Zellen geerntet. 50 µg Gesamtprotein wurden mittels 7,5-12,5 % SDS-PAGE aufgetrennt und im *Western Blot* mit einem Transgen-spezifischen Antikörper (Auflistung siehe Kapitel B.1.4.1) hinsichtlich der Expression des Transgens untersucht (mock. nicht infizierte Zellen)

St1: DIG-markierter DNA Größenstandard II (Roche, Mannheim); St2: DNA Größenstandard 1 kb ladder (NEB, Frankfurt); St3: *Precision Prestained Protein Marker* (BioRad)

keine Gag-Expression nachweisen. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen früherer Arbeiten der Arbeitsgruppe, in denen gezeigt worden war, dass wtgag-mRNA bedingt durch seinen HIV-spezifischen Codongebrauch viele AU-reichen Sequenzabschnitte enthält, die die RNA destabilisieren und für ihre rasche Degradation sorgen. Die Expression des wtgag Konstrukts ist deshalb abhängig, vom Vorhandensein des HIV-1 RNA Transporterproteins REV, das an die mRNA bindet, diese stabilisiert und ihren aktiven Transport ins Cytoplasma vermittelt (Graf *et.al.*, 2000).

C.2 In vivo Applikation rekombinanter Viren

C.2.1 Rekombinantes EHV induziert in niedrigen Dosen über verschiedene Applikationswege gute Transgen-spezifische zelluläre Immunantworten

Zur Austestung der immunogenen Eigenschaften von EHV *in vivo*, wurden zunächst BALB/c Mäuse mit verschiedenen rekombinanten EHV-Konstrukten (EHV-gfp, EHV-wtgag, EHV-syngag) immunisiert, die über verschiedene Applikationsrouten verabreicht wurden. Alle Mäuse, abgesehen von der Negativkontrollgruppe, erhielten drei Immunisierungen. Einer Grundimmunisierung folgte nach sechs Wochen eine erste und nach neun Wochen eine zweite *Booster*-Immunisierung. Zehn Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Milzen entnommen, jeweils drei Milzen der sechs Versuchstiere pro Gruppe gepoolt und Gag-spezifische zelluläre Immunantworten mittels FACS Analyse bestimmt (siehe Abb. C-13). Dafür wurden je 2×10^6 Splenozyten für 6 h mit einem Gag-spezifischen A9I Peptid, einem unspezifischen V3 Peptid oder nur mit Medium behandelt und im Anschluss die Oberflächenmarker CD8 und CD4 sowie intrazelluläres Interferon γ mit spezifischen, Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert. Der Anteil $\text{IFN}\gamma^+ \text{CD8}^+$ -Zellen, der nach Stimulation mit dem Gag-spezifischen Peptid (A9I) auftritt, ist ein Maß für die Stärke der Gag-spezifischen, zellulären Immunantwort. Die Stimulationen mit unspezifischem Peptid oder reinem Medium dienten als interne Negativkontrollen der jeweiligen Mausgruppe. Mäuse, die mit einem DNA IIIIBsyngag Konstrukt (pc-syngag) behandelt wurden, fungierten als Positivkontrolle (siehe Abb. C-13; Mausgruppe 14), nicht immunisierte bzw. mit EHV-gfp infizierte Tiere als Negativkontrolle bezüglich der Induktion Gag-spezifischer Immunantworten (siehe Abb. C-13; Mausgruppe 12, 13).

Die Auswertung der Daten zeigt, dass sich statistisch signifikante Gag-spezifische Immunantworten nach nasaler, intravenöser, intramuskulärer, intraperitonealer und subkutaner Applikation von EHV-syngag schon ab einer sehr geringen Immunisierungsdosis von 10^4 infektiösen Einheiten ergeben (siehe Abb. C-13; Mausgruppe 1, 2, 5, 6, 7, 8). Im Falle einer nasalen Applikation von EHV-syngag kann die Immunisierungsdosis sogar bis auf 10^2 infektiöse Einheiten abgesenkt werden (siehe Abb. C-13; Mausgruppe 3).

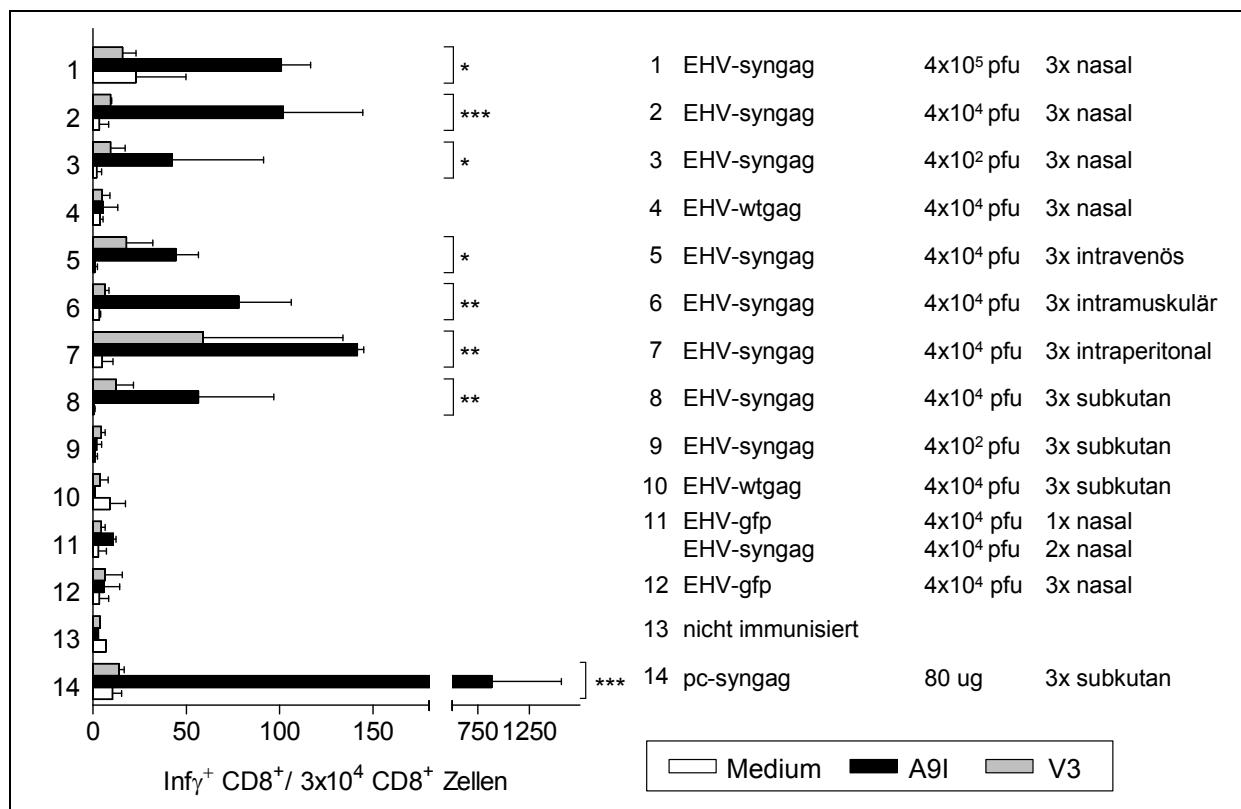


Abb. C-13: Gag-spezifische, zelluläre Immunantworten nach Verabreichung von rekombinantem EHV über unterschiedliche Applikationsrouten

2x10⁶ Splenozyten wurden für 6 h mit einem Gag-spezifischen A9I Peptid, einem unspezifischen V3 Peptid oder ohne Peptid (Medium) behandelt. Im Anschluss wurde die Anzahl CD8⁺/IFN γ ⁺ Zellen pro 30 000 CD8⁺ Zellen mittels FACS Analyse bestimmt.

Mäuse, denen ein DNA-syngag Konstrukt dreimal subkutan appliziert worden war, dienten als Positivkontrolle (Gruppe 14). Mäuse, die nicht oder mit EHV-gfp immunisiert worden waren, fungierten als Negativkontrolle (Gruppe 12, 13).

* signifikant (0,01 < P ≤ 0,05); ** hoch signifikant (0,001 ≤ P ≤ 0,01), *** höchstsignifikant (P < 0,001)

In Übereinstimmung mit früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe wurden unabhängig von der gewählten Applikationsroute keine statistisch signifikanten, Gag-spezifischen Immunantworten induziert, wenn anstelle von EHV-syngag mit EHV-wtgag immunisiert wurde (siehe Abb. C-13; Mausgruppe 4, 10). Dieser Befund deckt sich mit den Expressionsdaten aus der Western Blot Analyse (siehe Abb. C-12), die zeigen, dass in RK13-Zellen nach Infektion mit EHV-wtgag keine Expression von Gag nachzuweisen ist. Da die Induktion von Immunantworten zwingend an die Expression des jeweiligen Antigens gebunden ist, erklärt dies das schlechte Immunisierungsergebnis mit dem EHV-wtgag Konstrukt.

Ebenfalls keine statistisch signifikante, Gag-spezifische zelluläre Immunantwort wird bei Mäusen induziert, die eine Grundimmunisierung mit EHV-gfp gefolgt von zwei *Booster*-Immunisierungen mit EHV-syngag erhielten (siehe Abb. C-13; Mausgruppe 11). Dies deutet darauf hin, dass nach einmaliger Applikation von EHV Vektorimmunität gegen das Virus erzeugt wird, die nach der Grundimmunisierung mit EHV-gfp bei weiteren *Booster*-

Immunisierungen mit EHV-syngag die Ausbildung einer Gag-spezifischen Immunantwort verhindert.

Für die statistische Auswertung wurde jeweils das Gag-spezifische Signal, das durch Stimulation mit dem Gag-spezifischen Peptid A9I hervorgerufen wird, mit den Signalen der zugehörigen Werten der internen Negativkontrollen, die sich nach Stimulation mit unspezifischem V3 Peptid bzw. mit Medium ergeben, verglichen. Mit Hilfe des Student T-Test wurden die Unterschiede auf ihre Signifikanz hin überprüft. Im weiteren wurden dann die Gag-spezifischen Messwerte der unterschiedlichen Immunisierungsgruppen ebenfalls mit dem Student T-Test auf signifikante Unterschiede hin untersucht. Bedingt durch die Versuchsdurchführung liefern die mittels FACS Analyse gewonnenen Daten jeweils nur zwei Werte pro Mausgruppe, so dass zwar eine statistisch signifikante Aussage über das Auftreten einer spezifischen Immunantwort möglich ist, nicht jedoch über Unterschiede in der Effizienz einer Immunisierungsroute gegenüber einer anderen Immunisierungsroute. Die Unterschiede zwischen den Messwerten für die Gag-spezifischen Immunantworten, die über die verschiedenen Applikationswege induziert wurden, spiegeln demnach nur einen Trend wider. Basierend auf diesem Trend wurden die besten Gag-spezifischen Immunantworten nach intraperitonealer (142) und nasaler (102) EHV-syngag Applikation gemessen, gefolgt von intramuskulärer (78) Verabreichung von EHV-syngag. Die schlechteste Gag-spezifische Immunantwort wird über eine subkutane (57) oder intravenöse (45) Immunisierungsroute induziert. (Die Zahlenwerte, die in Klammern nach den einzelnen Immunisierungsrouten angegeben sind, ergeben sich als Mittelwert der A9I-Messwerte aus der FACS Analyse und beziehen sich jeweils auf die Anzahl $IFN\gamma^+ CD8^+$ Zellen/ $3 \times 10^4 CD8^+$ Zellen).

Erwähnenswert ist weiterhin, dass es bedingt durch den hohen Attenuierungsgrad des eingesetzten Virusstamms RacH bei keinem der immunisierten Tieren nach Virusapplikation zum Auftreten von EHV-spezifischen Krankheitssymptomen wie Gewichtsverlust oder schlechtem Allgemeinzustand (Fieber, stumpfes Fell, etc.) kam, wie sie bei virulenten EHV-Stämmen beobachtet wurden (Tsujimura *et al.*, 2006; von Einem *et al.*, 2004).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass EHV-syngag über alle getesteten Applikationsrouten in der Lage ist, im Mausmodell eine signifikante, Gag-spezifische zelluläre Immunantwort zu induzieren. Beeinträchtigt wird die Stärke der Immunantwort jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit durch das Auftreten von Vektorimmunität. Dies zeigt sich in der Beobachtung, dass in Mäusen, die mit EHV-gfp grundimmunisiert wurden, auch nach zweimaliger nasaler *Booster*-Immunisierung mit EHV-syngag keine Gag-spezifische Immunantwort induziert werden konnte. Darüber hinaus sind die Gag-spezifischen zellulären Immunantworten, die durch EHV-syngag induziert wurden, allesamt wesentlich schwächer, als die Immunantwort, die durch eine reine DNA Immunisierung mit dem pc-syngag Konstrukt (Mausgruppe 14) hervorgerufen wurde.

Im weiteren sollte deshalb versucht werden, durch geeignete *Prime-Boost*-Strategien die Induktion Gag-spezifischer Immunantworten mit EHV zu verbessern. Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag dabei auf einer nasalen Applikation des Virus, da für diese Applikationsroute zum einen trendmäßig die stärksten Immunantworten gemessen wurden und zum anderen die Induktion einer mukosalen Immunantwort am wahrscheinlichsten ist, der gerade im Kontext einer schützenden HIV-Vakzine eine Schlüsselrolle zukommt.

C.2.2 Durch kombinierte Applikation von rekombinantem EHV und Plasmid-DNA werden Transgen-spezifische Immunantworten verstärkt

Basierend auf den Ergebnissen der in Kapitel C.2.1 beschriebenen Immunisierungsstudie wurde in einer nachfolgenden Mausstudie untersucht, inwieweit die Induktion Gag-spezifischer Immunantworten durch den Einsatz heterologer *Prime-Boost*-Strategien (siehe Abb. C-14 A/ B; Mausgruppe 3) oder durch Variation der Applikationsroute bei homologen *Prime-Boost*-Strategien (siehe Abb. C-14 A/ B; Mausgruppe 4) verbessert werden kann.

Im weiteren sollte die Frage geklärt werden, ob durch Variation der Applikationsrouten auch der Ausbildung von Vektorimmunität entgegengewirkt werden kann. Dafür wurden BALB/c Mäuse intramuskulär (siehe Abb. C-14A/B; Mausgruppe 6) oder nasal (siehe Abb. C-14A/B; Mausgruppe 5) mit EHV-gfp grundimmunisiert, gefolgt von zwei nasalen *Booster*-Immunisierungen mit EHV-syngag. Ergänzt wurde der experimentelle Versuchsaufbau mit den relevanten Kontrollgruppen (siehe Abb. C-14A/B; Mausgruppe 1, 2, 7). Vom zeitlichen Ablauf her erhielten alle Versuchtiere nach einer Grundimmunisierung im Abstand von sechs Wochen und neun Wochen zwei *Booster*-Immunisierungen. Zehn Tage nach der letzten Immunisierung wurde der Versuch terminiert und Gag-spezifische zelluläre, humorale und mukosale Immunantworten ausgelesen. Die Bestimmung der zellulären Immunantwort erfolgte mittels Elispot Assay und FACS Analyse (siehe Abb. C-14 A). Hierzu wurden die Milzen der fünf Versuchstiere je Gruppe entnommen und jeweils drei bzw. zwei Milzen einer Immunisierungsgruppe gepoolt. 1×10^6 (Elispot) bzw. 2×10^6 (FACS) der gepoolten Splenozyten wurden 24 h (Elispot) bzw. 6 h (FACS) mit einem Gag-spezifischen Peptid (A9I) stimuliert und anschließend der Anteil $\text{IFN}\gamma^+$ -Zellen (Elispot) bzw. der Anteil $\text{IFN}\gamma^+/\text{CD8}^+$ -Zellen (FACS) bestimmt. Als interne Negativkontrolle für jede einzelne Mausgruppe dienten nicht-stimulierte (Medium) oder mit unspezifischem Peptid (V3) stimulierte Splenozyten.

Der Unterschied zwischen Elispot Assay und FACS Analyse besteht darin, dass mittels FACS Analyse der Anteil $\text{IFN}\gamma$ produzierender CD8^+ -Zellen klar gegen $\text{IFN}\gamma^+/\text{CD4}^+$ -Zellen abgegrenzt werden kann, wohingegen im Elispot *per se* nicht zwischen diesen beiden Zellpopulationen unterschieden werden kann. Bei $\text{IFN}\gamma^+/\text{CD8}^+$ -Zellen handelt es sich um aktivierte cytotoxische T-Zellen bzw. um CD8^+ *Memory* T-Zellen, die besonders in der

Abwehr viraler Infektionen eine wichtige Rolle spielen (Janeway *et al.*, 2001) und die entscheidende Messgröße für das Auslesen zellulärer Immunantworten darstellen.

In der vorliegenden Immunisierungsstudie wurde jedoch bereits durch die Wahl des nonameren Peptids A9I, das für die Stimulation der Splenozyten verwendet wurde, die stimulierbare Zellpopulation auf CD8⁺ Zellen beschränkt. CD8⁺ Zellen können durch einen mit spezifischem Antigen-beladenen MHC-I Rezeptor stimuliert werden, wohingegen CD4⁺ Zellen einen Stimulus über einen mit spezifischem Antigen-beladenen MHC-II Rezeptor benötigen. Da das A9I Nonamer aufgrund seiner Größe nur auf MHC-I Moleküle geladen werden kann, ist eine Stimulation von CD4⁺ Zellen somit von vornherein ausgeschlossen. Für die mittels Elispot Assay und FACS Analyse generierten Daten bedeutet dies, dass sich die beiden Tests in ihrer Aussage entsprechen (siehe dazu auch Abb. C-14A). Für nachfolgende Immunisierungen sind deshalb nur noch alternativ entweder die mittels FACS Analyse oder die mittels Elispot Assay bestimmten Daten dargestellt.

Die statistische Auswertung der Messwerte für die zelluläre Immunantwort erfolgte analog zu der in Kapitel C.2.1 beschriebenen Vorgehensweise. Dabei ergab sich, dass mit den in Mausgruppe 1, 2, 3 und 4 verwendeten Immunisierungsstrategien eine statistisch signifikante Gag-spezifische Immunantwort induziert wird. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen diesen Mausgruppen sind nicht nachweisbar, allerdings lässt sich der Trend beobachten, dass die stärkste Gag-spezifische Immunantwort durch eine kombinierte Immunisierung mit Virus und DNA bestehend aus einer subkutan applizierten DNA-Grundimmunisierung und zwei nasalen EHV-syngag *Booster*-Immunisierungen hervorgerufen wird (1274) (Mausgruppe 3). Diese *Prime-Boost*-Strategie induziert sogar eine stärkere Gag-spezifische Immunantwort als eine dreimalige DNA-Immunisierung (687) (Mausgruppe 2).

Im Gegensatz dazu wird durch Variation der Immunisierungsroute unter Beibehalt einer homologen viralen *Prime-Boost*-Strategie keine stärkere Gag-spezifische Immunantwort hervorgerufen. So entwickelten Mäuse, die ein intramuskuläres EHV-syngag *Priming* gefolgt von zwei nasalen *Booster*-Immunisierungen mit EHV-syngag erhalten hatten, eine schlechtere Gag-spezifische zelluläre Immunantwort (220) (Mausgruppe 4), als Mäuse die eine dreimalige nasale Immunisierung mit EHV-syngag (629) verabreicht bekommen hatten (Mausgruppe 1). (Die Zahlenwerte, die in Klammern nach der jeweiligen Immunisierungsstrategie angegeben sind, ergeben sich als Mittelwert der A9I-Messwerte aus der FACS Analyse und beziehen sich jeweils auf die Anzahl IFN γ ⁺ CD8⁺ Zellen/ 3x10⁴ CD8⁺ Zellen).

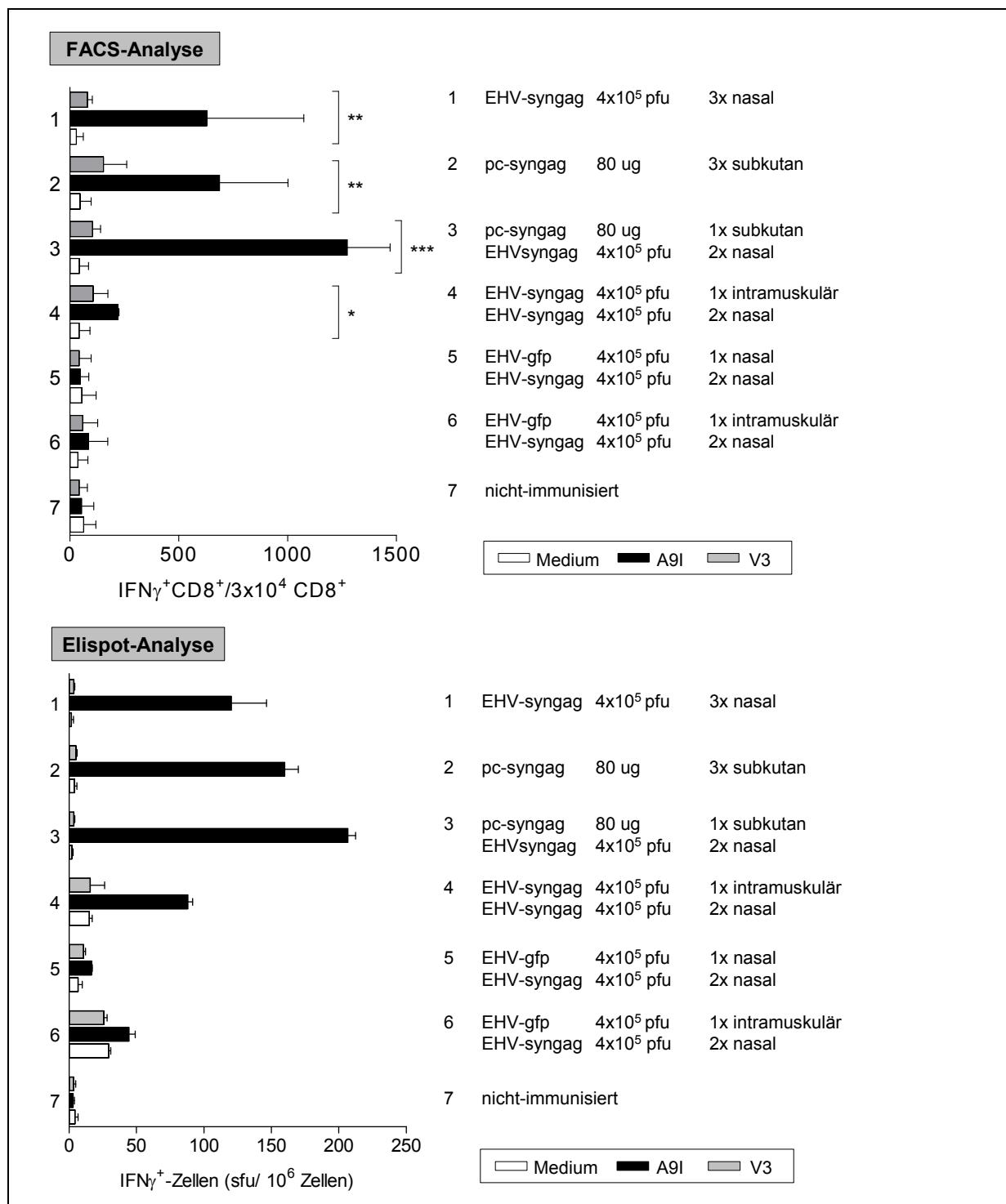


Abb. C-14A: Gag-spezifische zelluläre Immunantworten mit rekombinantem EHV nach Anwendung unterschiedlicher Prime-Boost-Strategien

Gag-spezifische zelluläre Immunantworten wurden mittels Elispot Assay und FACS Analyse bestimmt (genauere Angaben zum Assay siehe Text, bzw. Kapitel B.2.5.2.1 und B.2.5.2.2) Nicht-stimulierte (Medium) oder mit unspezifischem Peptid (V3) stimulierte Splenozyten wurden als interne Negativkontrolle für die jeweilige Mausgruppe verwendet.

Elispot Assay und FACS Analyse liefern vergleichbare Aussagen bezüglich der zellulären Immunantworten der unterschiedlichen Mausgruppen.

Statistisch signifikante Gag-spezifische Immunantworten ergeben sich in der FACS Analyse für Mausgruppe 1, 2, 3 und 4. Die beobachteten Unterschiede zwischen diesen Mausgruppen sind statistisch nicht signifikant. Vom Trend her induziert von den ausgetesteten Prime-Boost-Strategien die heterologe Immunisierungsstrategie bestehend aus einer DNA (pc-syngag) Grundimmunisierung und zwei nasalen EHV-syngag Booster Immunisierungen die beste gag-spezifische Immunantwort (Mausgruppe 3)

signifikant ($0,01 < P \leq 0,05$); ** hoch signifikant ($0,001 \leq P \leq 0,01$), *** höchstsignifikant ($P < 0,001$)
sfu: spot forming units

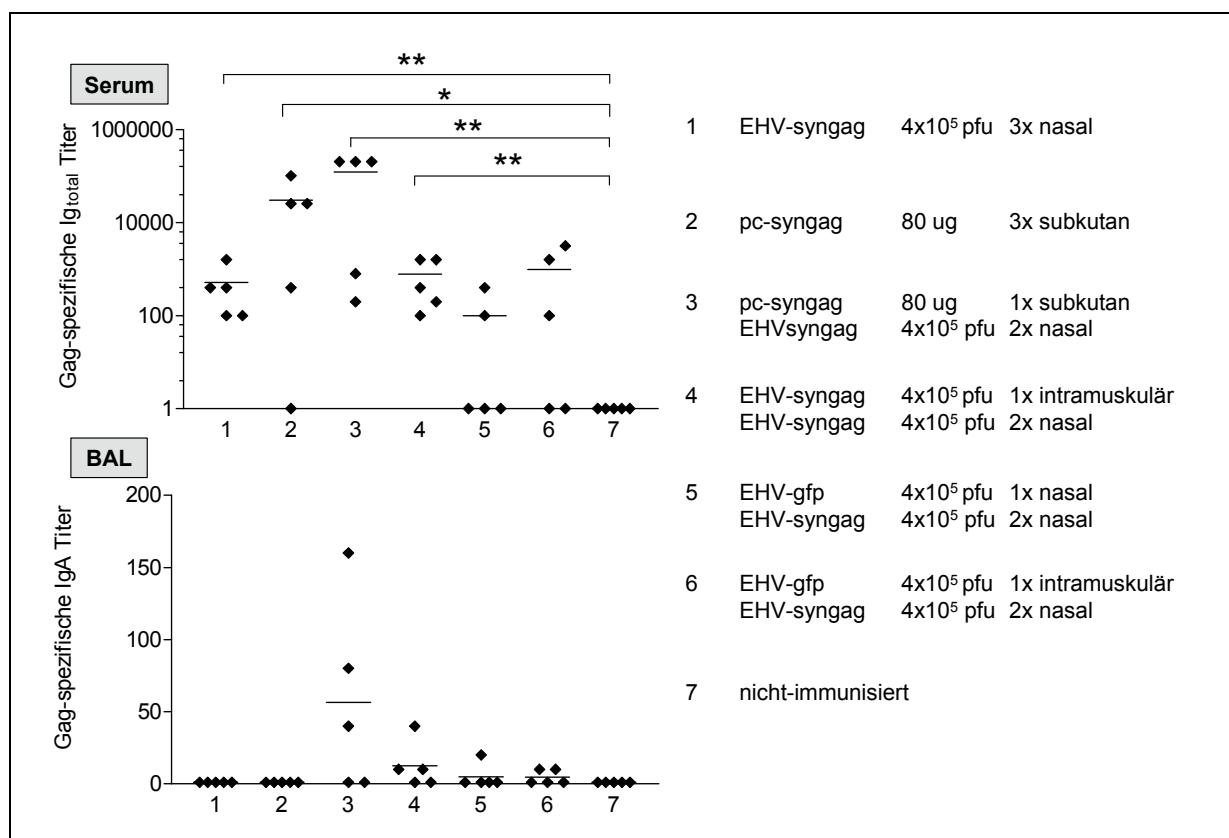


Abb. C-14B: Gag-spezifische humorale und mukosale Immunantworten mit rekombinantem EHV nach Anwendung unterschiedlicher Prime-Boost-Strategien

Gag-spezifische humorale (Ig_{total}) und mukosale (IgA) Immunantworten; Serum bzw. Bronchoalveolare Lavagen (BAL) immunisierter BALB/c Mäuse (je 5 Mäuse pro Gruppe) wurden im ELISA untersucht und Gag-spezifische IgA- und Ig_{total} -Titer mittels Endpunktverdünnung bestimmt. Dargestellt sind die Antikörpertiter der Einzelmäuse (◆) und der jeweilige Mittelwert der Gruppe (Linie). Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels des Mann-Whitney-U-Tests. Statistische Unterschiede in der induzierten humoralen Gag-spezifischen Immunantwort ergeben sich zwischen den Mausgruppen 1, 2, 3, 4 und der Negativkontrollgruppe (Mausgruppe 7). Statistisch signifikante Unterschiede der Mausgruppen 1, 2, 3, 4 zueinander sind nicht nachweisbar. Ebenso wenig zeigen sich statistisch signifikante Unterschiede bezüglich der mukosalen IgA-Immunantworten. Vom Trend her induziert von den ausgetesteten Prime-Boost-Strategien die heterologe Immunisierungsstrategie bestehend aus einer DNA (pc-syngag) Grundimmunisierung und zwei nasalen EHV-syngag Booster Immunisierungen die beste Gag-spezifische humorale und mukosale Immunantwort (Mausgruppe 3)

* signifikant ($0,01 < P \leq 0,05$); ** hoch signifikant ($0,001 \leq P \leq 0,01$), *** höchstsignifikant ($P < 0,001$)

Bezüglich der Induktion von Vektorimmunität zeigt sich, dass Mäuse nach Grundimmunisierung mit EHV-gfp unabhängig von der gewählten Applikationsroute und anschließender zweimaliger nasaler Booster-Immunisierung mit EHV-syngag keine statistisch signifikante Gag-spezifische Immunantwort entwickeln (siehe Abb. C-14 A; Mausgruppe 5, 6). Diese Ergebnisse implizieren, dass unabhängig von der initial gewählten Applikationsroute im Mausmodell eine breite Vektorimmunität gegen EHV aufgebaut wird.

Bestätigung findet dieses Ergebnis bei der Analyse der humoralen Immunantworten. Auch hier entwickeln die mit EHV-gfp grundimmunisierten Tiere der Mausgruppen 5 und 6 nach einer zweimaligen nasalen Booster-Immunisierung mit EHV-syngag keine von der nicht-immunisierten Kontrollgruppe signifikant unterscheidbare Gag-spezifische humorale Immunantwort.

Die statistische Auswertung der humoralen und mukosalen Immunisierungsdaten erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests. Statistische Unterschiede in der induzierten humoralen Gag-spezifischen Immunantwort ergeben sich zwischen den Mausgruppen 1, 2, 3, 4 und der Negativkontrollgruppe (Mausgruppe 7) (siehe auch Abb. C-14 B). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Mausgruppen 1, 2, 3, 4 sind jedoch nicht nachweisbar. Allerdings findet sich der für die zellulären Immunantworten beobachtete Trend auch in den Gag-spezifischen mukosalen und humoralen Immunantworten wieder. Auch hier ergeben sich die besten Gag-spezifischen Immunantworten nach kombinierter Verabreichung von DNA und Virus (siehe Abb. C-14 B, Mausgruppe 3). Mit der gleichen Immunisierungsstrategie scheint es darüber hinaus möglich zu sein, neben einer zellulären und humoralen Gag-spezifischen Immunantwort auch eine Gag-spezifische mukosale Immunantwort zu induzieren. Die gemessenen mukosalen Immunantworten sind zwar sehr schwach und statistisch nicht abzusichern, liefern aber dennoch einen wertvollen Hinweis darauf, dass rekombinantes EHV unter Verwendung einer geeigneten *Prime-Boost*-Strategie in der Lage ist, auch Transgen-spezifische mukosale Immunantworten zu induzieren.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bei der Austestung unterschiedlicher *Prime-Boost*-Strategien die besten Immunisierungsergebnisse mit einer heterologen *Prime-Boost*-Strategie erreicht wurden. Mit homologen *Prime-Boost*-Strategien wurden deutlich weniger starke Gag-spezifische zelluläre, humorale und mukosale Immunantworten induziert. Grund dafür ist vermutlich die starke EHV-spezifische Vektorimmunität, die nach einmaliger Applikation von EHV auftritt und in der Folge eine weitere Verstärkung Transgen-spezifischer Immunantworten verhindert.

C.2.3 Mehrfache Applikation von rekombinantem EHV führt zu keiner Verstärkung Transgen-spezifischer Immunantworten

Im folgenden sollte geklärt werden, ob mit rekombinantem EHV induzierte Immunantworten durch eine weitere Applikation von rekombinantem EHV verstärkt werden können.

Dafür wurden BALB/c Mäuse (jeweils sechs Mäuse pro Gruppe) einmal bzw. zweimal im Abstand von sechs Wochen mit EHV-syngag oder Plasmid DNA immunisiert und Gag-spezifische zelluläre, humorale und mukosale Immunantworten ausgelesen. Nicht-immunisierte Mäuse fungierten als Negativkontrolle, mit Plasmid-DNA (pc-syngag) immunisierte Mäuse als Positivkontrolle.

Die Bestimmung der zellulären Immunantworten erfolgte mittels IFN γ Elispot Analyse zehn Tage nach der ersten bzw. zweiten Immunisierung. Dafür wurden den Versuchstieren die Milz entnommen und jeweils drei Milzen gepoolt. Im Anschluss wurden 1×10^6 Splenozyten 24 h mit einem Gag-spezifischen Peptid (A9I) stimuliert und anschließend der Anteil IFN γ

sezernierender Zellen bestimmt. Unbehandelte (Medium) bzw. unspezifisch stimulierte (V3) Zellen dienten als Negativkontrolle.

Auch bei dieser Immunisierungsstudie lassen sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Immunisierungsgruppen nicht belegen. Trendmäßig zeigt sich jedoch, dass Mäuse, die zweimal eine nasale EHV-syngag Immunisierung erhielten, keine stärkere Gag-spezifische Immunantwort aufweisen als Mäuse, die nur einmal immunisiert worden waren. Dies lässt darauf schließen, dass durch die mehrfache Verabreichung von rekombinantem EHV keine Steigerung der zellulären Immunantwort erreicht werden kann.

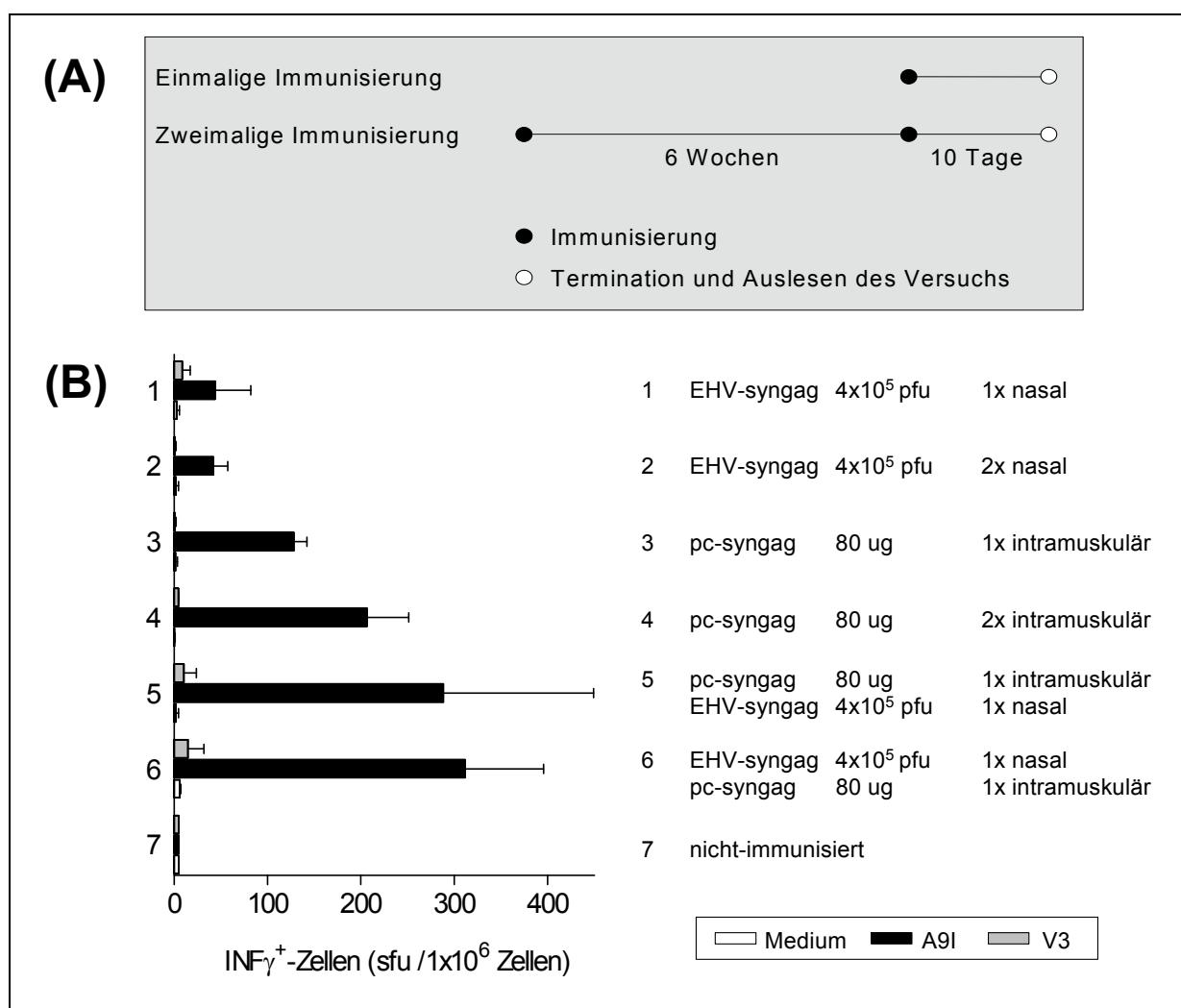


Abb. C-15: Gag-spezifische zelluläre Immunantwort nach einfacher oder zweifacher Immunisierung mit Plasmid-DNA oder rekombinantem EHV

(A) Überblick Immunisierungsschema

(B) Gag-spezifische zelluläre Immunantworten: 1×10^6 Splenozyten aus immunisierten BALB/c Mäusen wurden für 24 h mit einem Gag-spezifischen A91 Peptid, einem unspezifischen V3 Peptid oder ohne Peptid (Medium) behandelt und im Anschluss der Anteil IFN γ sezernierender Zellen mittels Elispot Analyse bestimmt.

Die besten Gag-spezifischen zellulären Immunantworten werden durch eine Kombination von EHV-syngag und DNA-Immunisierung (pc-syngag) erreicht. Eine zweifache Anwendung von EHV-syngag zeigt keine Verstärkung der Immunantwort gegenüber der einfachen Applikation des Virus.

Gegenüber einer einfachen Verabreichung von Plasmid-DNA entwickelten Mäuse nach einer zweifachen Anwendung deutlich stärkere zelluläre Immunantworten.

Noch stärkere zelluläre Immunantworten ließen sich induzieren, wenn die Mäuse mit Virus und Plasmid-DNA behandelt wurden, wobei die Reihenfolge der Behandlung keine Auswirkung auf die Höhe der zellulären Immunantwort hat. Unabhängig davon, ob zuerst Plasmid-DNA gefolgt von einem nasalen EHV-syngag *Boost* oder umgekehrt verabreicht wurde, wurden durch eine kombinierte Virus/ DNA-Strategie vergleichbar starke Immunantworten induziert (siehe Abb. C-15).

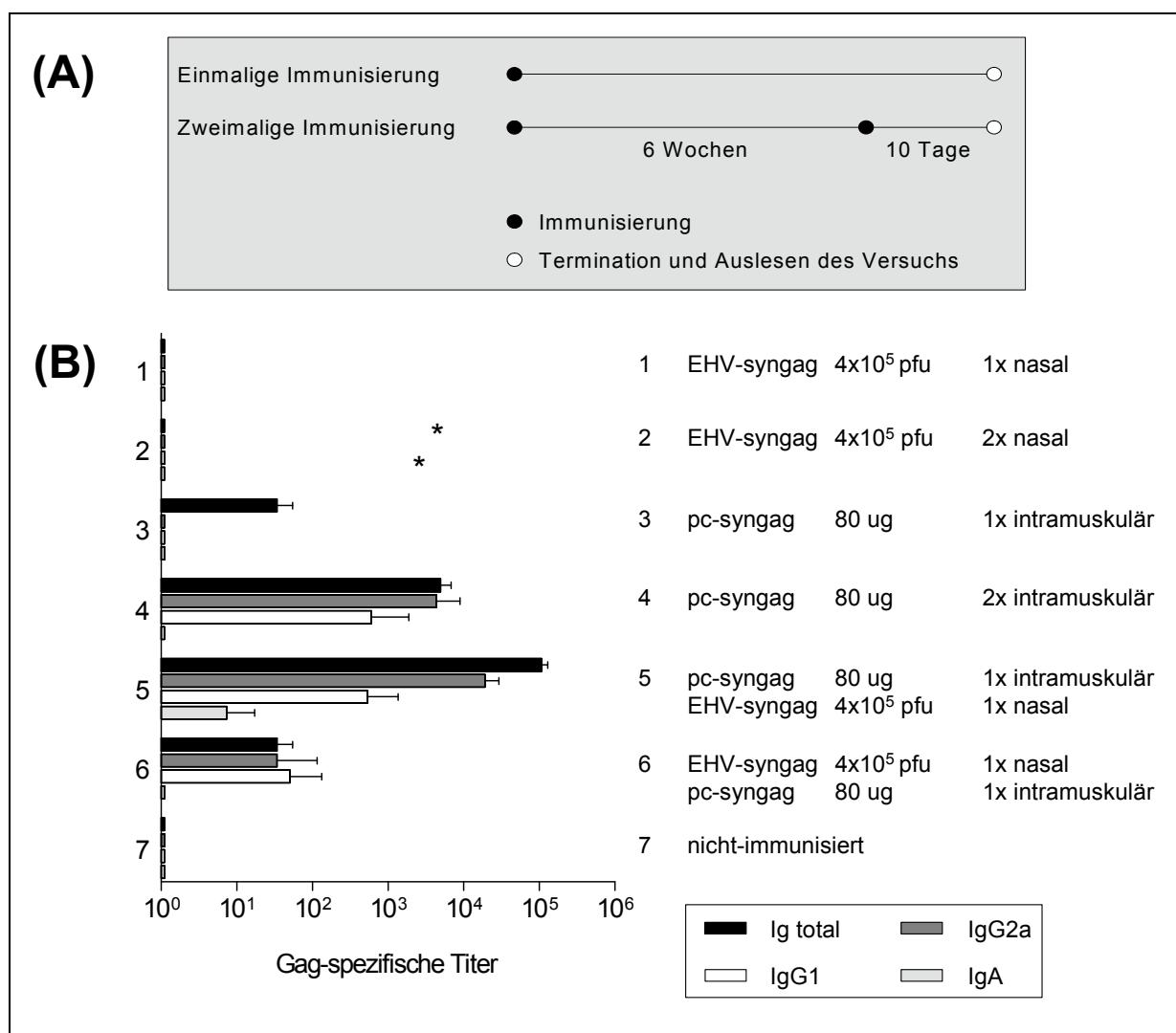


Abb. C-16: Gag-spezifische humorale und mukosale Immunantwort nach einfacher oder zweifacher Immunisierung mit Plasmid-DNA oder rekombinantern EHV

(A) Überblick Immunisierungsschema

(B) Gag-spezifische humorale und mukosale Immunantworten; Serum (Ig_{total}, IgG1, IgG2a) bzw. Bronchoalveolare Lavagen (IgA) immunisierter BALB/c Mäuse (je 6 Mäuse pro Gruppe) wurden im ELISA untersucht und Gag-spezifische Ig_{total}, IgG1, IgG2a und IgA-Titer mittels Endpunktverdünnung bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung der Antikörpertiter der jeweiligen Mausgruppen. Bei den mit * gekennzeichneten Werten handelt es sich um den Ig_{total} und IgG1 Titer einer Einzelmäuse aus der Gruppe 2, die als „Ausreißer“ nicht berücksichtigt wurde.

Die besten Gag-spezifischen humoralen Immunantworten ergeben sich für die Anwendung von DNA (pc-syngag) *Priming* und nasalem EHV-syngag *Boost*. Eine einfache oder zweifache nasale Applikation von EHV-syngag ist unter den gegebenen Bedingungen nicht in der Lage eine Gag-spezifische humorale Immunantwort zu induzieren.

Die Gag-spezifischen humoralen und mukosalen Immunantworten wurden mittels Endpunkttdilutions-ELISA siebeneinhalb Wochen nach Verabreichung der ersten Immunisierungsdosis bestimmt. Für die Bestimmung Gag-spezifischer Gesamt-Immunglobuline (Ig_{total}) und IgG Subtypen (IgG2a und IgG1) wurde Serum verwendet. Für die Bestimmung von Gag-spezifischem Immunglobulin A (IgA) dienten Bronchoalveolare Lavagen (BAL) der Mauslungen als Ausgangsmaterial.

Die detektierten humoralen und mukosalen Immunantworten sind zwar insgesamt sehr schwach, dennoch setzen sich auch hier die Trends der Beobachtungen für die zelluläre Immunantwort fort (siehe Abb. C-16).

So konnte nach einer einfachen oder zweifachen nasalen Applikation von EHV keine Gag-spezifische humorale Immunantwort detektiert werden. Eine starke Gag-spezifische humorale Immunantwort wird jedoch durch zweifache Applikation eines Plasmid-DNA-Konstruktions oder durch eine kombinierte Verabreichung von Virus und Plasmid-DNA erreicht. Die so induzierten Immunantworten sind stärker als nach einer einfachen Immunisierung mit Plasmid-DNA und die kombinierte Applikation von Virus und DNA ist der zweifachen Verabreichung von DNA hinsichtlich der Stärke der induzierten humoralen Immunantwort überlegen.

Im Gegensatz zur zellulären Immunantwort ist die Ausbildung der humoralen Immunantwort bei der kombinierten Applikation von Virus und DNA abhängig von der Reihenfolge der Verabreichung. Während durch eine Grundimmunisierung mit DNA gefolgt von einer nasalen Virus *Booster-Immunisierung* eine sehr gute humorale und auch eine schwache mukosale Immunantwort hervorgerufen werden, ist dies bei umgekehrter Reihenfolge nicht der Fall.

Im weiteren kann man aus dem Verhältnis der Gag-spezifischen IgG Subtypen, IgG1 und IgG2a ableiten, dass unabhängig von der verwendeten Immunisierungstrategie alle Gruppen eine Th1-polarisierte Immunantwort aufweisen (d.h. $IgG2a \geq IgG1$). Dies bedeutet, dass in den Mäusen nach Immunisierung naive $CD4^+$ Zellen bevorzugt zu Th1 Helferzellen ausdifferenzieren. Nach ihrer Aktivierung sekretieren diese Zellen typische Th1-spezifische Cytokine (z.B. $IFN\gamma$, IL2), wodurch vor allem die Ausbildung zellulärer Immunantworten unterstützt wird (Janeway *et al.*, 2001).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine Steigerung der zellulären und humoralen Immunantwort durch mehrfache Applikation von rekombinantem EHV nicht möglich ist. Eine deutliche Verstärkung der Immunantwort kann nur durch eine mehrfache Verabreichung eines Plasmid-DNA-Konstruktions oder durch Kombination von Plasmid-DNA und Virus erreicht werden. Dabei ist eine kombinierte Virus-DNA-Applikation einer reinen DNA-Applikation überlegen.

C.3 Erhöhung von Vektorsicherheit

C.3.1 Allgemein

Die bisherigen Ergebnisse belegen, dass bei Verwendung einer geeigneten Immunisierungsstrategie bereits kleine Mengen von rekombinantem EHV in der Lage sind, gute Transgen-spezifische zelluläre, humorale und mukosale Immunantworten in BALB/c Mäusen zu induzieren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Replikation von EHV in humanen Zellen *in vitro* zwar stark vermindert, aber nicht vollständig inhibiert ist (Daten nicht dargestellt).

Zur Erhöhung der Vektorsicherheit wurde deshalb die weitere Modifizierung des EHV-Vektors vorgenommen. Die Expression aller viralen Gene in EHV-1 ist von einem einzigen *Immediate Early* Gen (IE) abhängig (Gray *et al.*, 1987), das in je einer Kopie in den beiden *Repeat* Regionen des Virus enthalten ist. Die Deletion der beiden IE-Leserahmen aus dem viralen Genom wäre eine ideale Möglichkeit, die Expression aller viralen Gene vollständig zu unterdrücken. Das einzige viral codierte Gen, das nach Infektion exprimiert würde, wäre so das gewünschte Transgen.

Die technische Umsetzung dieser Virusmutante scheitert bislang am Fehlen einer geeigneten *trans*-komplementierenden Zelllinie, die die Produktion von hochtitrigen, infektiösen viralen Partikeln ermöglicht (Garko-Buczynski *et al.*, 1998).

Eine gangbare Alternative bietet der *equine Transinducing Factor* (eTIF). Bei eTIF handelt es sich um ein essentielles Tegumentprotein, das in der U_L-Region des Virus codiert ist. Der Leserahmen von eTIF wird deshalb auch als UL48 bezeichnet.

eTIF wird beim Eintritt des Virus in die Zelle als Komponente des Teguments mit eingeschleust (Lewis *et al.*, 1997). Das Gen selbst wird im Verlauf der Infektion erst spät im Replikationszyklus exprimiert. In der Zelle wirkt eTIF als Transaktivator für das IE-Gen und ist maßgeblich am Viruszusammenbau beteiligt (Lewis *et al.*, 1993; Lewis *et al.*, 1997; Purewal *et al.*, 1994). UL48-deletierte Viren zeigen in Zellkultur einen starken Replikationsdefekt, der jedoch durch eine *trans*-komplementierende Zelllinie (RK13-48), in der das eTIF-Protein konstitutiv exprimiert wird, weitgehend ausgeglichen werden kann (von Einem *et al.*, 2006).

Die starke Beeinträchtigung der viralen Replikation zu einem frühen (Transaktivierung) und späten (Viruszusammenbau) Zeitpunkt der Infektion, zusammen mit der Tatsache, dass mit Hilfe der *trans*-komplementierenden RK13-48 Zelllinie eine hochtitrige Produktion phänotypisch intakter Viruspartikel möglich ist, machen UL48-deletierte Viren zu einem interessanten Kandidaten in Bezug auf eine Erhöhung der Vektorsicherheit. Die folgenden Kapitel dieser Arbeit beschäftigen sich deshalb mit der Herstellung und Verifizierung UL48-

deletierter Viren, der Untersuchung ihrer Replikation in humanen Zellen *in vitro* und der Analyse ihrer immunogenen Eigenschaften im Mausmodell *in vivo*.

C.3.2 Herstellung von UL48-deletierten Viren

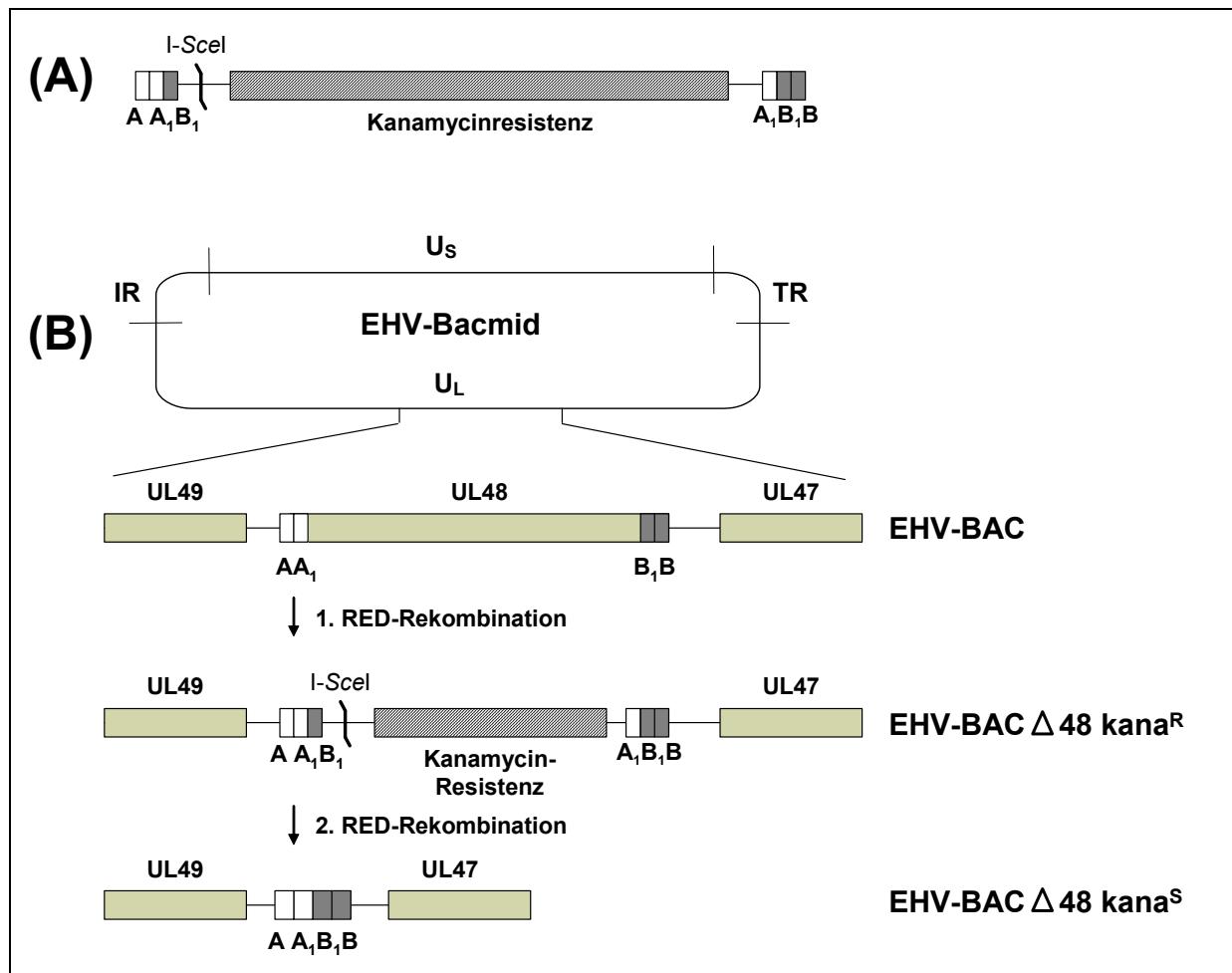


Abb. C-17: Überblick der Herstellung eines rekombinanten EHV-Bacmid mit deletiertem UL48 Bereich (Δ48)

(A) Schematische Darstellung des verwendeten Transferkonstrukts
 (B) Schematischer Überblick der Rekombinationsschritte; In einem ersten Rekombinationsschritt wird der UL48-Leserahmen aus der *Unique Long* Region des EHV-Bacmid mittels homologer Rekombination über die Bereiche AA₁ und B₁B durch eine Kanamycin-Resistenzkassette ersetzt (EHV-BAC Δ48 kana^R). Diese wird in einem zweiten Rekombinationsschritt wieder aus dem Bacmid ausre kombiniert. Als interne homologe Sequenzbereiche für die Ausre kombination der Kanamycin-Resistenzkassette dienen die Bereiche A₁B₁ so dass der UL48-Leserahmen rückstands frei aus dem Bacmid entfernt ist (EHV-BAC Δ48 kana^S).

Die Deletion des UL48-Leserahmens aus der viralen Sequenz erfolgte mittels zweistufiger homologer RED-Rekombination analog zu dem unter C.1.1 beschriebenen Verfahren.

Unterschiede bestehen jedoch in der Art des verwendeten Transferkonstruks. Bei dem für die Deletion der UL48 Sequenz verwendeten Transferkonstrukt handelt es sich um ein doppelsträngiges, lineares DNA Fragment, bestehend aus einer Kanamycinresistenz-

Kassette, einer I-SceI Restriktionsschnittstelle und verschiedenen Sequenzbereichen, die für die gerichtete homologe Rekombination verantwortlich sind. Diese Sequenzbereiche gliedern sich folgendermaßen auf: Am 5' bzw. 3' terminalen Ende befinden sich Sequenzbereiche (AA₁ bzw. B₁B), die homolog zum unmittelbar angrenzenden Sequenzbereich des UL48-Leserahmens im Bacmid sind. Sie dienen der Integration des Transferkonstruktes in die Bacmid-Sequenz während der 1. RED-Rekombination. An die terminalen Sequenzbereiche AA₁ bzw. B₁B schließen sich Nukleotidabfolgen an, die jeweils zum entgegengesetzten Terminus homolog sind, so dass sich für die terminalen Bereiche des Transferkonstrukts die Sequenz AA₁B₁ bzw. A₁B₁B ergibt. 5' und 3' Terminus des Transferkonstrukts stimmen demnach in dem Bereich A₁B₁ überein. Dieser interne homologe Bereich dient bei der 2. RED-Rekombination der Ausrekonkombination der Kanamycinresistenz-Kassette und damit der rückstandsfreien Entfernung des UL48-Leserahmens aus dem EHV-Bacmid (siehe Abb. C-17).

C.3.2.1 Überblick über UL48-deletierte Bacmide

Name Konstrukt	Effizienz der Rekombination		Kurzbeschreibung
	1. RED	2. RED	
EHV-BAC IIIBsyngag Δ48	12/12	1/6	IIIBsyngag: Gag-Protein (55 kDa) HIV-1 Clade B; DNA-Sequenz optimiert auf Säugetier-spezifischen Codongebrauch.
EHV-BAC gfp Δ48	10/14	10/11	gfp: grün-fluoreszierendes Protein (GFP) (27kDa) aus <i>Aequorea victoria</i> ; DNA-Sequenz optimiert auf Säugetier-spezifischen Codongebrauch.

Tab. C-2: Überblick rekombinante UL48-deletierte Bacmide

Dargestellt sind die rekombinanten UL48-deletierten EHV-Bacmide mit einer Kurzbeschreibung des jeweils codierten Transgens. Die Effizienz der Rekombination bezieht sich auf die Anzahl insgesamt untersuchter Klone aus der 1. und 2. RED-Rekombination und darauf, wie viele der Gesamtklone positiv auf Insertion des Transgens (1. RED) bzw. Ausrekonkombination der Kanamycinresistenz-Kassette (2. RED) getestet wurden.

C.3.2.2 Verifizierung rekombinanter delta eTIF Mutanten

C.3.2.2.1 Southern Blot Analyse bestätigt erfolgreiche Deletion des UL48-Leserahmens aus der Bacmidsequenz

Zur Verifizierung wurden die rekombinanten Bacmid Konstrukte auf ihr spezifisches Restriktionsmuster hin untersucht und mittels Southern Blot die Deletion des UL48-Leserahmens überprüft. Im folgenden sind die Ergebnisse aus Restriktionsanalyse und Southern Blot für EHV-BAC IIIBsyngag Δ48 und EHV-BAC gfp Δ48 dargestellt (siehe Abb. C-18).

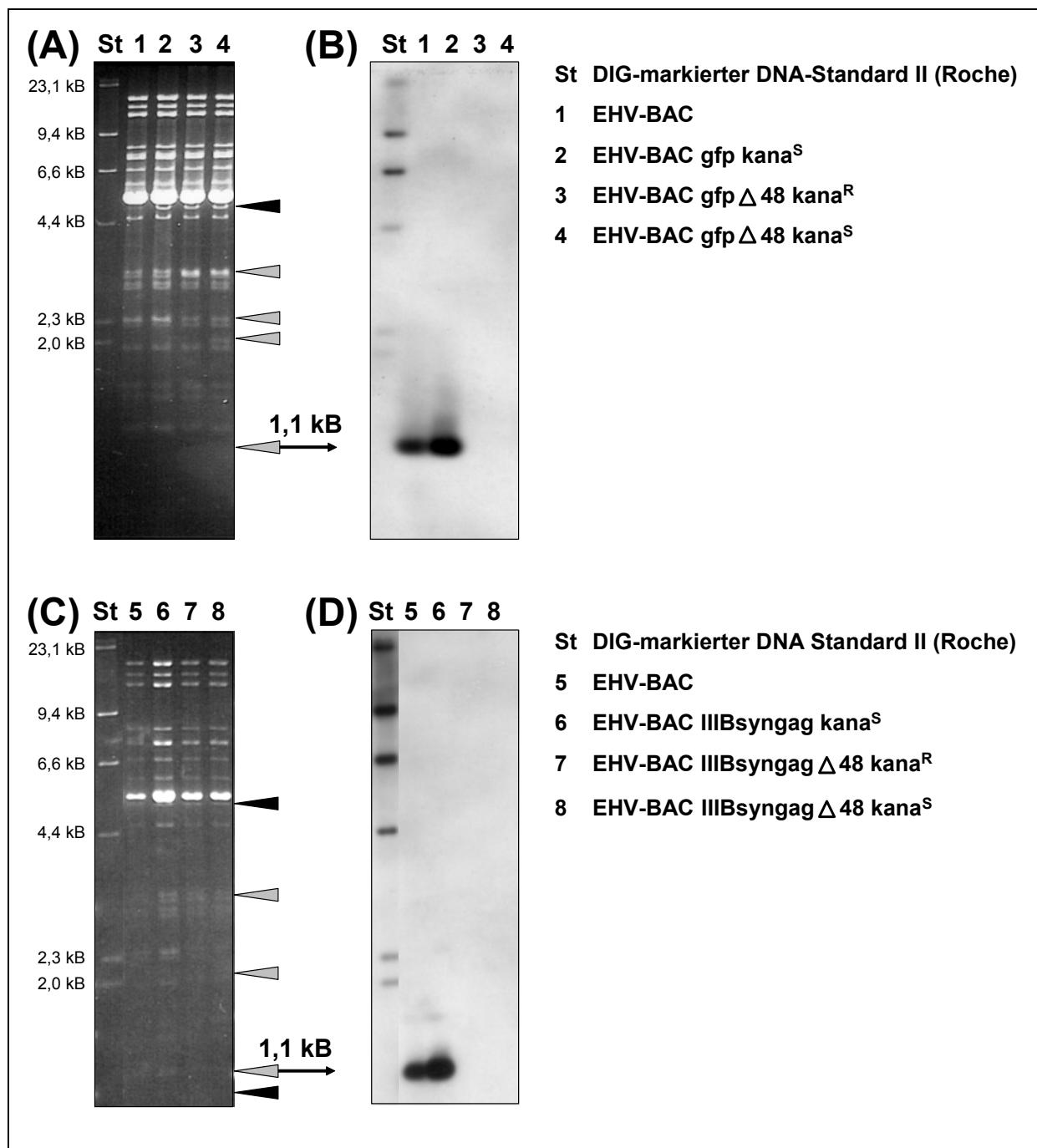


Abb. C-18: Verifizierung von UL48 deletierten EHV-Bacmiden anhand spezifischer Restriktionsmuster und *Southern* Blot Analyse (dargestellt am Beispiel von EHV-BAC gfp Δ 48 und EHV-BAC IIIB syngag Δ 48)

(A, C) BAC-DNA wurde aus dem Bakterienstamm EL250 isoliert, mit dem Restriktionsenzym *EcoR* V verdaut und auf 0,8 % Agarose Gel mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Unterschiede im Restriktionsmuster sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Graue Pfeile bezeichnen die Veränderungen die sich aufgrund der Deletion der UL48 Region ergeben. Schwarze Pfeile bezeichnen die Unterschiede, die sich aufgrund der Insertion von den Transgenen gfp bzw. IIIB-syngag ergeben

(B, D) *Southern* Blot Analyse von rekombinanten EHV-Bacmiden mit DIG-markierter UL48-spezifischer Sonde. Der Blot zeigt spezifische Banden (1,1 kB) für EHV-Bacmide die, die UL48 Region noch enthalten. In den UL48-deletierten Mutanten tritt kein Signal mehr auf. (Als Größenstandard diente der DIG-markierte DNA-Standard II der Firma Roche, Mannheim)

Für die Restriktionsanalyse wurde die Bacmid DNA mit der Restriktionsendonuklease *Eco*R V fragmentiert und mittels Gelelektrophorese auf einem Agarosegel aufgetrennt. Abhängig vom verwendeten Konstrukt ergeben sich Sequenz-spezifische Unterschiede, die von der Insertion des Transgens (IIIBsyngag, gfp) oder von der Deletion des UL48-Leserahmens herrühren. Diese Unterschiede sind mit grauen bzw. schwarzen Pfeilen gekennzeichnet (siehe Abb. C-18 A/ C).

Im Anschluss wurde die Bacmid-DNA vom Agarosegel auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen und mittels einer UL48-spezifischen DIG-markierten Sonde auf die Deletion der UL48 Region hin untersucht.

Wie erwartet tritt ein UL48-spezifisches Signal in der erwarteten Höhe von 1,1 kB nur in dem Wildtyp EHV-BAC sowie den rekombinanten EHV-BAC gfp und EHV-BAC IIIBsyngag Konstrukten auf. Für die kanamycinresistenten Intermediate und die finalen kanamycinsensitiven Bacmide mit deletiertem UL48-Leserahmen lässt sich kein UL48-Signal mehr detektieren (siehe Abb. C-18 C/ D).

Die *Southern* Blot Analyse bestätigt zwar die Deletion des UL48-Leserahmens aus dem Bacmid, nicht aber die Ausrekonkombination der Kanamycinresistenz-Kassette während der 2. RED-Rekombination. Zur weiteren Verifizierung der UL48-deletierten Konstrukte wurde deshalb eine PCR-Analyse der viralen DNA durchgeführt.

C.3.2.2.2 PCR-Analyse viraler DNA aus infizierten Zellen bestätigt die Deletion des UL48-Leserahmens aus dem viralen Genom

Zur Überprüfung der Deletion des UL48-Leserahmens und Ausrekonkombination der Kanamycinresistenz-Kassette wurde die virale DNA aus EHV-gfp Δ48 bzw. EHV-syngag Δ48 infizierten Zellen mittels PCR analysiert.

Dafür wurde ein Primerpaar (P1/ P2) generiert, das im 5' bzw. 3' angrenzenden Bereich des UL48-Leserahmen im Bacmid bindet. Je nachdem, ob der UL48-Leserahmen noch in der Sequenz enthalten ist, ergeben sich mit diesem Primerpaar PCR-Produkte unterschiedlicher Größe. Ist UL48 noch in der Sequenz enthalten, ergibt sich ein Produkt mit einer Größe von 1603 bp. Ist der Leserahmen deletiert, tritt eine spezifische Bande mit einer Größe von 278 bp auf (siehe Abb. C-19 A).

Entsprechende PCR-Analysen wurden mit DNA aus infizierten RK13 und RK13-48 Zellen durchgeführt. DNA aus nicht-infizierten Zellen diente als Negativkontrolle (siehe Abb. C-19 B).

Für DNA aus EHV-gfp und EHV-syngag infizierten Zellen ergibt sich den Erwartungen entsprechend ein PCR-Produkt mit einer Größe von 1603 bp, weil die virale Sequenz beider Konstrukte den UL48-Leserahmen noch enthält. Entsprechend ergibt sich für die DNA aus

EHV-gfp Δ48 und EHV-syngag Δ48 infizierten Zellen das verkürzte PCR-Produkt mit einer Größe von 278 bp. Die Spezifität der PCR-Produkte wurde durch Sequenzierung bestätigt. Anhand von Größe und Sequenz der erhaltenen PCR-Produkte konnte somit die erfolgreiche Deletion des UL48-Leserahmens und die Ausrekonstruktion der Kanamycinresistenz-Kassette aus der viralen Sequenz von EHV-syngag Δ48 und EHV-gfp Δ48 bestätigt werden.

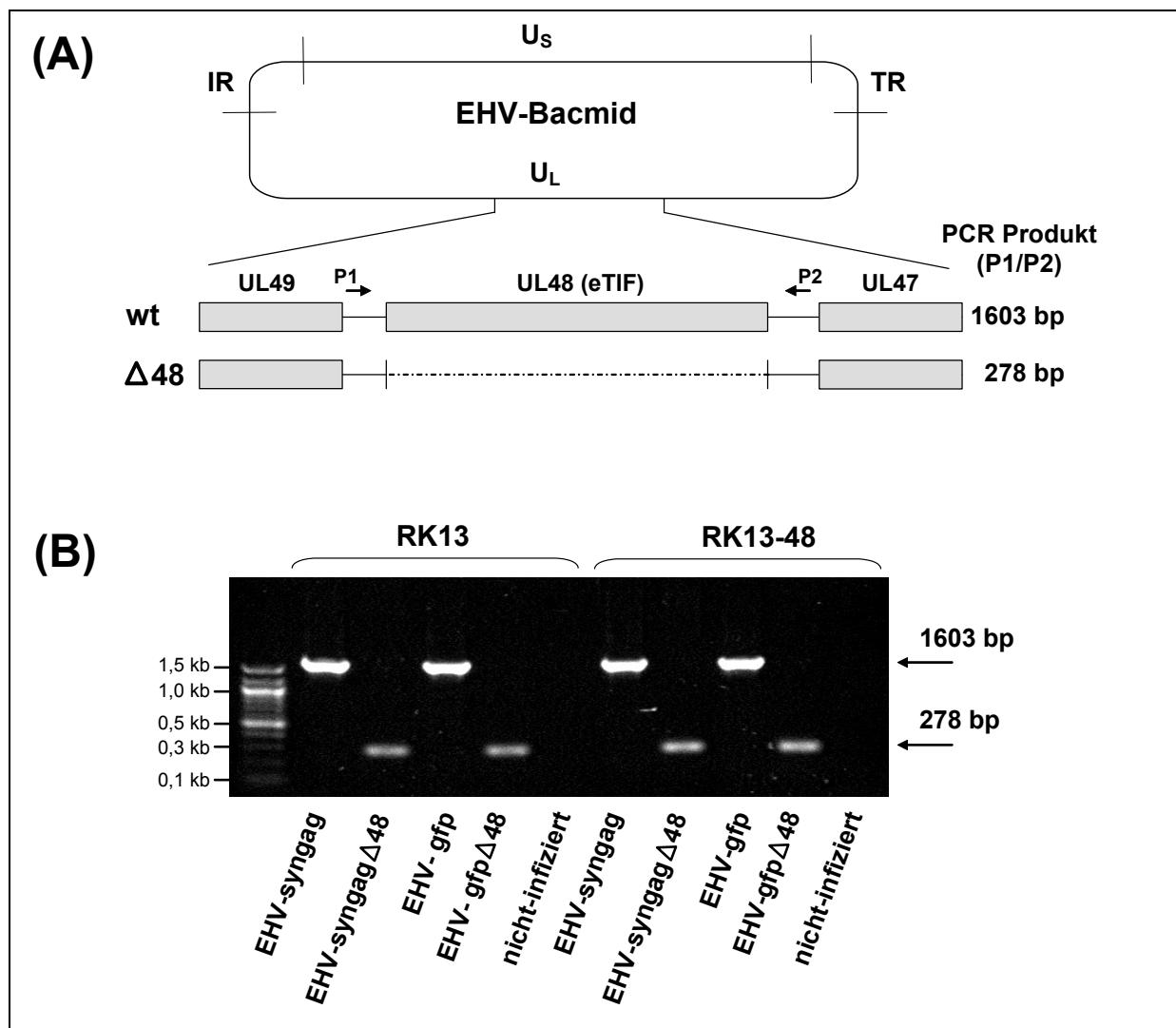


Abb. C-19: Verifizierung von UL48 deletierten EHV mittels PCR Analyse viraler DNA aus infizierten Zellen

(A) Schematische Darstellung der PCR Analyse zum Nachweis der UL48 Deletion; Verwendet wurden Primer (P1/ P2), die im viralen Bereich 5' bzw. 3' angrenzend zur UL48 Region binden. In der PCR Analyse ergibt sich für das unveränderte Ausgangskonstrukt (wt) ein Produkt mit einer Größe von 1603 bp, für UL48 deletierte Viren (Δ48) entsteht ein Produkt mit einer Größe von 278 bp. Die PCR Produkte wurden im Anschluss mittels Sequenzierung weiter verifiziert.

(B) RK13- und RK13-48 Zellen wurden mit den dargestellten Viren infiziert (MOI 1) und 20 h nach Infektion geerntet. Virale DNA wurde präpariert und 1 µg DNA für die anschließende PCR-Analyse eingesetzt. Je 5 µL PCR-Produkt wurden auf einem 0,8 %-Agarosegel mittels Gelelektrophorese analysiert.

Alle untersuchten UL48 deletierten Viren ergeben in der PCR spezifische DNA-Produkte mit der erwarteten Größe von 278 bp, für die Ausgangskonstrukte ergeben sich Banden auf der Höhe von 1603 bp. Nicht infizierte RK13 und RK13-48 dienten als Negativkontrolle. Als DNA Größenstandard wurde die 100 bp DNA ladder der Firma NEB, Frankfurt verwendet.

C.3.2.2.3 *Western Blot Analyse bestätigt Transgen-Expression von UL48-deletierten Viren*

Zur weiteren Verifizierung wurden die UL48-deletierten Viren hinsichtlich der Expression der Transgene gfp und syngag untersucht. Dafür wurden im *Western Blot* Zelllysate von infizierten RK13 und RK13-48 Zellen analysiert. RK13-48 Zellen leiten sich von RK13 Zellen ab und komplementieren den Defekt der UL48-*knockout* Viren *in trans* durch konstitutive Expression des UL48-Proteins eTIF. Dadurch ist die Replikationsfähigkeit der UL48-deletierten Viren weitgehend rekonstituiert. Zu erwarten wäre demnach, dass sich in der nicht-komplementierenden RK13 Zelllinie eine schlechtere Transgenexpression ergibt als in den komplementierenden RK13-48.

Im folgenden sind die Ergebnisse für EHV-gfp, EHV-syngag und den davon abgeleiteten UL48-deletierten Viren dargestellt. RK13 und RK13-48 Zellen wurden mit den entsprechenden Viren mit einer MOI 1 infiziert, 24 Stunden nach Infektion geerntet und die Zelllysate im *Western Blot* analysiert. Zelllysate von RK13 Zellen, die mit gfp- bzw. syngag-Konstrukten transfiziert wurden, dienten als Positivkontrolle, nicht infizierte Zellen als Negativkontrolle. Der Nachweis von β -Actin im *Western Blot* dient als Ladekontrolle und zeigt, dass gleiche Proteinmengen eingesetzt wurden (siehe Abb. C-20).

In den Zelllysaten infizierter Zellen lassen sich entsprechend der eingesetzten viralen Viruskonstrukte im *Western Blot* Gag- bzw. GFP-spezifische Banden mit vergleichbaren Intensitäten nachweisen, unabhängig davon, ob mit einem UL48-deletierten Virus oder mit einem entsprechenden Virus mit intaktem UL48-Leserahmen infiziert wurde. Dies entspricht auf den ersten Blick nicht der Erwartung, dass die Transgenexpression für UL48-deletierte Viren in nicht-komplementierenden gegenüber den komplementierenden Zellen vermindert ist. Grund dafür ist die für die Infektion eingesetzte Virusmenge (MOI 1). Da die Infektion von Zellen durch den UL48-Defekt nicht beeinträchtigt ist, wird bereits in der ersten Infektionsrunde ein großer Anteil der RK13 und RK13-48 Zellen infiziert und das entsprechende Transgen exprimiert. Expressionsunterschiede, die sich aufgrund des Replikationsdefekt des Virus in der nicht-komplementierenden Zelllinie ergeben, fallen dann nicht mehr ins Gewicht und können im *Western-Blot* nicht detektiert werden. Im folgenden Kapitel werden die UL48-deletierten Viren deshalb bezüglich ihrer Replikation und Transgenexpression genauer charakterisiert.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Expression der viralen Transgene gfp und syngag in allen durchgeführten *Western Blot* Analysen stabil war, unabhängig von dem verwendeten Virustyp oder der eingesetzten Viruscharge.

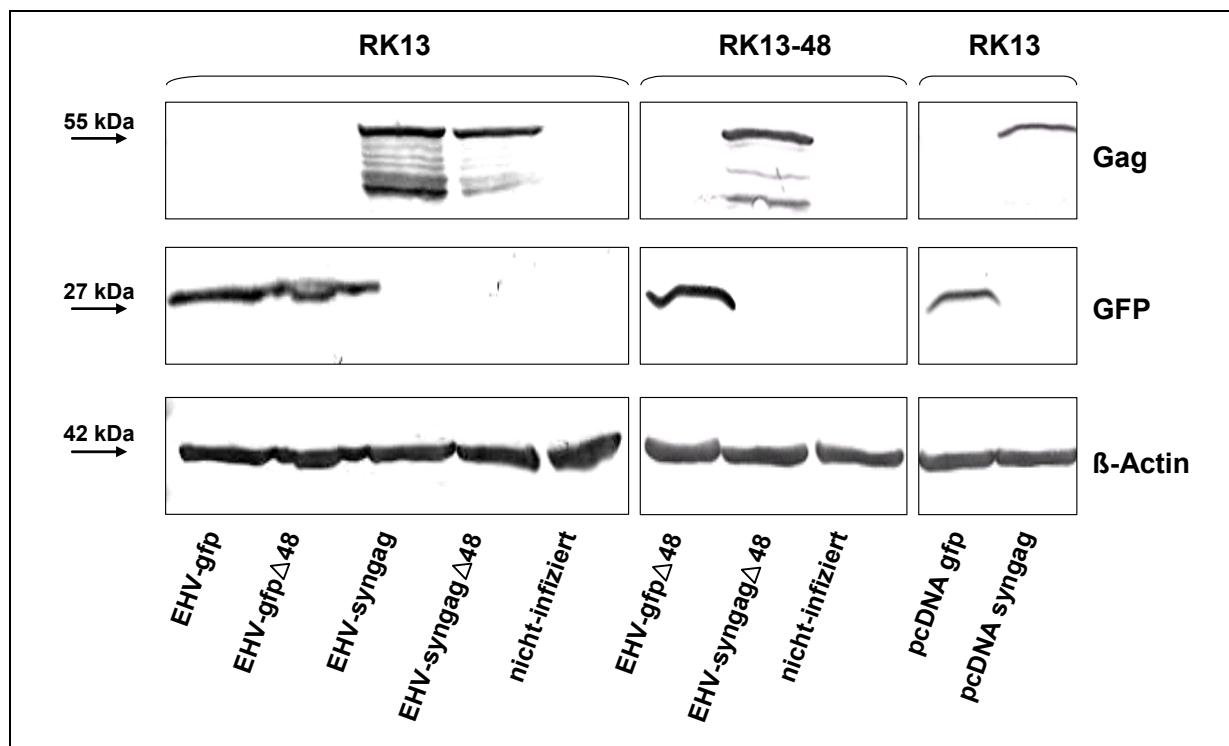


Abb. C-20: Nachweis von Transgen-Expression unterschiedlicher UL48 deletierter EHV-Konstrukte mittels Western Blot Analyse

RK13 und transkomplementierende RK13-48 Zellen wurden mit den angegebenen Viren infiziert (MOI 1) bzw. mit den angegebenen DNA-Plasmiden transfiziert.

24 h nach Infektion und 48 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet. 50 µg Gesamtprotein wurden mittels 12,5 % SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit spezifischen Antikörpern auf Gag-, GFP- und β-Actin-Expression untersucht.

RK13 und RK13-48 Zellen exprimieren die spezifischen viralen Transgene IIIBsyngag und gfp nach Infektion mit den entsprechenden UL48 deletierten und nicht-deletierten Viren. Mit für Gag bzw für GFP codierende DNA-Konstrukten transfizierte Zellen dienten als Spezifitätskontrolle für die jeweiligen Antikörper. Der Nachweis von β-Actin diente als Ladekontrolle für die eingesetzte Proteinmenge.

C.3.2 Charakterisierung delta eTIF Mutanten in vitro

C.3.2.1 Wachstumskinetik UL48-deletierter EHV in lytisch infizierbaren Zellen

C.3.2.1.1 Infektionskinetiken zeigen Replikationsdefekt UL48-deletierter Viren

Im viralen Replikationszyklus wirkt das essentielle Tegumentprotein eTIF als Transaktivator für das IE-Gen und ist maßgeblich am Viruszusammenbau beteiligt. Das Fehlen des essentiellen Gens führt zu einem schwerwiegenden Replikationsdefekt der UL48-deletierten Viren. Im folgenden sind die Infektionskinetiken von EHV-gfp und EHV-gfp Δ48 nach Infektion von RK13 und *trans*-komplementierenden RK13-48 Zellen für unterschiedliche Infektionsdosen (MOI 1/ 0,1/ 0,01/ 0,001) dargestellt. Die Kinetiken dienen zum einen der Charakterisierung der UL48-deletierten Viren und sollen darüber hinaus zeigen, wie gut eine UL48-exprimierende Zelllinie (RK13-48) den UL48-Defekt transkomplementieren kann. Dafür

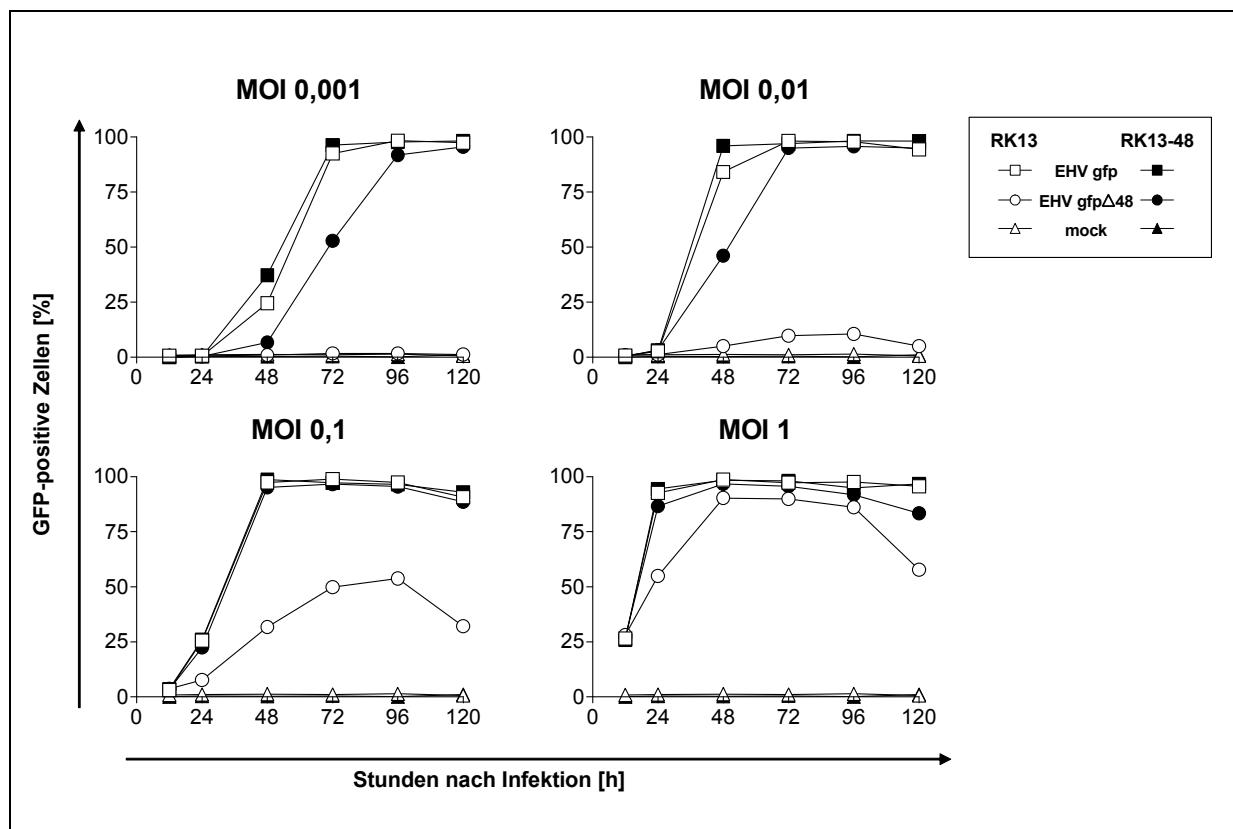


Abb. C-21: Bestimmung von GFP-positiven RK13 und RK13-48 Zellen nach Infektion mit EHV-gfp und EHV-gfp Δ48

4×10^5 RK13 Zellen bzw. transkomplementierende RK13-48 Zellen wurden mit den dargestellten MOI an EHV-gfp (□; ■) oder EHV-gfp Δ48 (○; ●) infiziert und der Anteil GFP-positiver Zellen über einen Zeitraum von 12 bis 120 h nach Infektion mittels FACS Analyse untersucht. Nicht infizierte Zellen (Δ; ▲) dienten als Negativkontrolle.

Die schlechtesten Infektionsraten ergeben sich für alle untersuchten MOI für EHV-gfp Δ48 auf der nicht-komplementierenden RK13 Zelllinie. Die Infektionsraten von EHV-gfp nach Infektion von RK13 oder RK13-48 und EHV-gfp Δ48 nach Infektion von RK13-48 sind für die untersuchten MOI vergleichbar.

wurde der Anteil GFP-exprimierender Zellen mittels FACS Analyse über einen Zeitraum von 12 bis 120 Stunden nach Infektion erfasst (siehe Abb. C-21).

Für das EHV-gfp Virus zeigten sich nach Infektion von RK13 und RK13-48 Zellen für alle untersuchten MOI jeweils gleiche Infektionsverläufe. Ähnliche Infektionsverläufe ergaben sich auch nach Infektion von RK13-48 Zellen mit EHV-gfp Δ48. Bei niedrigen MOI (0,01/0,001) ist die Infektion gegenüber dem Virus mit intaktem UL48-Leserahmen zwar leicht verzögert, es erfolgt aber dennoch eine vollständige Infektion aller Zellen.

Anders verhält es sich, wenn nicht-komplementierende RK13 Zellen mit EHV-gfp Δ48 infiziert werden. Je niedriger die eingesetzte Infektionsdosis, um so kleiner ist der Gesamtanteil infizierter Zellen. Während bei MOI 1 noch 90 % aller Zellen infiziert werden, sind es bei MOI 0,1 54 %, bei MOI 0,01 11 % und bei MOI 0,001 nur noch 2 %. Die verringerte Menge an infizierten Zellen und die stark abgeschwächten Infektionsverläufe in nicht-komplementierenden Zellen belegen den Replikationsdefekt des UL48-deletierten Virus. Die nahezu vollständige Rekonstitution der Replikation des UL48-deletierten Virus bei Infektion von *trans*-komplementierenden RK13-48 Zellen zeigt außerdem, dass der

auftretende Replikationsdefekt spezifisch auf die Deletion des UL48-Leserahmens aus der Bacmidsequenz zurückzuführen ist.

Ferner lässt sich festhalten, dass die Replikation UL48-deletierter Viren zwar stark beeinträchtigt ist, die Infektiosität der Partikel jedoch erhalten bleibt. Dies lässt sich daran erkennen, dass 12 Stunden nach Infektion der Anteil an GFP-positiven Zellen für alle untersuchten MOI unabhängig von Virustyp und verwendeter Zelllinie gleich hoch ist.

C.3.2.1.2 Virusinfektion von RK13 Zellen mit UL48-deletiertem Virus ist selbstlimitierend

Um den negativen Einfluss der UL48-Deletion auf die Virusreplikation genauer zu untersuchen, wurden die Virustiter von Überständen infizierter RK13 und RK13-48 über einen Zeitraum von 12 bis 120 Stunden nach Infektion mittels Plaquetitration bestimmt (siehe Abb. C-22).

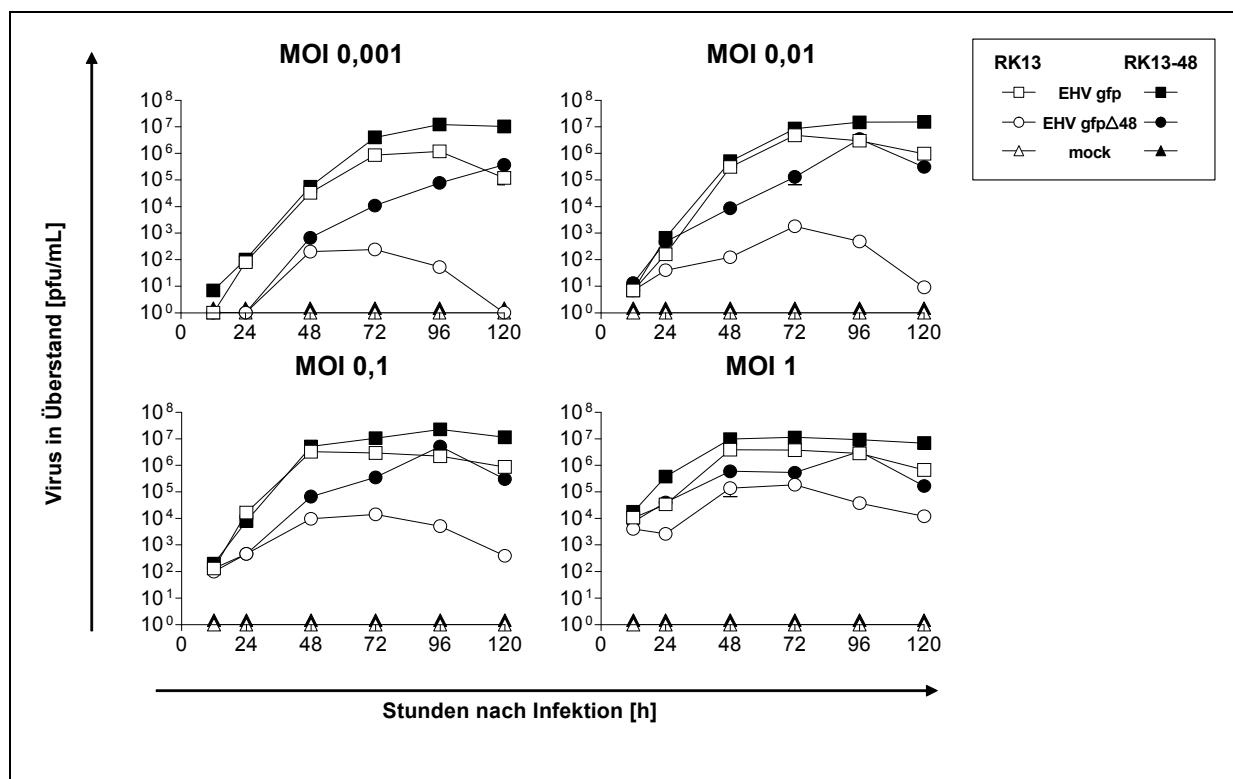


Abb. C-22: Bestimmung von Virustitern in Überständen infizierter RK13 und RK13-48 Zellen
 4×10^5 RK13 Zellen bzw. transkomplementierende RK13-48 Zellen wurden mit den angegebenen MOI an EHV-gfp (□; ■) oder EHV-gfp Δ48 (○; ●) infiziert. Virustiter wurden über einen Zeitraum von 12 bis 120 h nach Infektion mittels Plaquetitration auf RK13-48 Zellen bestimmt. Nicht infizierte Zellen (Δ; ▲) dienten als Negativkontrolle. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus zwei ausgezählten Verdünnungsstufen.

Die Überstände EHV-gfp Δ48 infizierter RK13 Zellen weisen bei allen untersuchten MOI die niedrigsten Virustiter auf. Die Virustiter im Überstand von EHV-gfp infizierten RK13 oder RK13-48 und EHV-gfp Δ48 infizierten RK13-48 sind für die untersuchten MOI vergleichbar.

In den Überständen von EHV-gfp infizierten RK13 und RK13-48 zeigt sich bei allen MOI im untersuchten Zeitraum jeweils ein vergleichbarer Anstieg der Virustiter. Die Titer steigen unmittelbar nach Infektion stark an, bevor sie 48 bis 72 Stunden nach Infektion in ein Plateau einmünden.

Für EHV-gfp Δ 48 infizierte RK13-48 ist der Anstieg der Virustiter nach Infektion gegenüber EHV-gfp infizierten Zellen verzögert, wobei letztlich vergleichbare Titer wie bei der EHV-gfp Infektion erreicht werden.

Die Virustiter in Überständen von EHV-gfp Δ 48 infizierten nicht-komplementierenden RK13 Zellen bleiben dagegen stets unter den Werten, die in den übrigen Infektionen erreicht werden. Nach einem ersten langsamen Anstieg der Virustiter wird 72 Stunden nach Infektion ein Maximum erreicht. Dann nehmen die Titer im weiteren Verlauf der Infektion wieder ab. Für die niedrigste untersuchte MOI kommt es 120 Stunden nach Infektion sogar zu einer vollständigen Eradizierung des Virus aus dem Überstand.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich eine Infektion nicht-komplementierender Zellen mit UL48-deletiertem Virus selbst limitiert. In Zellen, die eTIF *in trans* komplementieren, erfolgt die Bildung von Nachkommenviren nach Infektion mit EHV-gfp Δ 48 zwar verzögert, aber mengenmäßig vergleichbar wie bei einer EHV-gfp Infektion, was zeigt, dass die abortive Infektion auf den Einfluss der UL48-Deletion zurückzuführen ist.

C.3.2.2 Einfluss des UL48-Defekt auf die Infektion humaner Zellen *in vitro*

Die unter C.3.2.1 beschriebenen Versuche wurden mit für RK13 bzw. RK13-48 Zellen durchgeführt, die von EHV lytisch infiziert werden. Humane Zellen dagegen lassen sich mit EHV zwar gut infizieren, die Replikation des Virus ist jedoch stark vermindert.

Im folgenden wird die Fragestellung behandelt, inwieweit sich der Defekt UL48-deletierter Viren auf die Infektion und die virale Replikation in humanen Zellen auswirkt.

Dafür wurden Infektionskinetiken von UL48-deletierter und UL48-haltiger Viren in einer humanen Lungenepithelzelllinie (A549) bestimmt und die Virustiter in Überständen während des Infektionsverlaufs gemessen.

C.3.2.2.1 UL48-deletiertes Virus zeigt abgeschwächten Infektionsverlauf in humanen Zellen

Die Infektionen der humanen A549 Zellen wurden mit EHV-syngag und der entsprechenden UL48-deletierten Variante durchgeführt. Durch den Nachweis des spezifischen viralen Transgenprodukts Gag im FACS, konnte der Anteil infizierter Zellen quantitativ bestimmt werden. Auf diese Weise wurde der Infektionsverlauf für unterschiedliche MOI über einen Zeitraum von 6 bis 120 Stunden verfolgt (siehe Abb. C-23).

Für MOI 1 ergibt sich für die Infektion mit dem UL48-deletierten Virus im Vergleich zu dem UL48-haltigen Virus ein stark abgeschwächter Infektionsverlauf. Nur knapp 50 % aller Zellen werden bei MOI 1 mit EHV-syngag Δ 48 infiziert, während nach einer analogen Infektion mit EHV-syngag fast alle Zellen infiziert werden (95 %). Bei einer hohen Infektionsdosis (MOI 10) gleicht sich der Infektionsverlauf für die UL48-deletierten Viren an den der UL48-haltigen Viren an.

Diese Ergebnisse zeigen, dass auch in humanen Zellen ein Replikationsdefekt der UL48-deletierten Viren gegenüber den UL48-haltigen Viren erkennbar ist. Dieser Defekt wirkt sich auch in den humanen Zellen nicht auf die Infektiosität der Partikel aus, da er durch Erhöhen der Infektionsdosis ausgeglichen werden kann.

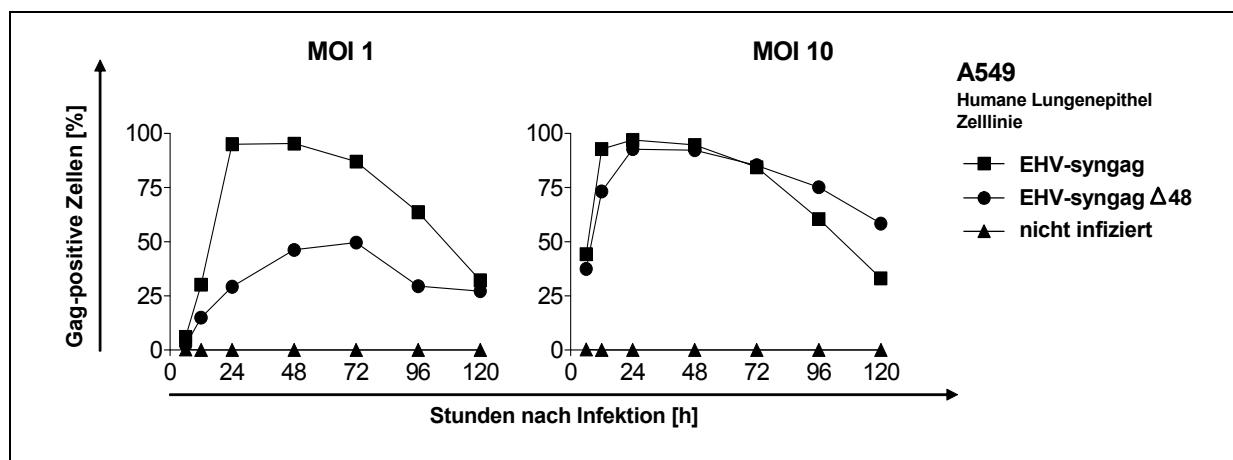


Abb. C-23: Bestimmung von Gag-positiven A549 Zellen nach Infektion mit EHV-syngag und EHV-syngag Δ 48

4×10^5 A549 Zellen wurden mit den dargestellten MOI an EHV-syngag (■) oder EHV-syngag Δ 48 (●) infiziert und der Anteil Gag-positiver Zellen über einen Zeitraum von 6 bis 120 h nach Infektion mittels FACS Analyse untersucht. Nicht infizierte Zellen (▲) dienten als Negativkontrolle. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus zwei ausgezählten Verdünnungsstufen. EHV-syngag Δ 48 zeigt bei allen untersuchten MOI schlechtere Infektionsraten als EHV-syngag.

C.3.2.2.2 Infizierte humane Zellen zeigen im Verlauf der Infektion mit UL48-deletierten Viren keinen Anstieg der Virusmenge im Zellüberstand

Um den Replikationsdefekt der UL48-deletierten Viren in humanen Zellen genauer zu untersuchen, wurden die Virustiter von Überständen infizierter A549 Zellen über einen Zeitraum von 6 bis 120 Stunden nach Infektion mittels Plaquetitration in permissiven RK13-48 Zellen bestimmt (siehe Abb. C-24).

Nach Infektion der Zellen mit EHV-syngag kommt es in den untersuchten Überständen jeweils im Zeitraum zwischen 12 und 24 Stunden nach Infektion zu einem Anstieg der Viruslast um den Faktor 10, während nach Infektion mit dem UL48-deletierten Virus kein solcher Anstieg der Virusmenge zu verzeichnen ist. Für die UL48-deletierte Virusvariante ist 6 bis 12 Stunden nach erfolgter Infektion für alle untersuchten MOI ein Abfall der Viruslast

erkennbar. Danach bleibt die Virusmenge über den gesamten Beobachtungszeitraum konstant.

Diese Ergebnisse schließen zwar eine Replikation der UL48-deletierten Viren in humanen Zellen nicht vollständig aus, belegen aber, dass es, im Gegensatz zu den UL48-haltigen Viren, nach Infektion humaner Zellen zu keiner Erhöhung der Menge infektiöser Partikel im Überstand kommt. Die Einführung der UL48-Deletion ins virale Genom trägt demnach maßgeblich zur Erhöhung der Vektorsicherheit bei.

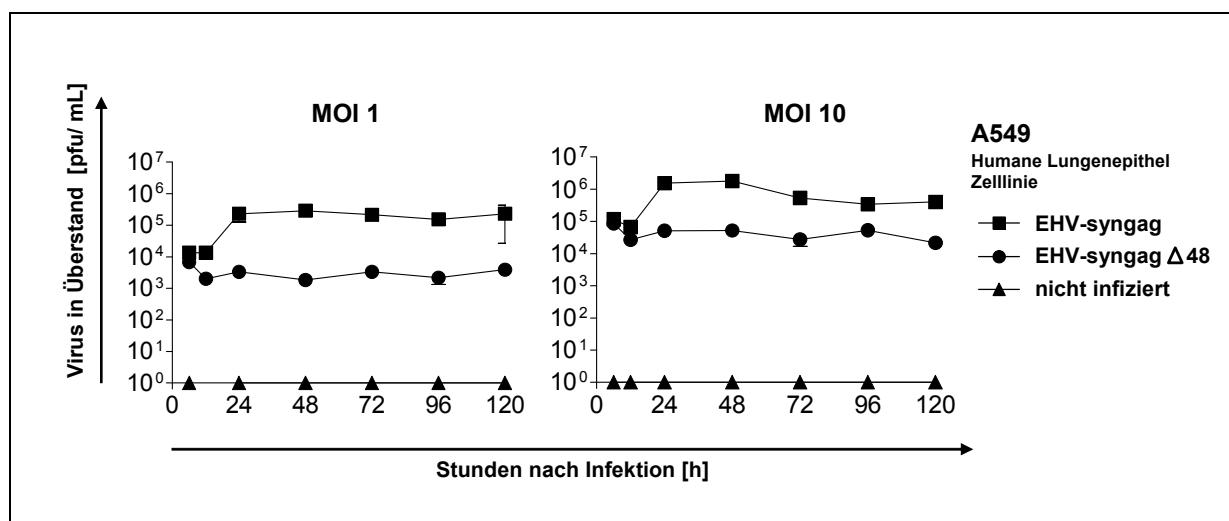


Abb. C-24: Bestimmung von Virustitern in Überständen infizierter A549 Zellen

4×10^5 A549 Zellen wurden mit den dargestellten MOI an EHV-syngag (■) oder EHV-syngag Δ48 (●) infiziert und Virustiter über einen Zeitraum von 6 bis 120 h nach Infektion mittels Plaquettitration auf RK13-48 Zellen bestimmt. Nicht infizierte Zellen (▲) dienten als Negativkontrolle.

Die Virustiter im Überstand von EHV-syngag infizierten A549 zeigen einen Anstieg der Virusmenge 12-24h nach Infektion. Im Gegensatz dazu bleibt die Virusmenge in EHV-syngag Δ48 infizierten A549 über den Beobachtungszeitraum konstant.

C.3.3 Bestimmung des immunogenen Potentials UL48-deletierter Viren *in vivo*

Im weiteren wurden die immunogenen Eigenschaften der UL48-deletierten EHV im Vergleich zu UL48-haltigen Viren *in vivo* untersucht. Dabei wurde zunächst die wirksame Dosis an UL48-deletierten Viren bestimmt, die für die Induktion guter transgen-spezifischer Immunantworten im BALB/c-Mausmodell notwendig ist. Eine weitere Mausstudie beschäftigte sich mit der Bewertung UL48-deletierter Viren hinsichtlich des Auftretens von Vektorimmunität und ihrer Eignung zur Induktion Transgen-spezifischer Immunantworten bei Anwendung unterschiedlicher *Prime-Boost*-Strategien.

C.3.3.1 Einfache nasale Immunisierung mit UL48-deletierten Viren induziert *in vivo* schlechtere zelluläre Immunantworten als UL48-haltige Viren

In einem ersten Schritt wurde eine Dosis Titration durchgeführt, um zu bestimmen, ob durch die eingeschränkte Replikationsfähigkeit der Viren auch die Transgen-spezifische Immunantwort negativ beeinflusst wird.

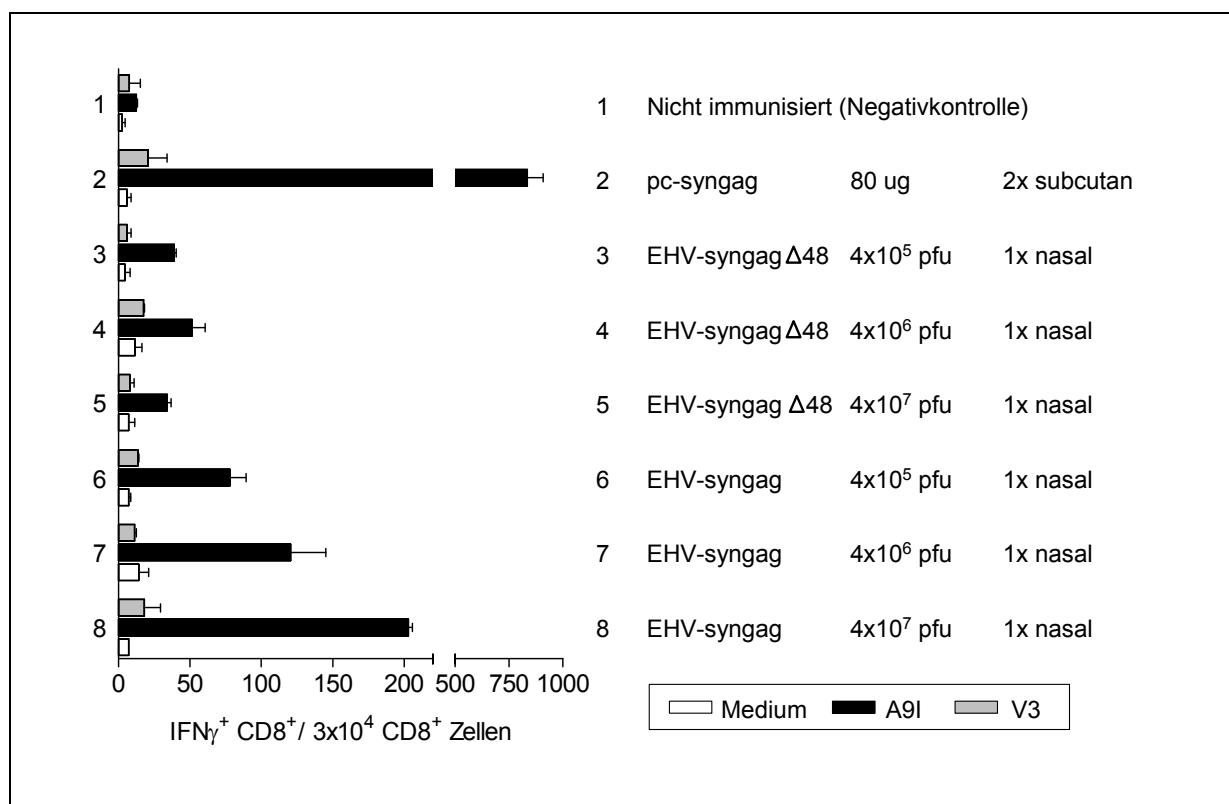


Abb. C-25: Gag-spezifische, zelluläre Immunantworten nach Immunisierung mit unterschiedlichen Mengen EHV-syngag und EHV-syngag Δ48

2x10⁶ Splenozyten wurden für 6 h mit einem Gag-spezifischen A9I Peptid, einem unspezifischen V3 Peptid oder mit Medium behandelt und im Anschluss die Anzahl CD8⁺/IFN γ ⁺ Zellen pro 30 000 CD8⁺ Zellen mittels FACS Analyse bestimmt.

Nicht immunisierte Mäuse dienten als Negativkontrolle (Gruppe 1). Mäuse, denen ein DNA-syngag Konstrukt dreimal subkutan appliziert wurde, dienten als Positivkontrolle (Gruppe 2). EHV-syngag immunisierte Mäuse zeigen eine deutliche dosisabhängige Gag-spezifische Immunantwort (Gruppe 6-8). EHV-syngag Δ48 immunisierte Mäuse entwickeln weniger starke Gag-spezifische Immunantworten als EHV-syngag immunisierte Mäuse. Eine Dosis-abhängige Steigerung der Immunantwort ist nicht erkennbar (Gruppe 3-5).

Dafür wurden jeweils 3 weibliche BALB/c Mäuse pro Mausgruppe einmal mit einer unterschiedlichen Mengen an rekombinantem EHV-syngag oder EHV-syngag Δ48 nasal immunisiert. 10 Tage nach der Applikation wurde der Versuch terminiert, die Milzen der immunisierten Mäuse entnommen und gepoolt. Im Anschluss wurden Gag-spezifische zelluläre Immunantworten mittels FACS Analyse in Doppelbestimmung ausgelesen. 2x10⁶ Splenozyten wurden für 6 h mit einem Gag-spezifischen A9I Peptid, einem unspezifischen V3 Peptid oder ohne Peptid behandelt und im Anschluss die Oberflächenmarker CD8 und CD4 sowie intrazelluläres Interferon γ mit spezifischen, Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert. Der Anteil IFN γ ⁺ CD8⁺-Zellen, der nach Stimulation mit einem Gag-spezifischen Peptid (A9I) auftritt, ist ein Maß für die Stärke der Gag-spezifischen, zellulären Immunantwort. Nicht-immunisierte Mäuse fungierten als Negativkontrolle, mit Plasmid-DNA (pc-syngag) immunisierte Mäuse als Positivkontrolle für die Immunisierungsstudie.

Da es sich bei den vorliegenden Daten für jede Mausgruppe nur um eine Doppelbestimmung der Gag-spezifischen IFN γ ⁺ CD8⁺ Zellen aus einem einzigen Pool von Mausmilzen

immunisierter Mäuse handelt, ist eine statistische Prüfung der Daten hinsichtlich signifikanter Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nicht sinnvoll. Dennoch zeichnet sich für die Gag-spezifischen zellulären Immunantworten, die durch UL48-haltiges und UL48-deletiertes EHV-syngag induziert werden ein deutlicher Trend ab.

Mäuse, die mit EHV-syngag immunisiert wurden, entwickeln gute, dosisabhängige, Gag-spezifische Immunantworten mit Werten von 78, 120 bis 203 IFN γ ⁺ CD8⁺ Zellen/ 3x10⁴ CD8⁺ Zellen (siehe Abb. C-25 Gruppe 6,7,8). Dagegen werden durch Immunisierung mit EHV-syngag Δ48 unabhängig von der eingesetzten Dosis nur vergleichsweise schwache Gag-spezifische Immunantworten mit Werten von 39, 52 und 34 IFN γ ⁺ CD8⁺ Zellen/ 3x10⁴ CD8⁺ Zellen induziert (siehe Abb. C-25 Gruppe 3,4,5).

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Induktion Transgen-spezifischer Immunantworten durch die Einführung der UL48-Deletion ins virale Genom negativ beeinflusst wird. Um diesen Nachteil auszugleichen, wurden deshalb für alle weiteren Immunisierungen von den UL48-deletierten Viren 1x10⁶ pfu je Immunisierungsdosis verwendet, von den UL48-haltigen Viren dagegen nur 1x10⁵ pfu.

C.3.3.2 Austestung unterschiedlicher Prime-Boost-Strategien mit UL48-deletiertem Virus

C.3.3.2.1 Homologe Prime-Boost-Strategien mit UL48-deletierten Viren führen zu keiner Verstärkung Transgen-spezifischer zellulärer Immunantworten in BALB/c Mäusen

Im weiteren sollte geklärt werden, ob durch Einführung der UL48-Deletion ins Virusgenom dem Auftreten von Vektorimmunität *in vivo* entgegengewirkt werden kann. Darüber hinaus wurde untersucht, inwieweit mit homologen Prime-Boost-Strategien basierend auf UL48-deletierten Viren eine Verstärkung der Transgen-spezifischen Immunantworten gegenüber vergleichbaren Strategien mit UL48-haltigen Viren hervorgerufen werden kann.

Nach einer Grundimmunisierung erhielten die Mäuse im Abstand von fünf und neun Wochen zwei Booster-Immunisierungen. Zehn Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Milzen der Versuchstiere entnommen und Gag-spezifische zelluläre Immunantworten mittels FACS Analyse bestimmt. Gag-spezifische Gesamtimmunglobulin Titer (Ig total) wurden in Blutserum, Gag-spezifische mukosale IgA-Titer in Bronchoalveolaren Lavagen mittels Endpunktverdünnungs-ELISA bestimmt (siehe Abb. C-26). Nicht-immunisierte Mäuse fungierten als Negativkontrolle, mit Plasmid-DNA (pc-syngag) immunisierte Mäuse als Positivkontrolle.

Für die Bestimmung der zellulären Immunantworten wurden die Milzen von jeweils zwei der insgesamt sechs Versuchstiere pro Gruppe gepoolt und mittels FACS Analyse Gag-spezifische zelluläre Immunantworten ausgelesen. Trotz Erweiterung des Probenumfangs um einen dritten Splenozytenpool, lässt sich lediglich belegen, dass die zelluläre Gag-

spezifische Immunantwort, die durch eine reine DNA-Immunisierung (Mausgruppe 2) induziert wird, statistisch signifikant besser ist, als die in EHV-immunisierten Tieren induzierte zelluläre Immunantwort (Mausgruppe 3, 4, 5, 6, 7).

Vom Trend her zeigt sich jedoch, dass Mäuse, die dreimal nasal mit EHV-syngag Δ48 immunisiert wurden, eine schlechtere Gag-spezifische zelluläre Immunantwort entwickeln als Mäuse, die dreimal mit EHV-syngag immunisiert wurden. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Erkenntnis aus der Dosis Titration in Abschnitt C.3.3.1, dass die Einführung der UL48-Deletion ins virale Genom die Induktion Transgen-spezifischer zellulärer Immunantworten negativ beeinflusst. Darüber hinaus zeigt dieses Ergebnis aber auch, dass dieser negative Einfluss nicht durch mehrfache nasale Applikation UL48-deletierter Viren kompensiert werden kann. Auch bei homologen *Prime-Boost*-Anwendungen bleiben die durch EHV-syngag Δ48 induzierten Immunantworten hinter den durch EHV-syngag hervorgerufenen zurück. Dies spricht dafür, dass auch durch UL48-deletierte Viren nach einmaliger Applikation in der Maus eine Vektorimmunität gegen das verabreichte Virus entsteht.

Erhärtet wird diese These durch die Mausgruppen, die zunächst eine Grundimmunisierung mit EHV-gfp bzw. EHV-gfp Δ48 gefolgt von zwei *Booster*-Immunisierungen mit EHV-syngag erhielten (Siehe Abb. C-26 Gruppen 6 und 7). Unabhängig davon, ob die Grundimmunisierung mit EHV-gfp oder EHV-gfp Δ48 durchgeführt wurde, entwickeln die Mäuse im weiteren Verlauf des Experiments keine Gag-spezifische zelluläre Immunantwort mehr. Auch diese Beobachtung zeigt, dass nach einmaliger Applikation UL48-haltiger oder UL48-deletierter Viren Vektorimmunität auftritt, die eine Verstärkung Transgen-spezifischer zellulärer Immunantworten durch weitere Virusapplikation verhindert.

Gag-spezifische humorale und mukosale Immunantworten wurden mit den untersuchten viralen homologen *Prime-Boost*-Strategien nur in sehr begrenztem Umfang induziert. Sowohl die Gag-spezifischen IgA-Titer als auch die Gag-spezifischen Gesamtimmunglobulin Titer unterscheiden sich statistisch nicht von der Negativkontrollgruppe. Mit einer reinen DNA-Immunisierung können zwar gute Gag-spezifische Gesamtimmunglobulin Titer induziert werden, allerdings wird wie erwartet durch die systemische Applikation von DNA keine mukosale Immunantwort induziert.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl Viren, die für eTIF codieren, als auch UL48-deletierte Viren nach einmaliger Applikation in BALB/c Mäusen Vektorimmunität induzieren. Darüber hinaus wird durch homologe *Prime-Boost*-Strategien mit UL48-deletierten Viren eine schwächere Transgen-spezifische zelluläre Immunantwort hervorgerufen als mit den entsprechenden UL48-haltigen Viren.

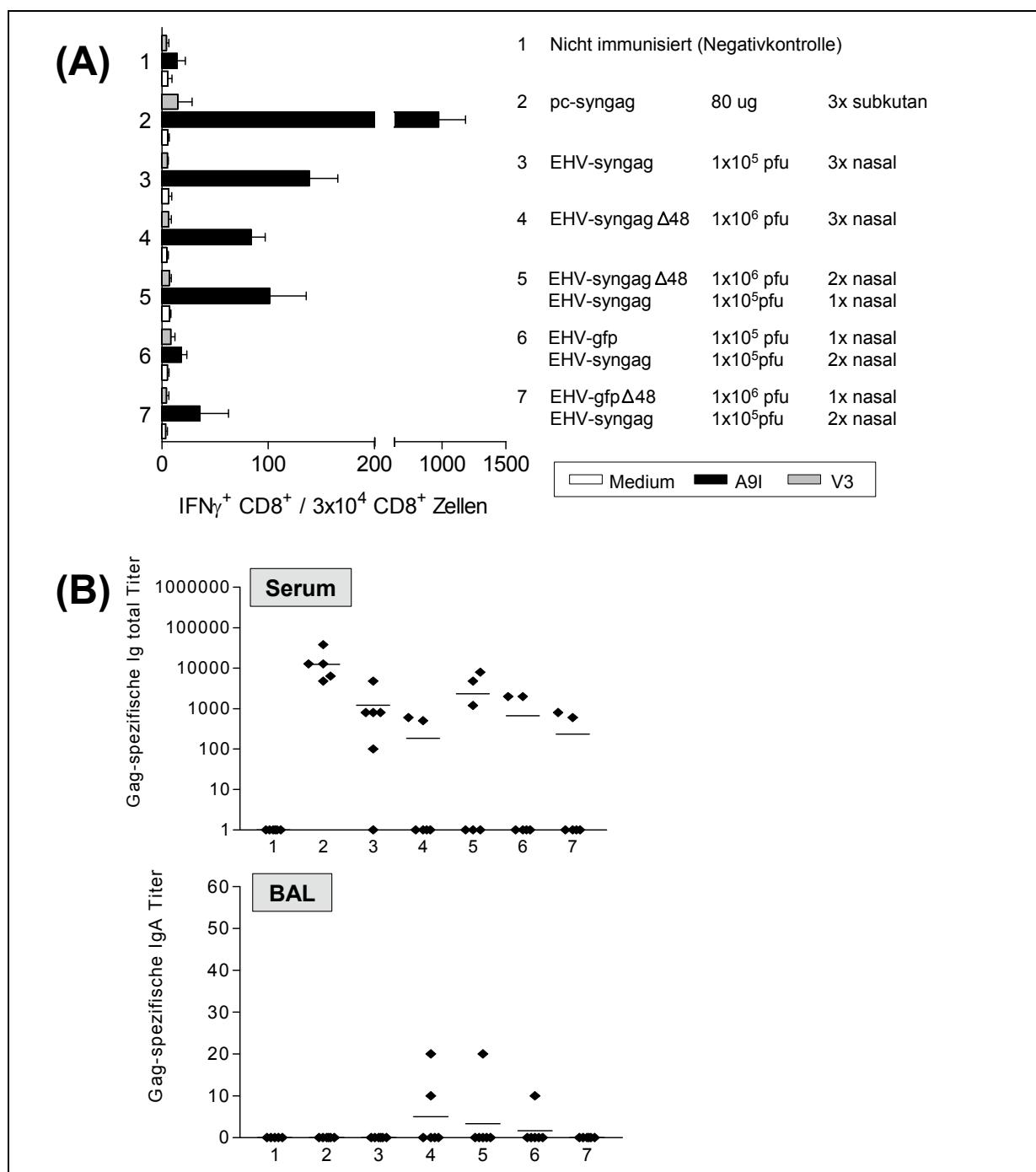


Abb. C-26: Austestung homologer Prime-Boost-Applikationen und Untersuchung von Vektorimmunität für UL48-deletiertes EHV

(A) 2×10^6 Splenozyten wurden für 6 h mit einem Gag-spezifischen A9I Peptid, einem unspezifischen V3 Peptid oder nur mit Medium behandelt und im Anschluss die Anzahl CD8⁺/IFN γ ⁺ Zellen in insgesamt 30 000 CD8⁺ Zellen mittels FACS Analyse bestimmt.

Nicht immunisierte Mäuse dienten als Negativkontrolle (Gruppe 1). Mäuse, denen ein DNA-syngag Konstrukt dreimal subkutan appliziert worden war, dienten als Positivkontrolle (Gruppe 2). Homologe Prime-Boost-Strategien mit EHV-syngag Δ48 zeigen einen negativen Einfluss auf die Höhe der induzierten zellulären Immunantworten im Vergleich zu entsprechenden Immunisierungen mit EHV-syngag.

(B) Gag-spezifische humorale und mukosale Immunantworten; Serum bzw. Bronchoalveolare Lavagen (BAL) immunisierter BALB/c Mäuse (je 6 Mäuse pro Gruppe) wurden im ELISA untersucht und Gag-spezifische IgA- und Ig_{total}-Titer mittels Endpunktverdünnung bestimmt. Dargestellt sind die Antikörpertiter der Einzelmäuse (◆) und der jeweilige Mittelwert der Gruppe (Linie).

Durch die untersuchten viralen homologen Prime-Boost-Applikationen werden nur in sehr begrenztem Umfang Gag-spezifischen humorale und mukosale Immunantworten hervorgerufen.

C.3.3.2.2 Heterologe Prime-Boost Strategien mit UL48-deletierten Viren induzieren gute Transgen-spezifische Immunantworten

Vorhergehende Immunisierungsstudien haben gezeigt, dass sich die besten Immunisierungsergebnisse mit EHV durch eine heterologe *Prime-Boost*-Strategie ergeben, die aus einer subkutanen DNA-Grundimmunisierung (pc-syngag) und zwei nasalen EHV-*Booster*-Immunisierungen besteht. Im folgenden wurde deshalb untersucht, inwieweit UL48-deletierte Viren in der Lage sind, in heterologen *Prime-Boost*-Ansätzen Transgen-spezifische zelluläre, humorale und mukosale Immunantworten zu induzieren.

Dafür wurden BALB/c Mäuse subkutan mit DNA (pc-syngag) grundimmunisiert. Im Abstand von fünf und neun Wochen erhielten die Mäuse dann zwei nasale EHV-syngag oder EHV-syngag Δ 48 *Booster*-Immunisierungen. Als Negativkontrolle dienten nicht-immunisierte Mäuse. Mäuse, die dreimal subkutan mit DNA immunisiert wurden, fungierten als Positivkontrolle.

Zehn Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Milzen der Versuchstiere entnommen, jeweils zwei Milzen gepoolt und Gag-spezifische zelluläre Immunantworten mittels Elispot Analyse bestimmt (siehe Abb. C-27 A). Gag-spezifische Gesamtimmunglobulin Titer (Ig_{total}) wurden in Serum, Gag-spezifische mukosale IgA-Titer in Bronchoalveolaren Lavagen mittels Endpunktverdünnungs-ELISA quantifiziert (siehe Abb. C-27 B).

Der Trend der zellulären Gag-spezifischen Immunantworten zeigt, dass auch in dieser Immunisierungsstudie die besten Immunisierungsergebnisse mit heterologen Immunisierungsstrategien erzielt werden. Dabei besteht kein Unterschied, ob für die *Booster*-Immunisierung EHV-syngag Δ 48 oder EHV-syngag verwendet wurde.

Nach Auswertung der Daten für die Gag-spezifischen humoralen und mukosalen Immunantworten mit dem Mann-Whitney-U-Test ließ sich sogar belegen, dass die Verwendung einer heterologen Immunisierungsstrategie (siehe Abb. C-27 B, Mausgruppe 3, 4, 5) signifikant bessere Immunantworten induziert, als eine homologe *Prime-Boost*-Strategie (bestehend aus einer dreimaligen DNA-Immunisierung) (siehe Abb. C-27 B, Mausgruppe 2). Ferner zeigt sich sogar der Trend, dass *Booster*-Immunisierungen mit UL48-deletierten Viren bessere Schleimhaut-Immunantworten induzieren als *Booster*-Immunisierungen mit den entsprechenden UL48-haltigen Viren.

Zusammenfassend lässt sich demnach festhalten, dass UL48-deletiertes EHV bei Verwendung heterologer Immunisierungsstrategien genauso gute Transgen-spezifische zelluläre und humorale Immunantworten hervorruft wie ein UL48-haltiges EHV. Darüber hinaus scheint die Höhe der Transgen-spezifischen mukosalen Immunantworten durch Verwendung von UL48-deletiertem EHV positiv beeinflusst zu sein.

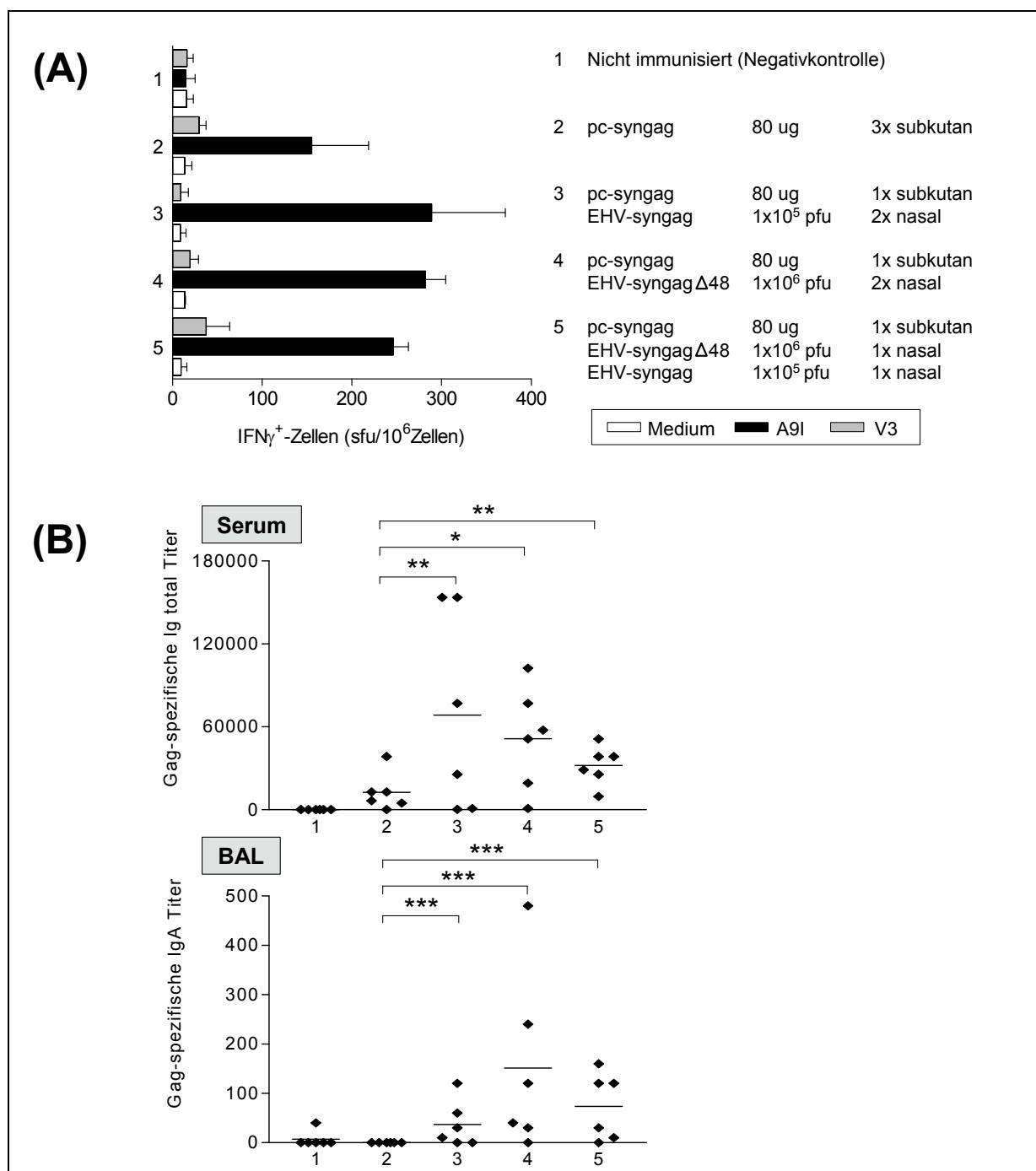


Abb. C-27: Austestung heterologer Prime-Boost-Strategien für UL48-deletiertes EHV

(A) Gag-spezifische zelluläre Immunantworten; 1×10^6 Splenozyten aus immunisierten BALB/c Mäusen wurden für 24 h mit einem Gag-spezifischen A9I Peptid, einem unspezifischen V3 Peptid oder ohne Peptid (Medium) behandelt und im Anschluss der Anteil IFN γ ⁺-Zellen mittels Elispot Analyse bestimmt. Mäuse, denen ein DNA-syngag Konstrukt dreimal subkutan appliziert wurde, dienten als Positivkontrolle (Gruppe 2). Nicht-immunisierte Mäuse fungierten als Negativkontrolle (Gruppe 1). Heterologe Immunisierungsstrategien induzieren bessere Immunantworten als eine reine DNA Immunisierung. Die Verwendung von EHV-syngag Δ 48 für Booster-Immunisierungen wirkt sich nicht negativ auf die Höhe der induzierten Immunantwort aus.

(B) Gag-spezifische humorale und mukosale Immunantworten; Serum bzw. Bronchoalveolare Lavagen (BAL) immunisierter BALB/c Mäuse (je 6 Mäuse pro Gruppe) wurden im ELISA untersucht und Gag-spezifische IgA- und Ig_{total}-Titer mittels Endpunktverdünnung bestimmt. Dargestellt sind die Antikörpertiter der Einzelmäuse (◆) und der jeweilige Mittelwert der Gruppe (Linie). Gag-spezifische mukosale Immunantworten werden durch *Booster-Immunisierung* mit UL48-deletiertem Virus positiv beeinflusst. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels des Mann-Whitney-U-Tests.

* signifikant ($0,01 < P \leq 0,05$); ** hoch signifikant ($0,001 \leq P \leq 0,01$), *** höchstsignifikant ($P < 0,001$)

D. Diskussion

D.1 Herstellung von rekombinantem EHV-1

D.1.1 BAC-Technologie ermöglicht die schnelle und effiziente Herstellung rekombinanter Viren

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung von EHV-1 als neues virales Vektorsystem. Für ein gutes Vektorsystem ist es unter anderem wichtig, über eine Methode zu verfügen, mit der sich rekombinante Viren schnell und effizient generieren lassen. Die Herstellung rekombinanter Viren in eukaryontischen Zellen mittels homologer Rekombination und anschließender Selektion ist langwierig, kosten- und arbeitsintensiv (Terada *et al.*, 2006), da die Selektion einer einheitlichen Population rekombinanter Viren nur durch häufig wiederholte Plaque-Aufreinigung und unter hohem Materialaufwand möglich ist. Durch die vielen Passagen birgt dieses Verfahren zusätzlich die Gefahr, dass es zu unerwünschten genetischen Veränderungen der rekombinanten Viren kommt.

Für die Generierung von rekombinantem EHV-1 lässt sich diese aufwändige Herstellung in Eukaryonten mittels BAC-Technologie umgehen, die die Vermehrung und Mutagenese des viralen Genoms in Prokaryonten ermöglicht. Die in Prokaryonten hergestellte virale DNA ist klonal, so dass nach Transfektion in eukaryontische Zellen nur das rekombinante Virus rekonstituiert wird. Aufwändige Plaque-Aufreinigungsschritte und das Risiko möglicher Attenuierung entfallen damit bei dieser Methode. Mit diesem Verfahren wurden im Rahmen dieser Arbeit mit geringem Materialaufwand innerhalb von sechs bis acht Wochen reine, rekombinante EHV-Stocks hergestellt und verifiziert. Dies macht die Generierung von rekombinanten EHV nicht nur kostengünstig, sondern bedeutet für den Einsatz als mögliches Vektorsystem auch, dass EHV bezüglich der Herstellung rekombinanter Viren ein sehr flexibles und anpassungsfähiges System ist.

D.1.2 *En Passant*-Methode zur Mutagenese des EHV-Bacmid ist herkömmlichen Mutagenese-Methoden überlegen

Für die Mutagenese des EHV-Bacmids im prokaryontischen System wurde die *En Passant*-Methode (Tischer *et al.*, 2006) verwendet, deren Vorteile gegenüber anderen Mutagenese-Verfahren im folgenden dargestellt werden.

Die *En Passant*-Methode basiert auf einem zweistufigen, RED-vermittelten homologen Rekombinationsprozess. Dabei wird in einem ersten Schritt *in vivo* ein lineares doppelsträngiges DNA-Transferkonstrukt in die Bacmidsequenz insertiert. Dieses Transferkonstrukt besteht aus der gewünschten Transgen-Expressionskassette, einem positiven Selektionsmarker, I-SceI-Schnittstelle, internen homologen Sequenzbereichen sowie terminalen Flanken (~50 bp). Die terminalen Flanken sind homolog zur umgebenden

Sequenz einer beliebig wählbaren Insertionsstelle im Bacmid und sorgen für die gerichtete Insertion des Transferkonstrukts während des ersten Rekombinationsschrittes. In einem zweiten Schritt wird der positive Selektionsmarker rückstandsfrei aus dem Bacmid entfernt. Die rückstandsfreie Entfernung erfolgt ebenfalls durch homologe Rekombination. Als Zielsequenzen dienen die internen homologen Sequenzen. Diese sind Teil der Transgensequenz und flankieren den Sequenzbereich, in dem der Selektionsmarker und die I-SceI Restriktionsschnittstelle codiert sind. Durch Arabinose-induzierte Expression der *Homing Endonuklease I-SceI* *in vivo* wird das Bacmid linearisiert, so dass die internen homologen Sequenzen für die Rekombinationsenzyme zugänglich werden. Es kommt zur homologen Rekombination und Ausrekombination des Selektionsmarkers (siehe auch Abb. D-1).

Für die gerichtete Mutagenese episomaler oder chromosomaler DNA-Sequenzen mittels homologer Rekombination in Prokaryonten gibt es generell zwei unterschiedliche Strategien. Die „*In-Out*“-Strategie beruht wie die *En Passant*-Methode auf zwei aufeinanderfolgenden Rekombinationsprozessen. Dabei wird im ersten Schritt die gewünschte Veränderung in der Zielsequenz sowie ein positiver Selektionsmarker eingebracht und im zweiten Schritt der Selektionsmarker wieder entfernt. Die „*In-Out*“-Strategie zeichnet sich bedingt durch die Möglichkeit zur positiven Selektion der Rekombinanten durch hohe Effizienz aus. Kritisch ist jedoch die Entfernung des Selektionsmarkers. Übliche Verfahren zur Ausrekombination basieren auf dem *FLP/FRT*- oder dem *Cre/Lox*-Rekombinationssystem (Datsenko und Wanner, 2000; Zhang *et al.*, 1998). Mit beiden Systemen bleibt bei der Ausrekombination eine Signalsequenz (*FRT-Site* bzw. *loxP-Site*) in der mutierten Sequenz zurück (siehe auch Abb. D-1), was als sogenanntes *Scarring* bezeichnet wird (Herring *et al.*, 2003). Das *Scarring* verhindert zum einen die mehrfache Anwendung der „*In-Out*“-Strategie auf dasselbe Konstrukt und kann sich außerdem störend in der mutierten Sequenz auswirken.

Die zweite Rekombinationsstrategie verzichtet deshalb völlig auf den Einsatz eines positiven Selektionsmarkers zur Detektion von Rekombinanten und umgeht damit das Problem des *Scarring* (Herring *et al.*, 2003; Swaminathan *et al.*, 2001). Dieser direkte Ansatz besteht aus nur einem einzigen homologen Rekombinationsschritt, in dem nur die gewünschte Veränderung in der Zielsequenz eingebracht wird. Die so hergestellten Rekombinanten tragen damit zwar nur die gewünschte Veränderung, aber an das Verfahren schließt sich ein aufwändiges *Screening*-Verfahren zur Identifikation positiver Klone an, da die Effizienz dieser direkten Strategie abhängig von der verwendeten Methode nur bei 1 % (Swaminathan *et al.*, 2001) bis 6 % (Herring *et al.*, 2003) liegt.

Die in dieser Arbeit verwendete *En Passant*-Methode vereint die Vorteile der „*In-Out*“-Strategie und des direkten Ansatzes. Der zweistufige Rekombinationsprozess macht die *En Passant*-Methode durch die Möglichkeit von positiver Selektion und Gegenselektion zu

einer sehr effektiven Methode. Gleichzeitig verhindert die rückstandslose Entfernung des eingesetzten Selektionsmarkers störendes *Scarring* in der mutierten Sequenz.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt zehn virale Konstrukte hergestellt. Abhängig von den eingeführten Veränderungen in der Zielsequenz waren nach dem ersten Rekombinationsschritt 60-100 % der untersuchten Klone positiv bezüglich der Integration des Transferkonstruktes (Mittelwert 75 %). Die Effizienz der Ausrekombination des Selektionsmarkers im zweiten Rekombinationsschritt lag zwischen 11-100 % (Mittelwert 56 %) (siehe dazu auch Tab. C-1 und C-2). Die rückstandsfreie Entfernung des Selektionsmarkers ermöglicht darüber hinaus beliebig viele aufeinanderfolgende Veränderungen an beliebigen Sequenzbereichen. Auf diese Weise konnten in der Bacmidsequenz von EHV nicht nur Transgensequenzen (z.B. gfp, syngag) insertiert werden, sondern in einem nächsten Mutageneseschritt mit der *En Passant*-Methode auch die UL48-Region entfernt werden.

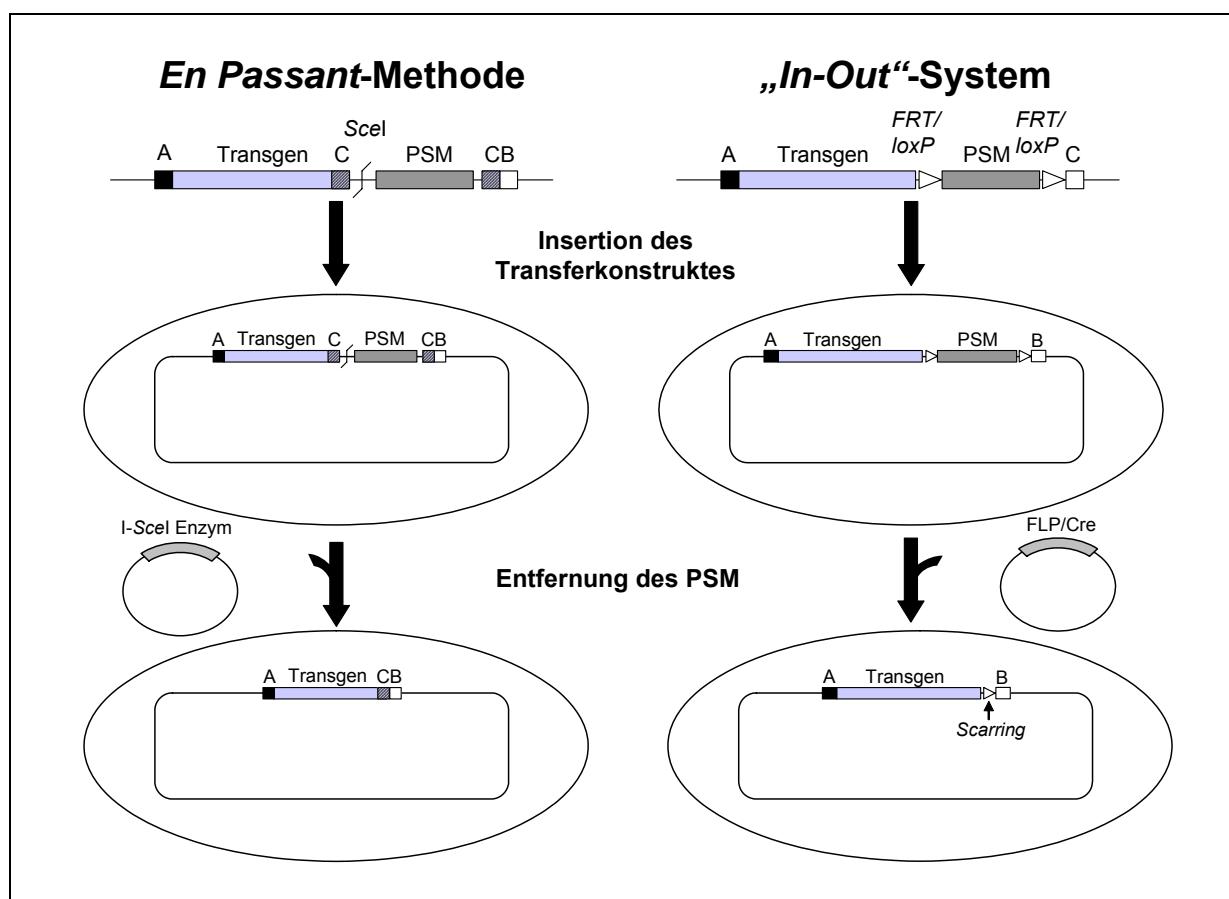


Abb. D-1: Schematische Darstellung von *En Passant*-Methode und „*In-Out*“-Strategie

Beide Methoden beruhen auf einem zweistufigen homologen Rekombinationsprozess. Im ersten Schritt ermöglicht ein positiver Selektionsmarker (PSM) die einfache Selektion von Rekombinanten. Beim Entfernen des Selektionsmarkers im zweiten Rekombinationsschritt ist die *En Passant*-Methode herkömmlichen „*In-Out*“-Strategien überlegen. Bei der *En Passant*-Methode wird der PSM rückstandsfrei entfernt. Bei Verwendung des *Cre/lox*-Systems oder des *FLP/FRT*-Systems bleiben Signalsequenzen (*loxP/ FRT*) in der mutierten Sequenz zurück (*Scarring*)

A, B: Sequenzbereiche homolog zum umgebenden Bereich der Insertionsstelle im Bacmid; C: Interne homologe Sequenzbereiche, die Teil der gewünschten Transgensequenz sind; I-SceI: Erkennungssequenz der *Homing Endonuklease I-SceI*

Zusammenfassend lässt sich demnach festhalten, dass die Herstellung rekombinanter EHV unter Verwendung von BAC-Technologie und *En Passant*- Mutagenese schnell, effizient und kostengünstig möglich ist. Dabei ermöglicht die BAC-Technologie die klonale Vermehrung der viralen DNA in Prokaryonten und umgeht damit aufwändige Plaque-Aufreinigungsschritte.

Die *En Passant*-Methode, die für die Mutagenese der viralen Sequenz verwendet wurde, ist beliebig oft auf dasselbe Bacmid anwendbar und ist gleichzeitig hocheffizient. Die Effizienzen alternativer Rekombinationsstrategien werden so bis um den Faktor 10 übertroffen.

D.2 Evaluierung von EHV-1 als virales Vektorsystem

D.2.1 Induktion spezifischer Immunantworten

Von großer Bedeutung für den Einsatz eines Vektorsystems für Vakzineapplikationen ist die Stärke und die Art der Immunantworten, die gegen ein spezifisches Transgen induziert werden.

Um das Potential von rekombinantem EHV als Vektorsystem dahingehend bewerten zu können, wurden Transgen-spezifische zelluläre, humorale und mukosale Immunantworten nach der Applikation von rekombinantem EHV im BALB/c -Mausmodell ermittelt. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Untersuchung des Einflusses von Immunisierungsdosis, Applikationsweg und unterschiedlichen *Prime/ Boost*-Strategien auf die induzierten Transgen-spezifischen Immunantworten. Als spezifisches Transgen wurde ein auf den Codon-Gebrauch von Säugetieren optimiertes HIV-1 Gag-Konstrukt (syngag) verwendet. Dabei handelt es sich um keinen expliziten HIV-Vakzinekandidaten, sondern lediglich um ein Reporterkonstrukt, das ein zuverlässiges Auslesen Antigen-spezifischer Immunantworten ermöglicht.

D.2.1.1 Geringe Mengen von EHV-syngag induzieren Transgen-spezifische zelluläre Immunantworten

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass rekombinantes EHV-syngag bereits ab einer Menge von 4×10^4 pfu in der Lage ist, im BALB/c -Mausmodell gute Gag-spezifische zelluläre Immunantworten zu induzieren (siehe Abb. C-12). Durch Erhöhung auf bis zu 1×10^7 pfu konnte die Stärke der spezifischen zellulären Immunantwort noch weiter gesteigert werden (siehe Abb. C-26). Als standardisierte Applikationsmenge für die rekombinanten Viren wurden aufgrund der guten Immunisierungsergebnisse für weitere Untersuchungen 4×10^5 pfu festgelegt. Im Vergleich zu gut etablierten Vektorsystemen wie dem replikationsdefizienten adenoviralen Vektor Ad5 oder den Säuger-Pockenviren NYVAC und MVA ist dies eine sehr niedrige Immunisierungsdosis. So werden für die Immunisierung von Mäusen mit Ad5 üblicherweise 1×10^7 - 1×10^9 infektiöse Partikel eingesetzt (Pinto *et al.*, 2003;

Yoshida *et al.*, 2001), für MVA oder NYVAC sind es in der Regel 1×10^7 (Gomez *et al.*, 2007a). Niedrigere Applikationsmengen sind für ein Vektorsystem wünschenswert, da sie sich positiv auf Herstellungskosten auswirken und das Risiko eventueller unerwünschter Nebenwirkungen absenken.

Die Stärke der induzierten Immunantworten ist jedoch nicht nur abhängig von der Menge des eingesetzten Virus, sondern auch von dem verwendeten Applikationsweg. So ergaben sich besonders gute Immunisierungsergebnisse für intraperitoneale und nasale Applikation von EHV, wohingegen durch subkutane, intramuskuläre oder intravenöse Verabreichung einer entsprechenden Virusmenge nur eine moderate Gag-spezifische Immunantwort induziert werden konnte (siehe Abb. C-12).

Von besonderem Interesse ist bei den unterschiedlichen Applikationswegen die nasale Verabreichung, da auf diese Weise neben einer systemischen auch eine mukosale Immunantwort hervorgerufen werden kann. Über letztere ist bekannt, dass sie nicht nur lokal auf die Schleimhaut begrenzt ist, an der sie induziert wurde (Vancott *et al.*, 1998; Ogra *et al.*, 2001), sondern auch an weiteren Schleimhäuten im Körper nachgewiesen werden kann. Gerade im Kontext einer HIV-Vakzine ist die Induktion mukosaler Immunantworten besonders wichtig, da die Schleimhäute eine Haupteintrittspforte für das Virus darstellen und HIV-spezifische Schleimhautimmunantworten in Hochrisikogruppen als Korrelat einer schützenden Immunantwort beobachtet wurden (Kaul *et al.*, 1999; Mazzoli *et al.*, 1999).

D.2.1.2 *Heterologer Prime/ Boost mit DNA/ EHV induziert starke Transgen-spezifische Titer von sekretorischem Immunglobulin A (sIgA)*

Vorrangiges Ziel bei der Untersuchung mukosaler Immunantworten, war die Beantwortung der Frage, ob und wie stark rekombinantes EHV-syngag in BALB/c-Mäusen eine Transgen-spezifische Schleimhautimmunantwort induzieren kann. Dafür wurden die Titer sekretorischer IgA-Antikörper (sIgA) in bronchoalveolaren Lavagen immunisierter Mäuse bestimmt. Sekretorische IgA kommen nur in Schleimhautsekreten vor und dazu meist nur in geringen Mengen, wodurch quantitative Analysen oft schwer sind. Viele Forschergruppen behelfen sich bei Angaben zu sIgA deshalb mit qualitativen Aussagen ohne Angabe von IgA-Titern (Vecino *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2007; Albu *et al.*, 2003). Durch geeignete mukosale Adjuvanzien wie zum Beispiel die Choleratoxin Untereinheit B (CTB) oder CpG-Oligonukleotide können sIgA-Titer bis auf detektierbare Mengen angehoben werden, die jedoch üblicherweise Werte von 100-1000 nicht übersteigen (Stambas *et al.*, 2005; McCluskie und Davis, 1998).

Die Quantifizierung Gag-spezifischer sIgA in bronchoalveolaren Lavagen immunisierter BALB/c-Mäuse ergab, dass durch EHV-syngag nach einmaliger oder mehrmaliger nasaler Applikation nur sehr niedrige Gag-spezifische sIgA-Titer am Rande der Nachweigrenze

hervorgerufen werden (slgA Titer ≤ 10). Durch die Verwendung eines heterologen *Prime-Boost* Verfahrens bestehend aus subkutanem DNA-syngag *Priming* und zwei nasalen EHV-syngag *Boosts* konnten wesentlich höhere slgA-Titer (bis zu Werten von 160) induziert werden (Siehe Abb. C-14, C-27). Besonders interessant ist dabei, dass eine systemisch applizierte Komponente (DNA-syngag), die allein nicht in der Lage ist, die Bildung spezifischer slgA zu induzieren, dennoch als *Priming* für eine mukosale Immunantwort dienen kann.

Dies bedeutet, dass rekombinantes EHV-syngag bei Verwendung einer geeigneten Immunisierungsstrategie eine gute mukosal-humorale Immunantwort induzieren kann. Die Bewertung dieses Ergebnisses vor dem Hintergrund gut untersuchter Vektorsysteme wie Ad5 oder pockenviraler Vektoren ist jedoch schwierig. Vergleichbare heterologe Immunisierungsstrategien, in denen MVA oder Ad5 für den nasalen *Boost* eingesetzt wurden lassen im Wesentlichen nur eine qualitative Aussage über induzierte slgA zu, da die Mengen für eine Titerbestimmung nicht ausreichen (Gherardi *et al.*, 2004; Lemiale *et al.*, 2003). Die durch EHV induzierten slgA Titer sind also höher als die durch nasale Applikation von MVA und Ad5 hervorgerufenen Titer. Einschränkend muss jedoch hinzugefügt werden, dass bei den Studien mit MVA und Ad5 Speichel und vaginale Spülflüssigkeit als Ausgangsmaterial für die slgA-Bestimmung verwendet wurden. Die durch EHV induzierten slgA Titer wurden hingegen in bronchoalveolaren Lavagen immunisierter Tiere bestimmt. Während die slgA Titer nach EHV-Applikation also direkt am Ort der primären Induktion (Lunge) bestimmt wurden, erfolgte der Nachweis im Fall von MVA und Ad5 an sekundären Effektorstellen (Vagina, Mundschleimhaut). Demnach ist unklar, ob unter diesen Voraussetzungen ein unmittelbarer Vergleich zwischen den unterschiedlichen Vektorsystemen gezogen werden kann.

Für die Zulässigkeit eines solchen Vergleichs spricht die Tatsache, dass sowohl im Mausmodell als auch im Menschen gezeigt werden konnte, dass nasale Immunisierungen auch eine mukosale Immunantwort in der vaginalen Schleimhaut und der Mundschleimhaut hervorrufen können (Yuki *et al.*, 2007; Bergquist *et al.*, 1997). Ferner gilt die intranasale Applikation eines Antigens in Mäusen sogar als der beste Ansatz zur Induktion Antigen-spezifischer Antikörper an der vaginalen Schleimhaut, da durch nasale Applikation an der Vaginalschleimhaut bessere Immunisierungsergebnisse erzielt werden als mit einer vaginalen Immunisierung (Eriksson und Holmgren, 2002). Von noch höherer Relevanz für eine schützende HIV-Vakzine wäre die Induktion von mukosaler Immunität im Rektum der immunisierten Mäuse. Die Umsetzung von Rektal-Lavagen bzw. der Untersuchung von Faeces der immunisierten Mäuse auf Einzelmausniveau ist technisch schwierig und erfordert enorme Tierstallkapazitäten, die im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Verfügung standen.

Unberücksichtigt bleibt bei dem Vergleich zwischen den unterschiedlichen Vektorsystemen allerdings die zelluläre Komponente der mukosalen Immunantwort. Sowohl MVA als auch Ad5 können durch nasale Applikation die Bildung spezifischer IFN γ -produzierender CD8 $^{+}$ -Zellen in den Lymphknoten des genito-urinalen Trakts hervorrufen (Gherardi *et al.*, 2004; Lemiale *et al.*, 2003). Diese Fragestellung wurde für EHV im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten grundlegenden Untersuchungen zur Bewertung des Potentials von EHV als neuem viralen Vektorsystem nicht berücksichtigt. Um einen fundierten Bezug zwischen Ad5, MVA und EHV herstellen zu können, ist deshalb eine differenziertere Untersuchung der durch EHV induzierten mukosalen Immunantworten notwendig.

Zusammengefasst lässt sich basierend auf den bisherigen Ergebnissen festhalten, dass rekombinantes EHV-syngag unter Anwendung geeigneter heterologer *Prime-Boost* Strategien (subkutanes DNA-syngag *Priming* und zweifacher nasaler *Boost* mit EHV-syngag) in der Lage ist, in Mäusen gute Gag-spezifische sIgA-Titer zu induzieren. Diese sind in ihrer Höhe vergleichbar mit Titern, die durch starke mukosale Adjuvanzien wie CTB- oder CpG-Oligonukleotide hervorgerufen werden. Für die Verwendung von EHV als Vektorsystem bedeutet dies, dass das Virus hinsichtlich der Induktion eines mukosalen Immunschutzes ein besonders interessanter Kandidat ist.

D.2.1.3 Heterologer Prime/ Boost mit DNA/ EHV induziert gute Th1-polarisierte systemische Immunantworten

Neben der Induktion mukosaler Immunantworten wurden auch Stärke und Art der durch EHV induzierten systemischen Immunantworten untersucht.

Dabei zeigte sich, dass rekombinantes EHV-syngag nach einmaliger Anwendung oder unter Verwendung homologer *Prime-Boost*-Strategien nur die Bildung geringer Mengen Gag-spezifischer Immunglobuline im Serum immunisierter BALB/c Mäuse induziert.

Durch Verwendung einer geeigneten heterologen *Prime-Boost*-Strategie bestehend aus einem systemisch applizierten DNA-syngag *Priming* gefolgt von einer oder zwei nasalen EHV-syngag *Booster*-Immunisierungen konnte die Gag-spezifische Immunglobulinmenge drastisch gesteigert werden (siehe Abb. C-14/ C-16/ C-27).

Die weitere Analyse der gebildeten Immunglobulin G (IgG) Subtypen IgG1 und IgG2a ergab, dass nach Immunisierung anteilmäßig mehr IgG2a als IgG1 gebildet wurde (siehe Abb. C-16). Antikörper des Subtyps IgG1 werden in B-Zellen gebildet, nachdem diese durch CD4 $^{+}$ Th2-Helferzellen aktiviert wurden. Durch die Ausschüttung Th2-spezifischer Cytokine (TGF- β , IL10) wird durch Th2-Helferzellen darüber hinaus vor allem der humorale Arm des adaptiven Immunsystems gestärkt. Die Sekretion des Antikörper-Subtyps IgG2a durch B-Zellen wird dagegen durch CD4 $^{+}$ Th1-Helferzellen induziert. Durch Sekretion Th1-spezifischer Cytokine (IFN γ , IL2) werden vor allem cytotoxische T-Zellen (CTL) und

Makrophagen aktiviert und dadurch vor allem die Ausbildung zellulärer Immunantworten positiv beeinflusst (Janeway *et al.*, 2001).

Das Überwiegen von IgG2a gegenüber IgG1 bedeutet somit, dass es in Mäusen nach Immunisierung mit rekombinantem EHV-syngag vor allem zur Ausbildung zellulärer Immunantworten kommt. Im Rückschluss kann man außerdem folgern, dass das Auftreten von Gag-spezifischen IgG2a Antikörpern ein Indikator für das Vorhandensein Transgen-spezifischer IFN γ sezernierender CD4 $^{+}$ Th1-Zellen ist.

HIV-*Elite Controller*, die die Viruslast während einer chronischen HIV-Infektion über lange Zeiträume gut kontrollieren können, weisen häufig HIV-spezifische CD4 $^{+}$ und HIV-spezifische CD8 $^{+}$ T-Zellen auf, die sich in kurzlebige, IFN γ -produzierende akute Effektor-T-Zellen und langlebige IFN γ - und IL2-produzierende, proliferierende *Memory*-T-Zellen unterteilen lassen (Pantaleo und Koup, 2004; Sallusto *et al.*, 2004). Solche sogenannten polyfunktionalen T-Zellimmunantworten werden deshalb auch als Korrelat einer schützenden Immunantwort gegen HIV betrachtet (Harari *et al.*, 2008)

Das Vorhandensein von IFN γ sezernierenden CD4 $^{+}$ Zellen nach Applikation von EHV allein ist kein hinreichender Indikator dafür, dass durch EHV polyfunktionale T-Zell-Immunantworten induziert werden. Das Auftreten dieser Zellen ist jedoch Grundlage für den Aufbau einer solchen Immunantwort. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Daten liefern demnach einen Anhaltspunkt dafür, dass ein heterologer *Prime/ Boost* mit DNA/ EHV den Aufbau polyfunktionaler T-Zell-Immunantworten induzieren kann. Diese vorläufigen Ergebnisse müssen jedoch im Rahmen weiterer Untersuchungen, wie dem direkten Nachweis Transgen-spezifischer CD4 $^{+}$ Zellen und der Ermittlung spezifischer Cytokinmuster, wie IL2 und IFN γ , unbedingt weiter abgesichert werden.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass rekombinantes EHV-syngag unter Anwendung geeigneter heterologer *Prime-Boost*-Strategien in Mäusen die Bildung großer Mengen von Gag-spezifischen Antikörpern vermittelt. Die mengenmäßige Verteilung der gebildeten IgG Subtypen zeigt darüber hinaus, dass die durch EHV induzierte Immunantwort Th1-polarisiert ist und dementsprechend besonders der zelluläre Arm der adaptiven Immunabwehr stimuliert wird.

D.2.1.4 Heterologer Prime/ Boost mit DNA/ EHV löst im Mausmodell starke Transgen-spezifische CTL- Immunantworten aus

Wie bereits beschrieben, ist EHV schon bei der Verabreichung geringer Immunisierungsdosen über verschiedene Applikationswege in der Lage, gute zelluläre Immunantworten in BALB/c Mäusen zu induzieren (siehe D.2.1.1). Als Maß für die zelluläre Immunantwort wurde der Anteil der CD8 $^{+}$ Zellen in immunisierten Mäusen bestimmt, die nach Restimulation mit einem Gag-spezifischen Peptid IFN γ sekretieren. Diese

Zellpopulation entspricht den cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL), die nach Aktivierung spezifisch auf MHC-I Molekülen präsentiertes Antigen erkennen und die präsentierende Zelle lysieren. Besonders bei der Kontrolle viraler Infektionen spielen CTL eine wichtige Rolle (Janeway *et al.*, 2001).

Gute CTL-Immunantworten werden im Mausmodell durch die systemische Applikation von DNA-Vektoren induziert (Ulmer *et al.*, 1993). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein heterologer *Prime/ Boost* bestehend aus einem subkutan applizierten DNA-syngag *Priming* gefolgt von einer bzw. zwei nasalen EHV-syngag *Booster*-Immunisierungen sogar eine stärkere Gag-spezifische Immunantwort induziert als die zweimalige systemische Verabreichung eines DNA-syngag Konstruktes (Abb. C-14/ C-15). Dies bedeutet, dass mukosal appliziertes EHV-syngag in der Lage ist, auch systemisch eine sehr gute zelluläre Immunantwort hervorzurufen.

Versucht man die Stärke der induzierten zellulären Immunantwort vor dem Hintergrund gut etablierter Vektorsysteme zu beurteilen, so ergibt sich bei Abgleich der eigenen Daten mit der gängigen Literatur folgendes Bild: Die Gag-spezifische zelluläre Immunantwort, die durch ein systemisches DNA-syngag *Priming* und einen nasalen *Boost* mit rekombinantem EHV-syngag induziert wird (siehe Abb. C-15) ist weniger stark als die zelluläre Immunantwort, die durch eine systemisch applizierte Kombination aus DNA und dem pockenviralen Vektor NYVAC hervorgerufen wird. Im Vergleich zu einer ebenfalls systemisch applizierten Kombination bestehend aus DNA und MVA, ist die durch heterologen *Prime/ Boost* mit DNA/ EHV hervorgerufene zelluläre Immunantwort jedoch genauso gut (Gomez *et al.*, 2007a). Der dargestellte Bezug zwischen den unterschiedlichen Vektorsystemen beruht jedoch lediglich auf dem theoretischen Vergleich eigener Daten mit in der Literatur veröffentlichten Immunisierungsergebnissen für MVA und NYVAC. Um eine unmittelbaren Vergleich zwischen den unterschiedlichen Systemen ziehen zu können, müssen alle viralen Konstrukte parallel in einer gemeinsamen Mausstudie ausgetestet werden. Die viralen Konstrukte, die für eine solche vergleichende Studie notwendig sind, wurden bereits im Rahmen dieser Arbeit generiert.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass ein heterologer *Prime/ Boost* bestehend aus DNA *Priming* und mukosal verabreichtem EHV *Boost* im Mausmodell eine sehr gute Transgen-spezifische systemische CTL-Immunantwort auslöst.

D.2.2 Vektorimmunität

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigt sich sehr deutlich, dass die besten EHV-induzierten mukosalen und systemischen Transgen-spezifischen Immunisierungsergebnisse bei der Verwendung einer heterologen *Prime-Boost*-Strategie erzielt werden. Homologe *Prime-Boost*-Strategien mit EHV induzieren im Vergleich wesentlich schlechtere Transgen-spezifische Immunantworten (siehe Abb. C-14/ C-15).

Dies legt den Verdacht nahe, dass nach einmaliger Applikation des viralen Vektors nicht nur eine Transgen-spezifische Immunantwort induziert wird, sondern auch eine Immunantwort gegen den Vektor selbst. Experimentell wird dieser Verdacht durch die Beobachtung erhärtet, dass nach einem nasalen *Priming* mit EHV-gfp durch eine nachfolgende nasale Immunisierung mit EHV-syngag keine Gag-spezifische Immunantwort induziert werden kann (siehe Abb. C-12). Darüber hinaus zeigt sich in der Stärke der induzierten zellulären Immunantworten kein Unterschied zwischen einer einmaligen oder einer zweimaligen nasalen Applikation des EHV-syngag Konstruktes (siehe Abb. C-15), was belegt, dass eine durch EHV-induzierte zelluläre Immunantwort nicht durch einen homologen *Boost* verstärkt werden kann.

Auch in Pferden induzieren Infektionen mit dem equinen Herpesvirus Typ 1 kurzfristig einen Immunschutz gegen den Erreger. Dieser Immunschutz ist gekennzeichnet durch das Auftreten Komplement-aktivierender Antikörper (nachweisbar bis 3 Monate nach Infektion) (Thomson *et al.*, 1976) und neutralisierender Antikörper (nachweisbar bis zu 1 Jahr nach Infektion), die vorwiegend gegen die viralen Glykoproteine gB und gC gerichtet sind (Allen *et al.*, 1992). Diese EHV-spezifische humorale Immunantwort schließt auch die Bildung mukosaler IgA Antikörper mit ein, die zwar nur kurze Zeit nachweisbar sind, aber durch mehrfachen Kontakt mit dem Erreger auch langfristiger induziert werden (Breathnach *et al.*, 2001). Darüber hinaus werden durch virale Exposition auch EHV-spezifische CD8⁺ T-Zellen und in geringerem Maße auch CD4⁺ T-Zellen induziert (Breathnach *et al.*, 2005). Die schützende Wirkung dieser Immunantworten klingt jedoch schon innerhalb weniger Monate nach Immunisierung ab (Kydd *et al.*, 2006). Verantwortlich für die Abnahme der Immunantwort scheinen die zahlreichen Immunevasionsstrategien von EHV-1 zu sein, auch wenn dieser Zusammenhang noch nicht vollständig erforscht ist (Slater *et al.*, 2006).

Überträgt man die Erkenntnisse über EHV-spezifische Immunantworten im Pferd auf das Mausmodell, so lässt sich ableiten, dass die experimentell beobachtete Vektorimmunität nicht dauerhaft ist. Auf diese Weise wäre theoretisch auch ein mehrfacher Einsatz von EHV im Rahmen von Auffrischimpfungen unter Einhaltung längerer, fester Zeitabstände möglich. Auf die mehrfache Anwendung von EHV innerhalb kurzer Zeitintervalle wirkt sich die induzierte Vektorimmunität allerdings störend aus (siehe dazu auch Immunisierungsstudien

Kapitel C.2 und C.3.3.2). Bei der Wahl geeigneter EHV-Immunisierungsstrategien sind deshalb heterologe *Prime-Boost*-Verfahren homologen Anwendungen vorzuziehen.

Die besten Immunisierungsergebnisse konnten in dieser Arbeit mit einem DNA *Priming* und zwei nasalen EHV *Booster*-Immunisierungen erzielt werden. Im weiteren konnte gezeigt werden, dass eine zweimalige nasale EHV-Applikation aufgrund der entstehenden Vektorimmunität keine bessere zelluläre Immunantwort induziert als eine einmalige nasale Verabreichung von EHV (siehe Abb. C-15). Eine EHV-induzierte zelluläre Immunantwort kann jedoch durch Erhöhung der Immunisierungsdosis von 10^5 auf 10^7 pfu deutlich gesteigert werden (siehe Abb. C-25). Unter Berücksichtigung der experimentellen Daten könnte es deshalb für die Induktion noch besserer zellulärer Immunantworten für zukünftige Immunisierungen von Vorteil sein, die zwei nasalen EHV *Boosts* durch einen einzigen höherdosierten nasalen *Boost* (10^7 pfu) zu ersetzen. Diese veränderte Immunisierungsstrategie ist allerdings wirklich nur für die Verbesserung zellulärer Immunantworten von Vorteil.

Für die Induktion von sIgA konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass wesentlich höhere Gag-spezifische Titer induziert werden, wenn nach systemisch appliziertem DNA *Priming* zwei nasale EHV *Boosts* folgen, als wenn nur ein nasaler EHV *Boost* durchgeführt wird (siehe Abb. C-14/ C-16). Dies zeigt, dass es trotz Vektorimmunität im mukosalen Kompartiment durch den zweifachen homologen *Boost* zu einer Verstärkung der Transgen-spezifischen Immunantwort kommt. Darüber hinaus bewirkt der mehrfache Kontakt mit dem Virus zumindest im Pferd die Induktion einer langanhaltenderen IgA-Immunantwort. Da mukosale Immunantworten gerade im Kontext einer HIV-Vakzine eine wichtige Rolle spielen, sprechen diese Beobachtungen dafür, die zweite nasale *Booster*-Immunisierung beizubehalten. Die beste Immunisierungsstrategie zur Induktion einer umfassenden Transgen-spezifischen Immunantwort unter Berücksichtigung der experimentell ermittelten Daten sollte demnach ein systemisch appliziertes DNA *Priming* gefolgt von zwei nasalen EHV *Boosts* mit einer Dosis von 10^7 pfu sein.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass EHV im Mausmodell zwar Vektorimmunität induziert, die Erfahrungen aus dem equinen Tiermodell lassen jedoch vermuten, dass die entstehende Vektorimmunität zeitlich begrenzt ist. Ein mehrfacher Einsatz des Vektors unter Einhaltung längerer Zeitabstände (≥ 1 Jahr) wäre damit möglich; für Immunisierungsstrategien innerhalb eines kurzen Zeitraums sollten heterologe Systeme verwendet werden.

D.2.3 Vektorsicherheit

Bei der Evaluierung eines Vektorsystems nimmt die Sicherheit des Systems einen hohen Stellenwert ein. Die Replikation des in dieser Arbeit verwendeten EHV-Stamms Rach ist *in vitro* in humanen Zellen zwar stark vermindert, aber nicht vollständig inhibiert. Ein Ziel dieser

Arbeit war es deshalb, durch Deletion des UL48-Leserahmens eine replikationsdefiziente Mutante zu generieren und ihr immunogenes Potential näher zu untersuchen.

D.2.3.1 Modellvorstellung zum Replikationsdefekt UL48-deletierter Viren

Das Protein eTIF, das im UL48-Leserahmen von EHV codiert ist, hat zwei zentrale Funktionen in der viralen Replikation. Zum einen wirkt es transaktivierend auf den Promotor des einzigen *Immediate Early* Gens von EHV-1, zum anderen ist es als wichtiger struktureller Bestandteil des Teguments maßgeblich am viralen *Assembly* beteiligt (Lewis *et al.*, 1993; Lewis *et al.*, 1997; Purewal *et al.*, 1994).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Hilfe von Infektionskinetiken gezeigt werden, dass sich das Fehlen des UL48-Leserahmens nachteilig auf die virale Replikation auswirkt. *In vitro* kommt es in humanen Zellen sogar zu einem völligen Replikationsverlust (siehe Abb. C-24), während eine Infektion von permissiven Zellen nach anfänglicher Freisetzung von Nachkommenviren selbstlimitierend verläuft (siehe Abb. C-22).

Der selbstlimitierende Charakter der Infektion lässt sich mit folgender Modellvorstellung gut erklären (siehe auch Abb. D-2): Nach Infektion der nicht-komplementierenden Zellen durchläuft das Virus zunächst noch einen oder mehrere Replikationszyklen. Durch die fehlende Neusynthese des UL48-Proteins eTIF werden im Vergleich zum Wildtyp-Virus dabei weniger infektiöse Partikel freigesetzt, da nur das initial bei Infektion in die Zelle eingebrachte eTIF für Transaktivierung und *Assembly* benutzt werden kann. Durch stetige Ausverdünnung des essentiellen Tegumentproteins UL48 kommt die virale Replikation schließlich zum Erliegen. Die replikationsdefekten Viren können zwar noch Zellen infizieren, aber keine Nachkommenviren mehr bilden, wodurch die Virusmenge im Überstand immer mehr abnimmt (siehe Abb. C-22).

Auf die Situation in humanen Zellen ist dieses Modell nicht unmittelbar übertragbar, da nach Infektion mit UL48-deletierten Viren keine Produktion von Nachkommenviren mehr nachgewiesen werden kann. Nachdem die Replikation von UL48-haltigem EHV in humanen Zellen aber auch schon stark vermindert ist, handelt es sich bei dem vollständigen Replikationsdefekt von UL48-deletierten Viren in humanen Zellen wahrscheinlich nicht um einen anderen Defekt, sondern vielmehr um die Addition negativer Effekte.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass UL48-deletierte Viren *in vitro* in humanen Zellen replikationsdefizient sind und demnach ein besseres Sicherheitsprofil haben als UL48-haltige Viren.

D.2.3.2 Replikationskompetentes versus replikationsdefizientes EHV- Beurteilung des immunogenen Potentials UL48-deletierter Viren

Die Erhöhung der Vektorsicherheit geht oft mit der Attenuierung des viralen Vektors und damit auch mit verminderter Immunogenität einher. Dies trifft auch auf die UL48-deletierten EHV zu. So konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die durch EHV Δ48-induzierte Transgen-spezifische zelluläre Immunantwort am Rande der Nachweisgrenze liegt und damit deutlich schwächer ist als die Immunreaktion, die durch das entsprechende EHV Ausgangskonstrukt hervorgerufen wird (siehe Abb. C-25).

Dieser Sachverhalt lässt sich wahrscheinlich dadurch erklären, dass nach Infektion mit den UL48-deletierten Viren keine Nachkommenviren gebildet werden und demnach eine Verstärkung der Immunantwort durch Infektion weiterer Zellen ausbleibt. Dadurch wird zum einen weniger Transgen exprimiert und präsentiert, wodurch die spezifische Immunstimulation geringer ist und deshalb auch schwächere Immunantworten induziert werden. Zum anderen stellt aber auch die ablaufende Infektion als solche einen Immunstimulus dar. So konnte in aktuellen Experimenten der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass rekombinantes EHV-syngag in der Lage ist, primäre humane *Monocyte Derived Dendritic Cells* (MDDC) zu infizieren und in der Folge eine starke Cytokinsekretion sowie eine verstärkte Expression spezifischer Maturationsmarker auf der Membranoberfläche hervorzurufen (Böckl, Köstler; unveröffentlichte Daten). Diese Stimulation des innaten Immunsystems und die dadurch bedingte inflammatorische Reaktion wirken sich daher vermutlich im Menschen adjuvierend auf die Induktion humoraler und zellulärer Immunantworten aus. Ist die Stimulation des innaten Immunsystems aufgrund des Replikationsdefekts des verwendeten Virus weniger stark, sollte der Adjuvanzeffekt schwächer und infolge dessen auch die Transgen-spezifische Immunantwort beeinträchtigt sein.

Positiv könnte sich dabei auswirken, dass durch Applikation des UL48-deletierten Virus nicht nur eine schwächere Transgen-spezifische Immunantwort induziert wird, sondern eventuell auch nur eine schwache Vektorimmunität auftritt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Untersuchung dieses Sachverhaltes zeigten jedoch, dass zumindest im Mausmodell auch UL48-deletierte Viren eine starke Vektorimmunität induzieren, die nach einem nasalen *Priming* mit EHV Δ48-gfp durch eine nachfolgende nasale Immunisierung mit EHV-syngag eine Gag-spezifische zelluläre Immunantwort verhindert (siehe Abb. C-26).

Gute Transgen-spezifische Immunantworten können mit UL48-deletierten Viren nur dann induziert werden, wenn das Virus als *Boosting*-Reagenz in einer heterologen Immunisierungsstrategie eingesetzt wird. Die im Rahmen dieser Arbeit ausgetestete Strategie basiert auf einem systemischen DNA *Priming* gefolgt von zwei nasalen EHV oder EHV Δ48 *Boosts*.

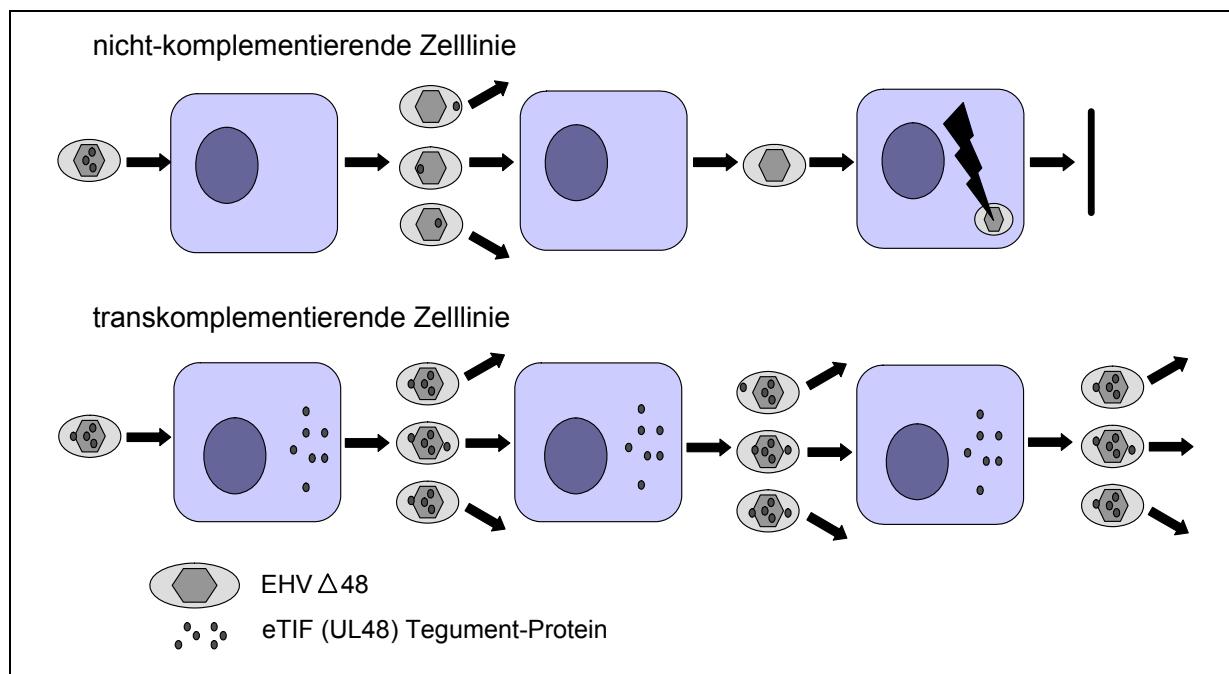


Abb. D-2: Schematische Modellvorstellung der Auswirkung des UL48-Defekts auf die EHV-1 Replikation in permissiven Zellen

UL48-deletierte Virus durchlaufen in nicht-komplementierenden Zellen zunächst noch mehrere Replikationszyklen, wobei infektiöse Partikel freigesetzt werden, in denen das ursprünglich eingebrachte UL48-Protein wiederverwendet wird. Die Menge an UL48-Protein nimmt aufgrund fehlender Neusynthese dabei immer mehr ab bis die virale Replikation schließlich zum Erliegen kommt. Zellen, die eTIF *in trans* komplementieren, kompensieren den viralen Defekt, so dass die virale Replikation unbeeinflusst bleibt.

Durch Erhöhung der Immunisierungsdosis von EHV Δ48 gegenüber UL48-haltigem EHV um den Faktor 10 konnte eine spezifische zelluläre Immunantwort induziert werden, die in ihrer Stärke der zellulären Immunantwort entspricht, die durch zwei zehnfach niedriger dosierte nasale EHV *Boosts* hervorgerufen wird (siehe Abb. C-27). Die unter den gleichen Immunisierungsbedingungen mit EHV Δ48 induzierte Transgen-spezifische mukosale Immunantwort ist sogar stärker als die durch eine entsprechende Immunisierung mit UL48-haltigen Viren ausgelöste Immunreaktion (siehe Abb. C-27). Dabei kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die stärkere mukosale Immunantwort, die durch EHV Δ48 hervorgerufen wird, lediglich durch die höhere Virusdosis bedingt ist.

Bewertet man das immunogene Potential UL48-deletierter Viren vor dem Hintergrund der erhobenen Daten, so lässt sich feststellen, dass diese Viren weit weniger immunogen sind als das entsprechende replikationskompetente EHV Ausgangskonstrukt. Nur als *Boosting* Reagenz im heterologen *Prime/ Boost* können mit dem Virus gute Immunisierungsergebnisse erzielt werden. Damit sind auch UL48-deletierte EHV prinzipiell für den heterologen Gentransfer geeignet. Interessanter für eine mögliche Anwendung ist jedoch die Tatsache, dass EHV Δ48 allein auch bei Applikation in hohen Immunisierungsdosen nur sehr geringe zelluläre Immunantworten auslöst. Dies macht das UL48-deletierte Virus zu einem besonders interessanten Kandidaten für gentherapeutische

Anwendungen, in denen im Gegensatz zu Vakzinierungsstrategien die niedrige Immunogenität des Vektors notwendig ist.

D.3 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass rekombinantes EHV basierend auf dem Impfstamm RacH in der Lage ist, gute Transgen-spezifische systemische und mukosale Immunantworten im BALB/c Mausmodell zu induzieren. Damit konnte grundlegend bestätigt werden, dass das Equine Herpesvirus Typ 1 als viraler Vektor für den heterologen Gentransfer geeignet ist.

D.3.1 Durchführung von Studien zur Biodistribution und Toxizität von EHV-1

Um die Etablierung von EHV-1 als Vektorsystem weiter voranzutreiben, sollten im nächsten Schritt umfassende Studien zu Toxizität und Biodistribution des Virus im Tiermodell vorgenommen werden. Besondere Beachtung muss dabei der Frage zukommen, inwieweit bei dem verwendeten Virusstamm RacH die Gefahr von Neurotoxizität gegeben ist. Bevorzugtes Ziel für Infektion, Replikation und Latenz von pathogenen EHV-1 Stämmen sind im Pferd zwar die PBMC, jedoch kann das Virus in seltenen Fällen auch im Zentralnervensystem nachgewiesen werden. Der Ausschluss potentieller Sicherheitsrisiken ist deshalb eine wesentliche Voraussetzung für die Verwendung von EHV-1 als virales Vektorsystem für therapeutische Anwendungen.

D.3.2 Weiterentwicklung des Vektors für Vakzinierungsapplikationen

Im weiteren sollten durch zusätzliche genetische Modifikation des viralen Vektors die positiven Eigenschaften des Vektorsystems für die jeweilige Anwendung verbessert werden. Durch Deletion von Proteinen, die an Immunevasionsprozessen des equinen Herpesvirus beteiligt sind, könnte das immunogene Potential des Vektors weiter gesteigert werden. Dies würde sich besonders bei Vakzinierungsansätzen positiv auswirken.

Darüber hinaus sollten die immunogenen Eigenschaften von rekombinantem EHV vor dem Hintergrund bereits gut etablierter Vektorsysteme wie zum Beispiel MVA oder NYVAC getestet und evaluiert werden. Bei guten Ergebnissen könnte rekombinantes EHV mittelfristig die Palette der aktuell verfügbaren Vektoren insbesondere im Hinblick auf die Vakzine-vermittelte Induktion protektiver, HIV-spezifischer Immunantworten sinnvoll ergänzen. So könnte EHV beispielsweise in heterologen *Prime-Boost* Ansätzen auch mit bereits etablierten Vektorsystemen kombiniert werden, wodurch die positiven Eigenschaften unterschiedlicher Vektorsysteme synergistisch genutzt werden können.

D.3.3 Weiterentwicklung des Vektors für gentherapeutische Anwendungen

Für gentherapeutische Anwendungen wäre hingegen die Generierung einer EHV- Mutante von besonderem Interesse, in der das *Immediate Early* Gen (IE) deletiert ist. Da die Expression aller viralen Gene von der Expression des IE Gens abhängig ist, ist seine Deletion die ideale Möglichkeit, die Expression aller viralen Gene vollständig zu unterdrücken. Das einzige viral codierte Gen, das nach Infektion exprimiert würde, wäre so das gewünschte Transgen – ein Idealfall für gentherapeutische Anwendungen. Der limitierende Faktor bei der Herstellung einer solchen Mutante ist derzeit das Fehlen einer geeigneten transkomplementierenden Zelllinie zur hochtitrigen Rekonstitution IE-deleterierter Viren. Die Herstellung einer solchen Zelllinie sollte deshalb ein weiteres Ziel für die zukünftige Arbeit mit EHV sein.

D.3.4 Einsatz von EHV-1 in der Diagnostik

Neben dem Einsatz von EHV für therapeutische Zwecke sollten ergänzend aber auch alternative Anwendungsgebiete für das Virus wie zum Beispiel im diagnostischen Bereich untersucht werden. Eine denkbare Möglichkeit wäre dabei der Einsatz von EHV zum kostengünstigen Auslesen von CTL Immunantworten. Bisher erfordert die Bestimmung solcher Immunantworten den Einsatz teurer Peptid-Pools mit denen CD8⁺ Zellen restimuliert werden. EHV ist in der Lage, primäre humane Antigen-präsentierende Zellen (B-Zellen, MDDC) zu infizieren, rekombinantes Protein über MHC-I Moleküle zu präsentieren und in der Folge CD8+ Zellen zu stimulieren. Rekombinantes Virus kann im Gegensatz zu Peptid Pools schnell und kostengünstig produziert werden, und könnte damit eine erfolgversprechende Alternative zur konventionellen Bestimmung von CTL-Immunantworten darstellen.

Abschließend lässt sich festhalten, dass das Equine Herpesvirus Typ 1 ein vielversprechender Kandidat für ein virales Vektorsystem ist, das sowohl großes Potential für therapeutische als auch für diagnostische Anwendungen zeigt und deshalb Gegenstand weiterer Forschung sein sollte.

Literaturverzeichnis

Adler,H., Messerle,M. und Koszinowski,U.H. (2003). Cloning of herpesviral genomes as bacterial artificial chromosomes. *Rev. Med. Virol.* 13, 111-121.

Adler,H., Messerle,M., Wagner,M. und Koszinowski,U.H. (2000). Cloning and mutagenesis of the murine gammaherpesvirus 68 genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *J. Virol.* 74, 6964-6974.

Albu,D.I., Jones-Trower,A., Woron,A.M., Stellrecht,K., Broder,C.C. und Metzger,D.W. (2003). Intranasal vaccination using interleukin-12 and cholera toxin subunit B as adjuvants to enhance mucosal and systemic immunity to human immunodeficiency virus type 1 glycoproteins. *J. Virol.* 77, 5589-5597.

Alimonti,J.B., Kimani,J., Matu,L., Wachihi,C., Kaul,R., Plummer,F.A. und Fowke,K.R. (2006). Characterization of CD8 T-cell responses in HIV-1-exposed seronegative commercial sex workers from Nairobi, Kenya. *Immunol. Cell Biol.* 84, 482-485.

Allen, G. P., Coogle, L. D., Ostlund, E. N. und Yeargan, M. R. Molecular dissection of two major equine herpesvirus-1 glycoprotein antigens (gB and gC) that elicit humoral immune responses in horses. Rossdale, P. D. and Wade, J. F. 129-146. 1992. Newmarket,UK, R&W Publications. Equine Infectious Disease VI.

Ref Type: Serial (Book,Monograph)

Allen, G. P., Kydd, J. H., Slater, J. D. und Smith, K. C. Equid herpesvirus-1 (EHV-1) and -4 (EHV-4) infections. 829-859. 2004. Cape Town, South Africa, Oxford Press. Infectious Diseases of Livestock. Cohen, J. B. and Tustin, R. C.

Ref Type: Serial (Book,Monograph)

Amara,R.R., Villinger,F., Altman,J.D., Lydy,S.L., O'Neil,S.P., Staprans,S.I., Montefiori,D.C., Xu,Y., Herndon,J.G., Wyatt,L.S., Candido,M.A., Kozyr,N.L., Earl,P.L., Smith,J.M., Ma,H.L., Grimm,B.D., Hulsey,M.L., McClure,H.M., McNicholl,J.M., Moss,B. und Robinson,H.L. (2002). Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Vaccine* 20, 1949-1955.

Banchereau,J. und Steinman,R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.

Barouch,D.H., Kunstman,J., Kuroda,M.J., Schmitz,J.E., Santra,S., Peyerl,F.W., Krivulka,G.R., Beaudry,K., Lifton,M.A., Gorgone,D.A., Montefiori,D.C., Lewis,M.G., Wolinsky,S.M. und Letvin,N.L. (2002). Eventual AIDS vaccine failure in a rhesus monkey by viral escape from cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 415, 335-339.

Barre-Sinoussi,F., Chermann,J.C., Rey,F., Nugeyre,M.T., Chamaret,S., Gruest,J., Dauguet,C., Axler-Blin,C., Vezinet-Brun,F., Rouzioux,C., Rozenbaum,W. und Montagnier,L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868-871.

Baxi,M.K., Borchers,K., Bartels,T., Schellenbach,A., Baxi,S. und Field,H.J. (1996). Molecular studies of the acute infection, latency and reactivation of equine herpesvirus-1 (EHV-1) in the mouse model. *Virus Res.* 40, 33-45.

Bergquist,C., Johansson,E.L., Lagergard,T., Holmgren,J. und Rudin,A. (1997). Intranasal vaccination of humans with recombinant cholera toxin B subunit induces systemic and local antibody responses in the upper respiratory tract and the vagina. *Infect. Immun.* 65, 2676-2684.

Borst,E.M., Hahn,G., Koszinowski,U.H. und Messerle,M. (1999). Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants. *J. Virol.* 73, 8320-8329.

Bradford,M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Brave,A., Boberg,A., Gudmundsdotter,L., Rollman,E., Hallermalm,K., Ljungberg,K., Blomberg,P., Stout,R., Paulie,S., Sandstrom,E., Biberfeld,G., Earl,P., Moss,B., Cox,J.H. und Wahren,B. (2007a). A new multi-clade DNA prime/recombinant MVA boost vaccine induces broad and high levels of HIV-1-specific CD8(+) T-cell and humoral responses in mice. *Mol. Ther.* 15, 1724-1733.

Brave,A., Ljungberg,K., Wahren,B. und Liu,M.A. (2007b). Vaccine delivery methods using viral vectors. *Mol. Pharm.* 4, 18-32.

Breathnach,C.C., Soboll,G., Suresh,M. und Lunn,D.P. (2005). Equine herpesvirus-1 infection induces IFN-gamma production by equine T lymphocyte subsets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 103, 207-215.

Breathnach,C.C., Yeargan,M.R., Sheoran,A.S. und Allen,G.P. (2001). The mucosal humoral immune response of the horse to infective challenge and vaccination with equine herpesvirus-1 antigens. *Equine Vet. J.* 33, 651-657.

Broliden,K., Hinkula,J., Devito,C., Kiama,P., Kimani,J., Trabattoni,D., Bwayo,J.J., Clerici,M., Plummer,F. und Kaul,R. (2001). Functional HIV-1 specific IgA antibodies in HIV-1 exposed, persistently IgG seronegative female sex workers. *Immunol. Lett.* 79, 29-36.

Brune,W., Messerle,M. und Koszinowski,U.H. (2000). Forward with BACs: new tools for herpesvirus genomics. *Trends Genet.* 16, 254-259.

Campadelli-Fiume,G. und Roizman,B. (2006). The egress of herpesviruses from cells: the unanswered questions. *J. Virol.* 80, 6716-6717.

Cao,H., Kaleebu,P., Hom,D., Flores,J., Agrawal,D., Jones,N., Serwanga,J., Okello,M., Walker,C., Sheppard,H., El Habib,R., Klein,M., Mbidde,E., Mugyenyi,P., Walker,B., Ellner,J. und Mugerwa,R. (2003). Immunogenicity of a recombinant human immunodeficiency virus (HIV)-canarypox vaccine in HIV-seronegative Ugandan volunteers: results of the HIV Network for Prevention Trials 007 Vaccine Study. *J. Infect. Dis.* 187, 887-895.

Carter,D.M. und Radding,C.M. (1971). The role of exonuclease and beta protein of phage lambda in genetic recombination. II. Substrate specificity and the mode of action of lambda exonuclease. *J. Biol. Chem.* 246, 2502-2512.

Center of Disease Control (1981). *Pneumocystis Pneumonia- Los Angeles. Mortality and Morbidity Weekly Report* 250-252.

Champagne,P., Ogg,G.S., King,A.S., Knabenhans,C., Ellefsen,K., Nobile,M., Appay,V., Rizzardi,G.P., Fleury,S., Lipp,M., Forster,R., Rowland-Jones,S., Sekaly,R.P., McMichael,A.J. und Pantaleo,G. (2001). Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* 410, 106-111.

Chen,C.Y. und Shyu,A.B. (1995). AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem. Sci.* 20, 465-470.

Csellner,H., Walker,C., Wellington,J.E., McLure,L.E., Love,D.N. und Whalley,J.M. (2000). EHV-1 glycoprotein D (EHV-1 gD) is required for virus entry and cell-cell fusion, and an EHV-1 gD deletion mutant induces a protective immune response in mice. *Arch. Virol.* 145, 2371-2385.

Datsenko,K.A. und Wanner,B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 6640-6645.

Davison, A., Eberle, R., Hayward, G. S., McGeoch, D. J., Minson, A. C., Pellet, P. E., Roizman, B., Studdert, M. J. und Thiry, E. *Herpesviridae*. 193-212. 2005. London, UK, Elsevier/ Academic Press. *Virus Taxonomy VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U, and Ball, L. A.

Ref Type: Serial (Book,Monograph)

Davison,A.J., Cunningham,C., Sauerbier,W. und McKinnell,R.G. (2006). Genome sequences of two frog herpesviruses. *J. Gen. Virol.* 87, 3509-3514.

de Quadros,C.A. (2006). Is global measles eradication feasible? *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 304, 153-163.

Delecluse,H.J., Hilsenrath,T., Pich,D., Zeidler,R. und Hammerschmidt,W. (1998). Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 8245-8250.

Deml,L., Bojak,A., Steck,S., Graf,M., Wild,J., Schirmbeck,R., Wolf,H. und Wagner,R. (2001). Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. *J. Virol.* 75, 10991-11001.

Dimock,W.W. und Edwards,P.R. (1933). Is there a filterable virus of abortion in mares? *Kentucky Agriculture Experimental Station Bulletin* 297-301.

Dower,W.J., Miller,J.F. und Ragsdale,C.W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16, 6127-6145.

Edington,N., Bridges,C.G. und Patel,J.R. (1986). Endothelial cell infection and thrombosis in paralysis caused by equid herpesvirus-1: equine stroke. *Arch. Virol.* 90, 111-124.

Elliott,G. und O'Hare,P. (1995). Equine herpesvirus 1 gene 12, the functional homologue of herpes simplex virus VP16, transactivates via octamer sequences in the equine herpesvirus IE gene promoter. *Virology* 213, 258-262.

Eriksson,K. und Holmgren,J. (2002). Recent advances in mucosal vaccines and adjuvants. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 666-672.

Fowke,K.R., Nagelkerke,N.J., Kimani,J., Simonsen,J.N., Anzala,A.O., Bwayo,J.J., MacDonald,K.S., Ngugi,E.N. und Plummer,F.A. (1996). Resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya. *Lancet* 348, 1347-1351.

Frampton,A.R., Jr., Goins,W.F., Cohen,J.B., von Einem,J., Osterrieder,N., O'Callaghan,D.J. und Glorioso,J.C. (2005). Equine herpesvirus 1 utilizes a novel herpesvirus entry receptor. *J. Virol.* 79, 3169-3173.

Frampton,A.R., Jr., Stolz,D.B., Uchida,H., Goins,W.F., Cohen,J.B. und Glorioso,J.C. (2007). Equine herpesvirus 1 enters cells by two different pathways, and infection requires the activation of the cellular kinase ROCK1. *J. Virol.* 81, 10879-10889.

Garko-Buczynski,K.A., Smith,R.H., Kim,S.K. und O'Callaghan,D.J. (1998). Complementation of a replication-defective mutant of equine herpesvirus type 1 by a cell line expressing the immediate-early protein. *Virology* 248, 83-94.

Geldmacher,C., Currier,J.R., Herrmann,E., Haule,A., Kuta,E., McCutchan,F., Njovu,L., Geis,S., Hoffmann,O., Maboko,L., Williamson,C., Birx,D., Meyerhans,A., Cox,J. und Hoelscher,M. (2007). CD8 T-cell recognition of multiple epitopes within specific Gag regions is associated with maintenance of a low steady-state viremia in human immunodeficiency virus type 1-seropositive patients. *J. Virol.* 81, 2440-2448.

Gherardi,M.M., Perez-Jimenez,E., Najera,J.L. und Esteban,M. (2004). Induction of HIV immunity in the genital tract after intranasal delivery of a MVA vector: enhanced immunogenicity after DNA prime-modified vaccinia virus Ankara boost immunization schedule. *J. Immunol.* 172, 6209-6220.

Giard,D.J., Aaronson,S.A., Todaro,G.J., Arnstein,P., Kersey,J.H., Dosik,H. und Parks,W.P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 51, 1417-1423.

Gilbert,P.B., Peterson,M.L., Follmann,D., Hudgens,M.G., Francis,D.P., Gurwith,M., Heyward,W.L., Jobes,D.V., Popovic,V., Self,S.G., Sinangil,F., Burke,D. und Berman,P.W. (2005). Correlation between immunologic responses to a recombinant glycoprotein 120 vaccine and incidence of HIV-1 infection in a phase 3 HIV-1 preventive vaccine trial. *J. Infect. Dis.* 191, 666-677.

Gomez,C.E., Najera,J.L., Jimenez,E.P., Jimenez,V., Wagner,R., Graf,M., Frachette,M.J., Liljestrom,P., Pantaleo,G. und Esteban,M. (2007a). Head-to-head comparison on the immunogenicity of two HIV/AIDS vaccine candidates based on the attenuated poxvirus

strains MVA and NYVAC co-expressing in a single locus the HIV-1BX08 gp120 and HIV-1(IIIB) Gag-Pol-Nef proteins of clade B. *Vaccine* 25, 2863-2885.

Gomez,C.E., Najera,J.L., Jimenez,V., Bieler,K., Wild,J., Kostic,L., Heidari,S., Chen,M., Frachette,M.J., Pantaleo,G., Wolf,H., Liljestrom,P., Wagner,R. und Esteban,M. (2007b). Generation and immunogenicity of novel HIV/AIDS vaccine candidates targeting HIV-1 Env/Gag-Pol-Nef antigens of clade C. *Vaccine* 25, 1969-1992.

Gorry,P.R., McPhee,D.A., Verity,E., Dyer,W.B., Wesselingh,S.L., Learmont,J., Sullivan,J.S., Roche,M., Zaunders,J.J., Gabuzda,D., Crowe,S.M., Mills,J., Lewin,S.R., Brew,B.J., Cunningham,A.L. und Churchill,M.J. (2007). Pathogenicity and immunogenicity of attenuated, nef-deleted HIV-1 strains in vivo. *Retrovirology*. 4, 66.

Graf,M., Bojak,A., Deml,L., Bieler,K., Wolf,H. und Wagner,R. (2000). Concerted action of multiple cis-acting sequences is required for Rev dependence of late human immunodeficiency virus type 1 gene expression. *J. Virol.* 74, 10822-10826.

Graf,M., Deml,L. und Wagner,R. (2004). Codon-optimized genes that enable increased heterologous expression in mammalian cells and elicit efficient immune responses in mice after vaccination of naked DNA. *Methods Mol. Med.* 94, 197-210.

Graham,F.L. und van der Eb,A.J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456-467.

Grapes,M. und O'Hare,P. (2000). Differences in determinants required for complex formation and transactivation in related VP16 proteins. *J. Virol.* 74, 10112-10121.

Gray,W.L., Baumann,R.P., Robertson,A.T., O'Callaghan,D.J. und Staczek,J. (1987). Characterization and mapping of equine herpesvirus type 1 immediate early, early, and late transcripts. *Virus Res.* 8, 233-244.

Grundy,F.J., Baumann,R.P. und O'Callaghan,D.J. (1989). DNA sequence and comparative analyses of the equine herpesvirus type 1 immediate early gene. *Virology* 172, 223-236.

Hanahan,D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.

Harari,A., Bart,P.A., Stohr,W., Tapia,G., Garcia,M., Medjitna-Rais,E., Burnet,S., Cellera,C., Erlwein,O., Barber,T., Moog,C., Liljestrom,P., Wagner,R., Wolf,H., Kraehenbuhl,J.P., Esteban,M., Heeney,J., Frachette,M.J., Tartaglia,J., McCormack,S., Babiker,A., Weber,J. und Pantaleo,G. (2008). An HIV-1 clade C DNA prime, NYVAC boost vaccine regimen induces reliable, polyfunctional, and long-lasting T cell responses. *J. Exp. Med.* 205, 63-77.

Harari,A., Petitpierre,S., Valletian,F. und Pantaleo,G. (2004). Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy. *Blood* 103, 966-972.

Henry,B.E., Robinson,R.A., Dauenhauer,S.A., Atherton,S.S., Hayward,G.S. und O'Callaghan,D.J. (1981). Structure of the genome of equine herpesvirus type 1. *Virology* 115, 97-114.

Herring,C.D., Glasner,J.D. und Blattner,F.R. (2003). Gene replacement without selection: regulated suppression of amber mutations in Escherichia coli. *Gene* 311, 153-163.

Honeyborne,I., Prendergast,A., Pereyra,F., Leslie,A., Crawford,H., Payne,R., Reddy,S., Bishop,K., Moodley,E., Nair,K., van der,S.M., McCarthy,N., Rousseau,C.M., Addo,M., Mullins,J.I., Brander,C., Kiepiela,P., Walker,B.D. und Goulder,P.J. (2007). Control of human immunodeficiency virus type 1 is associated with HLA-B*13 and targeting of multiple gag-specific CD8+ T-cell epitopes. *J. Virol.* 81, 3667-3672.

Huang,X., Liu,L., Ren,L., Qiu,C., Wan,Y. und Xu,J. (2007). Mucosal priming with replicative Tiantan vaccinia and systemic boosting with DNA vaccine raised strong mucosal and systemic HIV-specific immune responses. *Vaccine* 25, 8874-8884.

Hubert,J.B., Burgard,M., Dussaix,E., Tamalet,C., Deveau,C., Le Chenadec,J., Chaix,M.L., Marchadier,E., Vilde,J.L., Delfraissy,J.F., Meyer,L. und Rouzioux (2000). Natural history of serum HIV-1 RNA levels in 330 patients with a known date of infection. The SEROCO Study Group. *AIDS* 14, 123-131.

Hubert,P.H., Birkenmaier,S., Rziha,H.J. und Osterrieder,N. (1996). Alterations in the equine herpesvirus type-1 (EHV-1) strain RacH during attenuation. *Zentralbl. Veterinarmed. B* 43, 1-14.

Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. und Shlomchik, M. Immunobiology. The Immune System in Health and Disease. 5th. 2001. New York, Garland Science.
Ref Type: Serial (Book,Monograph)

Johnson,M.A., Whalley,J.M., Littlejohns,I.R., Dickson,J., Smith,V.W., Wilks,C.R. und Reisner,A.H. (1985). Macropodid herpesviruses 1 and 2: two herpesviruses from Australian marsupials differentiated by restriction endonucleases, DNA composition and hybridization. Brief report. *Arch. Virol.* 85, 313-319.

Karakousis,G., Ye,N., Li,Z., Chiu,S.K., Reddy,G. und Radding,C.M. (1998). The beta protein of phage lambda binds preferentially to an intermediate in DNA renaturation. *J. Mol. Biol.* 276, 721-731.

Kaul,R., Trabattoni,D., Bwayo,J.J., Arienti,D., Zaglani,A., Mwangi,F.M., Kariuki,C., Ngugi,E.N., MacDonald,K.S., Ball,T.B., Clerici,M. und Plummer,F.A. (1999). HIV-1-specific mucosal IgA in a cohort of HIV-1-resistant Kenyan sex workers. *AIDS* 13, 23-29.

Kiepiela,P., Leslie,A.J., Honeyborne,I., Ramduth,D., Thobakgale,C., Chetty,S., Rathnavalu,P., Moore,C., Pfafferott,K.J., Hilton,L., Zimbwa,P., Moore,S., Allen,T., Brander,C., Addo,M.M., Altfeld,M., James,I., Mallal,S., Bunce,M., Barber,L.D., Szinger,J., Day,C., Klenerman,P., Mullins,J., Korber,B., Coovadia,H.M., Walker,B.D. und Goulder,P.J. (2004). Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature* 432, 769-775.

Kiepiela,P., Ngumbela,K., Thobakgale,C., Ramduth,D., Honeyborne,I., Moodley,E., Reddy,S., de Pierres,C., Mncube,Z., Mkhwanazi,N., Bishop,K., van der,S.M., Nair,K., Khan,N., Crawford,H., Payne,R., Leslie,A., Prado,J., Prendergast,A., Frater,J., McCarthy,N., Brander,C., Learn,G.H., Nickle,D., Rousseau,C., Coovadia,H., Mullins,J.I., Heckerman,D., Walker,B.D. und Goulder,P. (2007). CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat. Med.* 13, 46-53.

Kimani,J., Kaul,R., Nagelkerke,N.J., Luo,M., MacDonald,K.S., Ngugi,E., Fowke,K.R., Ball,B.T., Kariri,A., Ndinya-Achola,J. und Plummer,F.A. (2008). Reduced rates of HIV acquisition during unprotected sex by Kenyan female sex workers predating population declines in HIV prevalence. *AIDS* 22, 131-137.

Kwong,P.D., Doyle,M.L., Casper,D.J., Cicala,C., Leavitt,S.A., Majeed,S., Steenbeke,T.D., Venturi,M., Chaiken,I., Fung,M., Katinger,H., Parren,P.W., Robinson,J., Van Ryk,D., Wang,L., Burton,D.R., Freire,E., Wyatt,R., Sodroski,J., Hendrickson,W.A. und Arthos,J. (2002). HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. *Nature* 420, 678-682.

Kydd,J.H., Townsend,H.G. und Hannant,D. (2006). The equine immune response to equine herpesvirus-1: the virus and its vaccines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 111, 15-30.

Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Ledford,H. (2007). HIV vaccine may raise risk. *Nature* 450, 325.

Lee,E.C., Yu,D., Martinez,d., V, Tessarollo,L., Swing,D.A., Court DL, Jenkins,N.A. und Copeland,N.G. (2001). A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics* 73, 56-65.

Lemiale,F., Kong,W.P., Akyurek,L.M., Ling,X., Huang,Y., Chakrabarti,B.K., Eckhaus,M. und Nabel,G.J. (2003). Enhanced mucosal immunoglobulin A response of intranasal adenoviral vector human immunodeficiency virus vaccine and localization in the central nervous system. *J. Virol.* 77, 10078-10087.

Letvin,N.L. (2006). Progress and obstacles in the development of an AIDS vaccine. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 930-939.

Letvin,N.L. (2007). Correlates of immune protection and the development of a human immunodeficiency virus vaccine. *Immunity*. 27, 366-369.

Lewis,J.B., Thompson,Y.G. und Caughman,G.B. (1993). Transcriptional control of the equine herpesvirus 1 immediate early gene. *Virology* 197, 788-792.

Lewis,J.B., Thompson,Y.G., Feng,X., Holden,V.R., O'Callaghan,D. und Caughman,G.B. (1997). Structural and antigenic identification of the ORF12 protein (alpha TIF) of equine herpesvirus 1. *Virology* 230, 369-375.

Li,M., Gao,F., Mascola,J.R., Stamatatos,L., Polonis,V.R., Koutsoukos,M., Voss,G., Goepfert,P., Gilbert,P., Greene,K.M., Bilska,M., Kothe,D.L., Salazar-Gonzalez,J.F., Wei,X., Decker,J.M., Hahn,B.H. und Montefiori,D.C. (2005). Human immunodeficiency virus type 1 env clones from acute and early subtype B infections for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies. *J. Virol.* 79, 10108-10125.

Li,Z., Karakousis,G., Chiu,S.K., Reddy,G. und Radding,C.M. (1998). The beta protein of phage lambda promotes strand exchange. *J. Mol. Biol.* 276, 733-744.

Little,J.W. (1967). An exonuclease induced by bacteriophage lambda. II. Nature of the enzymatic reaction. *J. Biol. Chem.* 242, 679-686.

Luckay,A., Sidhu,M.K., Kjeken,R., Megati,S., Chong,S.Y., Roopchand,V., Garcia-Hand,D., Abdullah,R., Braun,R., Montefiori,D.C., Rosati,M., Felber,B.K., Pavlakis,G.N., Mathiesen,I., Israel,Z.R., Eldridge,J.H. und Egan,M.A. (2007). Effect of plasmid DNA vaccine design and in vivo electroporation on the resulting vaccine-specific immune responses in rhesus macaques. *J. Virol.* 81, 5257-5269.

Luxembourg,A., Evans,C.F. und Hannaman,D. (2007). Electroporation-based DNA immunisation: translation to the clinic. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 7, 1647-1664.

Mascola,J.R., Lewis,M.G., Stiegler,G., Harris,D., Vancott,T.C., Hayes,D., Louder,M.K., Brown,C.R., Sapan,C.V., Frankel,S.S., Lu,Y., Robb,M.L., Katinger,H. und Birx,D.L. (1999). Protection of Macaques against pathogenic simian/human immunodeficiency virus 89.6PD by passive transfer of neutralizing antibodies. *J. Virol.* 73, 4009-4018.

Mascola,J.R. und Montefiori,D.C. (2003). HIV-1: nature's master of disguise. *Nat. Med.* 9, 393-394.

Mayr,A., Pette,J., Petzoldt,K. und Wagener,K. (1968). [Studies on the development of a live vaccine against rhinopneumonitis (mare abortion) of horses]. *Zentralbl. Veterinarmed. B* 15, 406-418.

Mazzoli,S., Lopalco,L., Salvi,A., Trabattoni,D., Lo,C.S., Semplici,F., Biasin,M., Bl,C., Cosma,A., Pastori,C., Meacci,F., Mazzotta,F., Villa,M.L., Siccaldi,A.G. und Clerici,M. (1999). Human immunodeficiency virus (HIV)-specific IgA and HIV neutralizing activity in the serum of exposed seronegative partners of HIV-seropositive persons. *J. Infect. Dis.* 180, 871-875.

McCluskie,M.J. und Davis,H.L. (1998). CpG DNA is a potent enhancer of systemic and mucosal immune responses against hepatitis B surface antigen with intranasal administration to mice. *J. Immunol.* 161, 4463-4466.

McGeoch,D.J., Rixon,F.J. und Davison,A.J. (2006). Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res.* 117, 90-104.

Messer,R.J., Dittmer,U., Peterson,K.E. und Hasenkrug,K.J. (2004). Essential role for virus-neutralizing antibodies in sterilizing immunity against Friend retrovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 12260-12265.

Messerle,M., Crnkovic,I., Hammerschmidt,W., Ziegler,H. und Koszinowski,U.H. (1997). Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 14759-14763.

Mettenleiter,T.C. (2002). Herpesvirus assembly and egress. *J. Virol.* 76, 1537-1547.

Mettenleiter,T.C. (2004). Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res.* 106, 167-180.

Modrow, S., Falke, D. und Truyen, U. Molekulare Virologie. 2. Auflage. 2002. Heidelberg Berlin, Spektrum Akademischer Verlag. 2003.
Ref Type: Serial (Book,Monograph)

Muniyappa,K. und Radding,C.M. (1986). The homologous recombination system of phage lambda. Pairing activities of beta protein. *J. Biol. Chem.* 261, 7472-7478.

Murphy,K.C. (1991). Lambda Gam protein inhibits the helicase and chi-stimulated recombination activities of Escherichia coli RecBCD enzyme. *J. Bacteriol.* 173, 5808-5821.

Murphy,K.C. (2007). The lambda Gam protein inhibits RecBCD binding to dsDNA ends. *J. Mol. Biol.* 371, 19-24.

Muster,T., Steindl,F., Purtscher,M., Trkola,A., Klima,A., Himmler,G., Ruker,F. und Katinger,H. (1993). A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 67, 6642-6647.

Muyrers,J.P., Zhang,Y., Buchholz,F. und Stewart,A.F. (2000). RecE/RecT and Redalpha/Redbeta initiate double-stranded break repair by specifically interacting with their respective partners. *Genes Dev.* 14, 1971-1982.

Muyrers,J.P., Zhang,Y., Testa,G. und Stewart,A.F. (1999). Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination. *Nucleic Acids Res.* 27, 1555-1557.

Mwau,M., Cebere,I., Sutton,J., Chikoti,P., Winstone,N., Wee,E.G., Beattie,T., Chen,Y.H., Dorrell,L., McShane,H., Schmidt,C., Brooks,M., Patel,S., Roberts,J., Conlon,C., Rowland-Jones,S.L., Bwayo,J.J., McMichael,A.J. und Hanke,T. (2004). A human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) clade A vaccine in clinical trials: stimulation of HIV-specific T-cell responses by DNA and recombinant modified vaccinia virus Ankara (MVA) vaccines in humans. *J. Gen. Virol.* 85, 911-919.

Nagaike,K., Mori,Y., Gomi,Y., Yoshii,H., Takahashi,M., Wagner,M., Koszinowski,U. und Yamanishi,K. (2004). Cloning of the varicella-zoster virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome in Escherichia coli. *Vaccine* 22, 4069-4074.

Neubauer,A., Braun,B., Brandmuller,C., Kaaden,O.R. und Osterrieder,N. (1997). Analysis of the contributions of the equine herpesvirus 1 glycoprotein gB homolog to virus entry and direct cell-to-cell spread. *Virology* 227, 281-294.

News in Brief (2007). HIV vaccine failure prompts Merck to halt trial. *Nature* 449, 390.

O'Callaghan, D. und Osterrieder, N. Equine Herpesviruses. 2nd, 508-515. 1999. London, Academic Press Ltd. Harcourt Brace & Co. Encyclopedia Of Virology. Webster, R. and Granoff, A.

Ref Type: Serial (Book,Monograph)

Ogra,P.L., Faden,H. und Welliver,R.C. (2001). Vaccination strategies for mucosal immune responses. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 430-445.

Osterrieder,N. (1999). Construction and characterization of an equine herpesvirus 1 glycoprotein C negative mutant. *Virus Res.* 59, 165-177.

Osterrieder, N., Neubauer, A., Brandmuller, C., Braun, B., Kaaden, O. R. und Baines, J. D. Structure and function of equine herpesvirus glycoproteins- a review. 111-118. 1999. Newmarket, UK, R&W Publications. Proceedings of the 7th International Conference of Equine Infectious Diseases. Nakajima, H. and Plowright, W.

Ref Type: Serial (Book,Monograph)

Osterrieder,N., Neubauer,A., Brandmuller,C., Kaaden,O.R. und O'Callaghan,D.J. (1996). The equine herpesvirus 1 IR6 protein influences virus growth at elevated temperature and is a major determinant of virulence. *Virology* 226, 243-251.

Osterrieder,N., Neubauer,A., Brandmuller,C., Kaaden,O.R. und O'Callaghan,D.J. (1998). The equine herpesvirus 1 IR6 protein that colocalizes with nuclear lamins is involved in nucleocapsid egress and migrates from cell to cell independently of virus infection. *J. Virol.* 72, 9806-9817.

Pantaleo,G. und Koup,R.A. (2004). Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what we should know. *Nat. Med.* 10, 806-810.

Pearson,H. (2004). Carp virus crisis prompts moves to avert global spread. *Nature* 427, 577.

Pellet, P. E. und Roizman, B. The Family Herpesviridae: A Brief Introduction. 5th edition[2], 2479-2499. 2007. Philadelphia, PA, USA, Lippincott Williams& Wilkins. *Fields Virology*. Knipe, D. M. and Howley, P. M.

Ref Type: Serial (Book,Monograph)

Peyerl,F.W., Barouch,D.H. und Letvin,N.L. (2004). Structural constraints on viral escape from HIV- and SIV-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Viral Immunol.* 17, 144-151.

Pinto,A.R., Fitzgerald,J.C., Giles-Davis,W., Gao,G.P., Wilson,J.M. und Ertl,H.C. (2003). Induction of CD8+ T cells to an HIV-1 antigen through a prime boost regimen with heterologous E1-deleted adenoviral vaccine carriers. *J. Immunol.* 171, 6774-6779.

Pollard,V.W. und Malim,M.H. (1998). The HIV-1 Rev protein. *Annu. Rev. Microbiol.* 52, 491-532.

Popovic,M., Sarngadharan,M.G., Read,E. und Gallo,R.C. (1984). Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224, 497-500.

Purewal,A.S., Allsopp,R., Riggio,M., Telford,E.A., Azam,S., Davison,A.J. und Edington,N. (1994). Equid herpesviruses 1 and 4 encode functional homologs of the herpes simplex virus type 1 virion transactivator protein, VP16. *Virology* 198, 385-389.

Purtscher,M., Trkola,A., Gruber,G., Buchacher,A., Predl,R., Steindl,F., Tauer,C., Berger,R., Barrett,N., Jungbauer,A. und . (1994). A broadly neutralizing human monoclonal antibody against gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10, 1651-1658.

Ramshaw,I.A. und Ramsay,A.J. (2000). The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunol. Today* 21, 163-165.

Ratner,L., Fisher,A., Jagodzinski,L.L., Mitsuya,H., Liou,R.S., Gallo,R.C. und Wong-Staal,F. (1987). Complete nucleotide sequences of functional clones of the AIDS virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 3, 57-69.

Robert-Guroff,M. (2007). Replicating and non-replicating viral vectors for vaccine development. *Curr. Opin. Biotechnol.*

Robinson,H.L. (2002). New hope for an AIDS vaccine. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 239-250.

Robinson,H.L. (2007). HIV/AIDS vaccines: 2007. *Clin. Pharmacol. Ther.* 82, 686-693.

Rosenberg,E.S., Altfeld,M., Poon,S.H., Phillips,M.N., Wilkes,B.M., Eldridge,R.L., Robbins,G.K., D'Aquila,R.T., Goulder,P.J. und Walker,B.D. (2000). Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. *Nature* 407, 523-526.

Rudolph,J., O'Callaghan,D.J. und Osterrieder,N. (2002). Cloning of the genomes of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) strains KyA and racL11 as bacterial artificial chromosomes (BAC). *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 49, 31-36.

Rudolph,J. und Osterrieder,N. (2002). Equine herpesvirus type 1 devoid of gM and gp2 is severely impaired in virus egress but not direct cell-to-cell spread. *Virology* 293, 356-367.

Saeki,Y., Ichikawa,T., Saeki,A., Chiocca,E.A., Tobler,K., Ackermann,M., Breakefield,X.O. und Fraefel,C. (1998). Herpes simplex virus type 1 DNA amplified as bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: rescue of replication-competent virus progeny and packaging of amplicon vectors. *Hum. Gene Ther.* 9, 2787-2794.

Saiki,R.K., Gelfand,D.H., Stoffel,S., Scharf,S.J., Higuchi,R., Horn,G.T., Mullis,K.B. und Erlich,H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.

Sallusto,F., Geginat,J. und Lanzavecchia,A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 745-763.

Sambrook, J. und Russel, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd[1-3]. 2001. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
Ref Type: Serial (Book,Monograph)

Sanger,F., Nicklen,S. und Coulson,A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74, 5463-5467.

Shizuya,H., Birren,B., Kim,U.J., Mancino,V., Slepak,T., Tachiiri,Y. und Simon,M. (1992). Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 8794-8797.

Skepper,J.N., Whiteley,A., Browne,H. und Minson,A. (2001). Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment --> deenvelopment --> reenvelopment pathway. *J. Virol.* 75, 5697-5702.

Slater,J.D., Borchers,K., Thackray,A.M. und Field,H.J. (1994). The trigeminal ganglion is a location for equine herpesvirus 1 latency and reactivation in the horse. *J. Gen. Virol.* 75 (Pt 8), 2007-2016.

Slater,J.D., Lunn,D.P., Horohov,D.W., Antczak,D.F., Babiuk,L., Breathnach,C., Chang,Y.W., Davis-Poynter,N., Edington,N., Ellis,S., Foote,C., Goehring,L., Kohn,C.W., Kydd,J., Matsumura,T., Minke,J., Morley,P., Mumford,J., Neubauer,T., O'Callaghan,D., Osterrieder,K., Reed,S., Smith,K., Townsend,H., van der,M.K., Whalley,M. und Wilson,W.D. (2006). Report of the equine herpesvirus-1 Havermeyer Workshop, San Gimignano, Tuscany, June 2004. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 111, 3-13.

Southern,E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.

Stambas,J., Brown,S.A., Gutierrez,A., Sealy,R., Yue,W., Jones,B., Lockey,T.D., Zirkel,A., Freiden,P., Brown,B., Surman,S., Colecloough,C., Slobod,K.S., Doherty,P.C. und Hurwitz,J.L. (2005). Long lived multi-isotype anti-HIV antibody responses following a prime-double boost immunization strategy. *Vaccine* 23, 2454-2464.

Steinbrook,R. (2007). One step forward, two steps back--will there ever be an AIDS vaccine? *N. Engl. J. Med.* 357, 2653-2655.

Stiegler,G., Kunert,R., Purtscher,M., Wolbank,S., Voglauer,R., Steindl,F. und Katinger,H. (2001). A potent cross-clade neutralizing human monoclonal antibody against a novel epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 17, 1757-1765.

Stott,E.J. (1994). Towards a vaccine against AIDS: lessons from simian immunodeficiency virus vaccines. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 188, 221-237.

Su,L., Graf,M., Zhang,Y., von Briesen,H., Xing,H., Kostler,J., Melzl,H., Wolf,H., Shao,Y. und Wagner,R. (2000). Characterization of a virtually full-length human immunodeficiency virus type 1 genome of a prevalent intersubtype (C/B') recombinant strain in China. *J. Virol.* 74, 11367-11376.

Swaminathan,S., Ellis,H.M., Waters,L.S., Yu,D., Lee,E.C., Court DL und Sharan,S.K. (2001). Rapid engineering of bacterial artificial chromosomes using oligonucleotides. *Genesis.* 29, 14-21.

Tang,D.C., DeVit,M. und Johnston,S.A. (1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356, 152-154.

Telford,E.A., Watson,M.S., McBride,K. und Davison,A.J. (1992). The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology* 189, 304-316.

Terada,K., Wakimoto,H., Tyminski,E., Chiocca,E.A. und Saeki,Y. (2006). Development of a rapid method to generate multiple oncolytic HSV vectors and their in vivo evaluation using syngeneic mouse tumor models. *Gene Ther.* 13, 705-714.

Thomson,G.R., Mumford,J.A., Campbell,J., Griffiths,L. und Clapham,P. (1976). Serological detection of equid herpesvirus 1 infections of the respiratory tract. *Equine Vet. J.* 8, 58-65.

Tischer,B.K., von Einem,J., Kaufer,B. und Osterrieder,N. (2006). Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *Biotechniques* 40, 191-197.

Trapp,S., von Einem,J., Hofmann,H., Kostler,J., Wild,J., Wagner,R., Beer,M. und Osterrieder,N. (2005). Potential of equine herpesvirus 1 as a vector for immunization. *J. Virol.* 79, 5445-5454.

Trinvuthipong,C. (2004). Thailand's Prime-Boost HIV Vaccine Phase III. *Science* 303, 954-955.

Tsujimura,K., Yamanaka,T., Kondo,T., Fukushi,H. und Matsumura,T. (2006). Pathogenicity and immunogenicity of equine herpesvirus type 1 mutants defective in either gI or gE gene in murine and hamster models. *J. Vet. Med. Sci.* 68, 1029-1038.

Ulmer,J.B., Donnelly,J.J., Parker,S.E., Rhodes,G.H., Felgner,P.L., Dwarki,V.J., Gromkowski,S.H., Deck,R.R., DeWitt,C.M., Friedman,A. und . (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259, 1745-1749.

UNAIDS und WHO. AIDS epidemic update. 1-60. 2007.

Ref Type: Report

Vancott,T.C., Kaminski,R.W., Mascola,J.R., Kalyanaraman,V.S., Wassef,N.M., Alving,C.R., Ulrich,J.T., Lowell,G.H. und Birx,D.L. (1998). HIV-1 neutralizing antibodies in the genital and respiratory tracts of mice intranasally immunized with oligomeric gp160. *J. Immunol.* 160, 2000-2012.

Vecino,W.H., Quanquin,N.M., Martinez-Sobrido,L., Fernandez-Sesma,A., Garcia-Sastre,A., Jacobs,W.R., Jr. und Fennelly,G.J. (2004). Mucosal immunization with attenuated *Shigella flexneri* harboring an influenza hemagglutinin DNA vaccine protects mice against a lethal influenza challenge. *Virology* 325, 192-199.

von Einem,J., Schumacher,D., O'Callaghan,D.J. und Osterrieder,N. (2006). The alpha-TIF (VP16) homologue (ETIF) of equine herpesvirus 1 is essential for secondary envelopment and virus egress. *J. Virol.* 80, 2609-2620.

von Einem,J., Wellington,J., Whalley,J.M., Osterrieder,K., O'Callaghan,D.J. und Osterrieder,N. (2004). The truncated form of glycoprotein gp2 of equine herpesvirus 1 (EHV-1) vaccine strain KyA is not functionally equivalent to full-length gp2 encoded by EHV-1 wild-type strain RacL11. *J. Virol.* 78, 3003-3013.

Walker,B.D. (2007). Elite control of HIV Infection: implications for vaccines and treatment. *Top. HIV. Med.* 15, 134-136.

Welch,H.M., Bridges,C.G., Lyon,A.M., Griffiths,L. und Edington,N. (1992). Latent equid herpesviruses 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and co-cultivation from lymphoid tissues. *J. Gen. Virol.* 73 (Pt 2), 261-268.

Whitney,J.B. und Ruprecht,R.M. (2004). Live attenuated HIV vaccines: pitfalls and prospects. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 17, 17-26.

Wibbelt,G., Kurth,A., Yasmum,N., Bannert,M., Nagel,S., Nitsche,A. und Ehlers,B. (2007). Discovery of herpesviruses in bats. *J. Gen. Virol.* 88, 2651-2655.

Wolf,H., Modrow,S., Soutschek,E., Motz,M., Grunow,R., Döbl,H. und von Baehr,R. (1990). Production, mapping and biological characterization of monoclonal antibodies against core protein (p24) of the human immunodeficiency virus. *AIDS Forschung* 1 16-18.

Wolff,J.A., Malone,R.W., Williams,P., Chong,W., Acsadi,G., Jani,A. und Felgner,P.L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247, 1465-1468.

Woodland,D.L. (2004). Jump-starting the immune system: prime-boosting comes of age. *Trends Immunol.* 25, 98-104.

Yoshida,T., Okuda,K., Xin,K.Q., Tadokoro,K., Fukushima,J., Toda,S., Hagiwara,E., Hamajima,K., Koshino,T. und Saito,T. (2001). Activation of HIV-1-specific immune responses to an HIV-1 vaccine constructed from a replication-defective adenovirus vector using various combinations of immunization protocols. *Clin. Exp. Immunol.* 124, 445-452.

Yuki,Y., Nuchi,T. und Kiyono,H. (2007). Progress towards an AIDS mucosal vaccine: an overview. *Tuberculosis. (Edinb.)* 87 Suppl 1, S35-S44.

Zhang,Y., Buchholz,F., Muyrers,J.P. und Stewart,A.F. (1998). A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat. Genet.* 20, 123-128.

Zinkernagel,R.M. und Hengartner,H. (2006). Protective 'immunity' by pre-existent neutralizing antibody titers and preactivated T cells but not by so-called 'immunological memory'. *Immunol. Rev.* 211, 310-319.

Publikationen

Publikationen/ Manuskripte

- Helga Hofmann, Jens Wild, Denijal Kosovac, Jens von Einem, Karsten Tischer, Nikolaus Osterrieder, Josef Köstler and Ralf Wagner
An UL48 (ETIF) Knockout EHV-mutant increases Vector Safety (in prep.)
- Sascha Trapp, Jens von Einem, Helga Hofmann, Josef Köstler, Jens Wild, Ralf Wagner, Martin Beer, und Nikolaus Osterrieder
Potential of Equine Herpesvirus 1 as a Vector for Immunization, Journal of Virology, May 2005, p. 5445-5454, Vol. 79, No. 9.

Vorträge

- Josef Köstler, Helga Hofmann, Katharina Boeckl, Julia Dobmeier, Karsten Tischer und Ralf Wagner
Vortrag, Innate Immune Response: New York Vaccinia Virus Based HIV Candidate Vaccine versus a Novel Equine Herpesvirus (EHV) Type 1 Derived Vector
Vortrag, Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Gentherapie, Heidelberg, Juli 2007.
- Helga Hofmann, Josef Köstler, Jens Wild, Jens von Einem, Sascha Trapp, Nikolaus Osterrieder and Ralf Wagner
Recombinant Equine Herpesvirus (EHV) Type 1 – a New Viral Vector System that Induces Systemic and Mucosal HIV-specific Immune Responses,
Vortrag, Deutsch Österreichischer AIDS Kongress, Wien, Juni 2005.
- Helga Hofmann, Josef Köstler, Jens Wild, Jens von Einem, Sascha Trapp, Nikolaus Osterrieder and Ralf Wagner
Recombinant Equine Herpesvirus (EHV) Type 1 – a new viral vector system that induces systemic and mucosal HIV-specific immune responses
Vortrag, Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV). Hannover, März 2005.
- Helga Hofmann, Josef Köstler, Jens Wild, Jens von Einem, Sascha Trapp, Nikolaus Osterrieder and Ralf Wagner
Recombinant Equine Herpesvirus (EHV) Type 1 induces a systemic and mucosal HIV-specific immune response after intranasal delivery,
Vortrag, Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Gentherapie, Frankfurt Juni/Juli 2004.

Poster

- Helga Hofmann, Jens Wild, Karsten Tischer, Jens von Einem, Josef Köstler and Ralf Wagner
Equine Herpesvirus 1 UL48 Knockout Mutant (EHVΔ48) Increases Vector Safety,
Poster, Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Nürnberg, September 2007
- Josef Köstler, Helga Hofmann, Katharina Böckl, Julia Dobmeier, Karsten Tischer and Ralf Wagner,
HIV Vaccine Candidates in Cross-Validation on Dendritic Cells,
Deutsch Österreichischer AIDS Kongress, Frankfurt, Juni 2007.
- Josef Köstler, Helga Hofmann, Katharina Boeckl, Karsten Tischer, Nikolaus Osterrieder, Jens Wild and Ralf Wagner
Monocyte Derived Dendritic Cells are Effectively Transduced and Activated by a Novel Viral Vector System Based on Equine Herpesvirus (EHV) Type 1
DNA Vaccine, Malaga, Mai 2007.
- Josef Köstler, Helga Hofmann, Katharina Böckl, Julia Dobmeier, Karsten Tischer and Ralf Wagner,
Comparative Analysis of a New York Vaccinia Virus Based HIV Candidate Vaccine and Novel Equine Herpesvirus (EHV) Type 1 Derived Vector to Induce Maturation and Activation of Human Dendritic Cells
Cellular Therapy, Regensburg, März 2007.

- Josef Köstler, Helga Hofmann, Katharina Boeckl, Karsten Tischer, Nikolaus Osterrieder, Jens Wild and Ralf Wagner
Equine Herpesvirus (EHV) Type 1 Based Viral Vectors Effectively Transduce and Activate Monocyte Derived Dendritic Cells (MDDC)
Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, München, März 2006
- Helga Hofmann, Jens Wild, Josef Köstler, Jens von Einem, Sascha Trapp, Nikolaus Osterrieder and Ralf Wagner
Recombinant Equine Herpesvirus Type 1- a Novel Vector System Inducing Systemic and Mucosal HIV-specific Immune Response After Intranasal Delivery
AIDS Vaccine, Montreal, Oktober 2005.
- Helga Hofmann, Josef Köstler, Jens Wild, Jens von Einem, Sascha Trapp, Nikolaus Osterrieder and Ralf Wagner
Intranasal immunization with a recombinant Equine Herpesvirus (EHV) Type induces HIV-1 Gag specific humoral and cell mediated immune responses
Convir Regensburg, Mai 2004.
- Helga Hofmann, Josef Köstler, Jens Wild, Jens von Einem, Sascha Trapp, Nikolaus Osterrieder and Ralf Wagner
Equine Herpesvirus (EHV) Type 1: A Vector for Viral Gene Delivery
Annual Congress of the European Society of Gene Therapy, Tampere, November 2004.
- Helga Hofmann, Josef Köstler, Jens Wild, Jens von Einem, Sascha Trapp, Nikolaus Osterrieder and Ralf Wagner
Induction of systemic and mucosal HIV-specific immune responses using a recombinant Equine Herpesvirus (EHV) Type 1 derived vector for intranasal delivery
Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Tübingen, März 2004.

Danksagung

Prof. Dr. Ralf Wagner danke ich für die Überlassung des Themas, die Finanzierung und Betreuung meiner Arbeit. Darüber hinaus möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken wissenschaftlich zu wachsen, dadurch dass ich meine Arbeit bei zahlreichen Gelegenheiten auf Kongressen vorstellen und meinen Erfahrungsschatz bei einem Auslandspraktikum in den USA erweitern durfte. Besonderen Dank auch für die Unterstützung während des Promotionseignungsverfahrens und den Glauben daran, dass auch ein Fachhochschulabschluss zu wissenschaftlichem Arbeiten befähigt.

Herrn Prof. Dr. Karl Kunzelmann danke ich vielmals für die Bereitschaft zur Übernahme des Erstgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Wolf danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Institut für Medizinische Mikrobiologie & Hygiene.

Bei Prof. Dr. Nikolaus Osterrieder und den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe möchte ich mich für die freundliche Aufnahme während meines Praktikums an der Cornell Universität sowie die zahlreichen Hilfestellungen bei Reagenzien und Fragen zum Thema EHV bedanken. Besonderer Dank geht dabei an Karsten Tischer, der mir stets für alle Fragen und Probleme mit Rat und Tat zur Seite stand.

Bei Jens, Denijal und Josef bedanke ich mich für die tatkräftige Hilfe bei den Mausversuchen. Jens möchte ich darüber hinaus dafür danken, dass er sich in den letzten Jahren immer wieder als wissenschaftlicher Sparing-Partner zur Verfügung gestellt hat, geduldig jedes „ja, aber“ ertragen hat und damit wesentlich zur Qualität dieser Arbeit beigetragen hat. Lieben Dank auch für das schnelle Korrekturlesen und den Glauben daran, dass alles doch noch rechtzeitig fertig wird.

Vielen Dank auch an alle Kollegen im Institut und in der Arbeitsgruppe, die mit ihrer Diskussions- und Hilfsbereitschaft in den vergangenen Jahren eine angenehme Arbeitsatmosphäre geschaffen haben.

Ein besonderes Dankeschön geht dabei an die Mannschaft des erweiterten 80er Labors: Kathi, Silke, Sabrina, Jens und Denijal. Manchmal hat sich in den letzten Jahren so angefühlt, als ob ich im Labor wohnen würde... und Tatsache ist: Dank Euch ist es wirklich in gewisser Weise ein Zuhause geworden. Ich werde **Euch Heftig Vermissen** und hoffe ganz schwer, dass Ihr alle an der baldigst **Einberufenen Hamburger Vollversammlung Typ 1** teilnehmen werdet.

Ein ganz lieber Dank auch an Irmtraud und Fred, die uns gerade in der letzten Wochen mit enormem Einsatz geholfen haben und während der Doktorarbeit stets dafür gesorgt haben, dass wir den Rest der Welt nicht aus den Augen verlieren.

Ein ganz besonderer Dank richtet sich an meine Eltern und meine Schwester, die stets für mich da sind und mir immer wieder den Rücken stärken. Danke, ohne Euch hätte es diese Arbeit nicht gegeben.

Meiner Schwester danke ich darüber hinaus besonders für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Mausdaten.

Lieber Timo; einer mag überwältigt werden, aber zwei können widerstehen... Hab vielen lieben Dank für Deine Unterstützung und Dein Verständnis besonders in den letzten Monaten!