



# Einfluss des Attenuierungsgrades auf das Sicherheitspotential und die Immunogenität Equiner Herpesvirus Typ1 (EHV-1) basierter Vektoren

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

Im Fachbereich Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg

vorgelegt von  
**Nicole Fiedler**  
aus Bremen

Hamburg 2011

Genehmigt vom Fachbereich Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Prof. Dr. T. DOBNER  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Prof. Dr. R. WAGNER  
Tag der Disputation: 10. Dezember 2010

Hamburg, den 25. November 2010



A. Temming

Professor Dr. Axel Temming  
Leiter des Fachbereichs Biologie

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
<b>A.1 HIV</b>	<b>3</b>
A.1.1 Epidemiologie	3
A.1.2 Krankheitsverlauf	4
A.1.3 Herausforderungen an die HIV-Impfstoffentwicklung	5
A.1.3.1 HI-virale Hüllproteine als Vakzinekandidat	6
A.1.3.1.1 Neutralisierende Antikörper gegen die Hüllproteine	6
A.1.3.1.2 Rekombinantes gp120 als Vakzine	7
A.1.3.2 Rolle der T-Zellantworten	8
A.1.3.3 Derzeitiger Stand der HIV-Vakzine Entwicklung	9
A.1.3.4 Virale Vektoren als HIV-Impfstoffkandidaten	10
A.1.3.4.1 Allgemein	10
A.1.3.4.2 Ad5-Vektoren	11
A.1.3.4.3 Pockenvirale Vektoren	12
A.1.3.5 Lösungsansätze zur Herstellung einer Vakzine	13
A.1.4 Tiermodelle für HIV-1	14
A.1.4.1 Humanisierte Mäuse	14
A.1.4.2 Chimäre Viren	16
<b>A.2 EHV-1</b>	<b>17</b>
A.2.1 EHV-1 – ein Herpesvirus	17
A.2.2 Aufbau eines EHV-1 Viruspartikels	18
A.2.3 Genom von EHV-1	19
A.2.4 Replikation von EHV-1	20
A.2.5 Distribution von EHV-1 im natürlichen Wirt	22
A.2.6 EHV-1 im Mausmodell	23
A.2.7 EHV-1 als Vektorsystem	23
A.2.7.1 Herstellung rekombinanter EHV-1-Vektoren	23
A.2.7.2 Potential von EHV-1 als virales Vektorsystem	25
A.2.7.3 Unterschiedlich attenuierte EHV-1-Vektoren	26
<b>A.3 Zielsetzung</b>	<b>28</b>
<b>B. Material und Methoden</b>	<b>29</b>
<b>B.1 Material</b>	<b>29</b>
B.1.1 Vektoren	29
B.1.2 Kommerzielle Kits	29
B.1.3 Versuchstiere	29
B.1.4 Reagenzien und Verbrauchsmaterial	30
B.1.5 Häufig verwendete Lösungen	30
<b>B.2 Methoden</b>	<b>30</b>
B.2.1 Herstellung von DNA-Konstrukten	30
B.2.1.1 Verwendete Prokaryontische Zellen	30
B.2.1.2 Anzucht und Selektion von Bakterien	30
B.2.1.3 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien	31
B.2.1.4 Transformation chemisch-kompetenter Bakterien	31
B.2.1.5 Aufreinigung von Plasmid DNA	31
B.2.1.6 DNA-Agarose-Gelelektrophorese	32
B.2.1.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	32
B.2.1.8 Ligation	32
B.2.1.9 Restriktion von DNA	32
B.2.1.10 Sequenzierung	32
B.2.1.11 Anlegen von Glycerinkulturen	33
B.2.2 Herstellung und Verifizierung rekombinanter EHV-1	33

B.2.2.1	Generierung rekombinanter BACs	34
B.2.2.1.1	Einbringen des Rekombinationskonstrukts	35
B.2.2.1.2	Ausrekombination der Kanamycin-Resistenz-Kassette	35
B.2.2.1.3	Einbringen eines zweiten Transgens	36
B.2.2.1.4	Aufreinigung von Bacmid-DNA	37
B.2.2.1.5	Genotypisierung mittels Southern Blot Analyse (Southern, 1975)	37
B.2.2.2	Generierung von EHV-1-Virusstocks	38
B.2.2.2.1	Verwendete Zelllinien	38
B.2.2.2.2	Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)	39
B.2.2.2.3	Herstellung hochtitriger Virusstocks	39
B.2.2.2.4	Bestimmung von Virustitern mittels Plaque-Assay	40
B.2.2.2.5	Aufreinigung von genomischer und viraler DNA	40
B.2.2.2.6	Nachweis der Transgen-Expression	40
B.2.2.2.7	Luciferase-Assay	42
B.2.2.2.8	Durchflusszytometrische Analysen	42
B.2.3	Herstellung von NYVAC-Virusstocks	43
B.2.3.1	Verwendete Zelllinien	43
B.2.3.2	Herstellung hochtitriger Virusstocks	43
B.2.3.3	Bestimmung von NYVAC-Virustitern mittels Plaque-Assay	44
B.2.4	Mausstudien	44
B.2.4.1	Haltung und Immunisierung von Versuchstieren	44
B.2.4.2	Auslesen von Immunantworten	45
B.2.4.2.1	Auslesen zellulärer Immunantworten	45
B.2.4.2.2	Auslesen humoraler Immunantworten	47
B.2.4.3	Nachweis von EHV-1 in Mausgeweben	49
B.2.4.3.1	In vivo Imaging	49
B.2.4.3.2	Gewinnung von Probenmaterial	50
B.2.4.3.3	Luciferase-Assay von Mausgeweben	51
B.2.4.3.4	Quantitative Real-Time PCR (qRT) für den Virusnachweis in Mausgeweben	52
B.2.4.3.5	Isolierung von EHV-1 aus Maus-Lungen	52
B.2.5	Infektionsstudien humaner PBMCs	53
B.2.5.1	Isolierung humaner PBMCs aus Vollblut	53
B.2.5.2	Fraktionierung von PBMCs in Subpopulationen	54
B.2.5.3	Durchflusszytometrische Analysen	54

## **C. Ergebnisse** **56**

### **C.1 Rekombinante EHV-1 mit unterschiedlichem Attenuierungsgrad können gezielt hergestellt werden** **56**

C.1.1	Die Herstellung rekombinanter EHV-1 erfolgt über Bacmide mit Hilfe der RED-Rekombination	56
C.1.2	Die erfolgreiche Integration der Transgene wird mit Southern-Blot-Analysen nachgewiesen	58
C.1.3	Die rekombinanten EHV-1-Vektoren vermitteln die Expression ihres jeweiligen Transgens <i>in vitro</i>	60
C.1.4	Die HI-viralen Transgene <i>gpn</i> und <i>gag</i> unterscheiden sich in ihrer Expressionsstärke	61

### **C.2 Die hoch attenuierten EHV-1-Vektoren weisen ein gutes Sicherheitsprofil auf** **63**

C.2.1	Die attenuierten EHV-1-Vektoren sind apathogen im Mausmodell	63
C.2.2	Die Analyse der Biodistribution zeigt die begrenzte Ausbreitung der EHV-1-Vektoren im Organismus	64
C.2.2.1	<i>In vivo Imaging</i> erlaubt die Verfolgung der Transgen-Expression in der Maus über einen längeren Zeitraum	64
C.2.2.2	Die Höhe der Transgen-Expression hängt vom Grad der Attenuierung des verwendeten Vektors und der Infektionsroute ab	69
C.2.2.3	Die Transgen-Expression in Gewebehomogenaten lässt sich nur im respiratorischen Trakt nachweisen	71
C.2.2.4	Die Distribution der EH-viralen DNA korreliert mit der Transgen-Expression	72
C.2.2.4.1	Zum Nachweis der viralen DNA wurde eine quantitative RT-PCR etabliert	73

C.2.2.4.2	Nach intranasaler Applikation von EHV-1-Vektoren kann virale DNA zunächst in der Lunge und Nase der infizierten Tiere nachgewiesen werden, bevor das Virus wieder eliminiert wird	74
C.2.2.4.3	Die Quantifizierung der viralen DNA zeigt eine deutlich schwächere Replikation des EHV- $\Delta$ UL48 Virus verglichen mit EHV oder EHV-L	76
<b>C.3</b>	<b>Hoch attenuierte rekombinante EHV-1-Vektoren vermitteln Env-spezifische zelluläre und humorale Immunantworten im Mausmodell</b>	<b>77</b>
C.3.1	Eine heterologe Impfstrategie verbessert die durch EHV-1-Vektoren induzierten Env-spezifischen T-Zellantworten	78
C.3.2	EHV-gp120 und EHV-gp120- $\Delta$ UL48 induzieren Env-spezifische, systemisch humorale Immunantworten	80
C.3.3	Eine heterologe Impfstrategie mit einer DNA-Grundimmunisierung und zweimaliger EHV-gp120- <i>Booster</i> -Immunsierung induziert mukosale humorale Immunantworten	81
<b>C.4</b>	<b>EH-virale Vektoren können humane antigenpräsentierende Zellen transduzieren</b>	<b>82</b>
C.4.1	EHV-1-Vektoren transduzieren humane CD14 <sup>+</sup> - und CD19 <sup>+</sup> -Zellen	82
C.4.2	EHV-1-Vektoren rufen in humanen PBMCs auch nach Gefrierkonservierung Transgen-Expression hervor	83
<b>C.5</b>	<b>EH-virale Vektoren können zum Nachweis der Effizienz von Vakzine im Mausmodell eingesetzt werden</b>	<b>85</b>
C.5.1	EHV-L-luc-gag erfüllt die Voraussetzungen für ein HIV- <i>Challenge</i> -Virus	85
C.5.2	NYVAC-gag immunisierte Mäuse zeigen einen Schutz vor einem EHV-L-luc-gag- <i>Challenge</i> in Abhängigkeit von der Immunisierungsrouten	88
C.5.2.1	NYVAC-gag induziert systemische und mukosale Gag-spezifische reaktive zytotoxische T-Zellen in Balb/c Mäusen	88
C.5.2.2	Intranasal immunisierte Balb/c Mäuse zeigen einen Schutz vor einer EHV-L-luc-gag Infektion	90
C.5.2.2.1	Intranasal mit NYVAC immunisierte Mäuse zeigen einen Transgen-unabhängigen Schutz vor einer Gewichtsabnahme	90
C.5.2.2.2	Intranasal mit NYVAC-gag immunisierte Mäuse zeigen eine Gag-spezifische Verringerung, intramuskulär mit NYVAC immunisierte Mäuse eine Vektor-bedingte Erhöhung der EHV-L-luc-gag Replikation nach einem Challenge	91
C.5.2.3	Der <i>Challenge</i> intramuskulär mit NYVAC-gag immunisierter Balb/c Mäuse erhöht die Gag-spezifischen zellulären Immunantworten in der Lunge	93
<b>D.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>96</b>
<b>D.1</b>	<b>Herstellung rekombinanter EHV-1-Vektoren</b>	<b>96</b>
D.1.1	Die BAC-Technologie ermöglicht die effiziente Herstellung von rekombinanten EHV-1-Vektoren	96
D.1.2	Das EHV-1-Vektorsystem bietet die Möglichkeit abgestuft attenuierte Vektoren mit unterschiedlichen Transgenen herzustellen	97
<b>D.2</b>	<b>Sicherheit der EHV-1-Vektoren</b>	<b>98</b>
D.2.1	Die attenuierten EHV-1-Vektoren weisen keine pathogenen Eigenschaften auf	98
D.2.2	Biodistribution von EHV-1-Vektoren	99
D.2.2.1	Die Distribution der EHV-1-Vektoren hängt von der Applikationsroute ab	100
D.2.2.2	Die attenuierten, UL48-haltigen EHV-1-Vektoren weisen die meisten Genom-Äquivalente und damit die stärkste Transgen-Expression auf	100
D.2.2.3	Bei EHV-1-Vektoren genügen vergleichsweise kleine Mengen für eine gute Transgen-Expression über mehrere Tage	102
<b>D.3</b>	<b>Immunogene Eigenschaften von EHV-1-Vektoren</b>	<b>103</b>
D.3.1	Die EHV-gp120-Vektoren induzieren gute zelluläre und humorale Immunantworten	104
D.3.2	Die EHV-1-Vektoren können humane antigenpräsentierende Zellen transduzieren und damit HIV-spezifische humane T-Zellen stimulieren	106
<b>D.4</b>	<b>EHV-L-luc-gag als Challenge-Modell in Balb/c Mäusen zur Ermittlung des Potentials von NYVAC-gag als HIV-Vakzine</b>	<b>107</b>
D.4.1	Die EHV-L-luc-gag-Vektoren können als <i>Challenge</i> gag-spezifischer, zellulärer Immunantworten im Mausmodell genutzt werden	107

D.4.2	Die NYVAC-Vektoren beeinflussen das Immunsystem abhängig von der jeweiligen Applikationsroute	109
<b>D.5</b>	<b>Ausblick</b>	<b>111</b>
D.5.1	Weitere Analysen und Verbesserung der immunogenen Eigenschaften von EHV-1-Vektoren	111
D.5.2	Biodistributionstudien für weitere Applikationsrouten der EHV-1 Vektoren und Verifizierung durch histologische Untersuchungen	111
D.5.3	EHV-1-Vektoren für den heterologen Gentransfer in der Gentherapie	112
D.5.4	Rekombinante EHV-1-Vektoren für den <i>Challenge</i> anderer spezifischer Immunantworten	112
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>113</b>
	<b>Publikationen</b>	<b>131</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>132</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Ad5</b>	<b>Adenovirus Typ 5</b>
<b>AP</b>	Alkalische Phosphatase
<b>BAC</b>	<i>bacterial artificial chromosome</i>
<b>BAL</b>	Bronchoalveolare Lavage
<b>BGH</b>	Bovines Wachstumshormon
<b>CCD</b>	<i>charge-coupled-device</i>
<b>CTB</b>	Choleratoxin Untereinheit B
<b>CTL</b>	Zytotoxische T-Zelle
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EHV-1</b>	Equine Herpesvirus Typ1
<b>Env</b>	<i>Hüllprotein</i>
<b>eTIF</b>	<i>equine trans-inducing factor</i>
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
<b>FKS</b>	Fötale Kälberserum
<b>GFP</b>	Grün-fluoreszierendes Protein
<b>gpt</b>	Guaninphosphoribosyltransferase
<b>HIV-1</b>	Humanes Immundefizienz Virus 1
<b>HLA</b>	Humane Leukozyten-Antigene
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon-gamma
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>MHC</b>	<i>major histocompatibility complex</i>
<b>MVA</b>	<i>Modified Vaccinia Ankara</i>
<b>NK-Zellen</b>	Natürliche Killer Zellen
<b>NYVAC</b>	<i>New York Vaccinia</i>
<b>ori</b>	<i>origin of replication</i>
<b>PBMC</b>	Periphere mononukleäre Blutzellen
<b>PBS</b>	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>Pfu</b>	<i>plaque forming units</i>
<b>PMA</b>	Phorbol 12-Myristat-13-Acetat
<b>POD</b>	Peroxidase

<b>Rev</b>	<i>regulator of expression of viral proteins</i>
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>qRT PCR</b>	Quantitative <i>Real Time</i> Polymerasekettenreaktion
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>tpa</b>	<i>tissue plasminogen activator</i>
<b>WHO</b>	<i>World Health Organisation</i>

## Zusammenfassung

Der Einsatz viraler Vektorsysteme als rekombinante Vakzine kann durch zahlreiche Faktoren limitiert sein, insbesondere durch (1) präexistierende, gegen den Vektor gerichtete Immunantworten, (2) ein generell geringes immunogenes Potential oder auch (3) stark begrenzte Verpackungskapazitäten für Fremd-Antigene. Alle bisherigen Daten deuten darauf hin, dass gegen das für Menschen apathogene Equine Herpesvirus Typ 1 (EHV-1) keine präexistierende Immunität vorhanden ist. Darüber hinaus waren erste Untersuchungen zum immunogenen Potential des EHV-1-Vektorsystems sehr vielversprechend und zeigten in Balb/c Mäusen systemische Transgen-spezifische zelluläre sowie humorale Immunantworten. In einem heterologen *Prime/Boost* Schema, bestehend aus einer intramuskulären DNA-Grundimmunisierung und einem zweifachen intranasalen *Boost* mit EHV-1-Vektoren, wurden zusätzlich auch Transgen-spezifische mukosale Immunantworten induziert, die für die Wirksamkeit eines HIV-Impfstoffes eine große Rolle spielen, da die Mukosa in den meisten Fällen die Eintrittspforte für das HI-Virus darstellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei unterschiedlich attenuierte EHV-1-Vektor-Varianten eingesetzt: (1) der pathogene RacL-Stamm, der neben respiratorischen Erkrankungen auch Fehlgeburten bei Pferden verursachen kann, (2) das durch 256-faches Passagieren von RacL auf Schweinenierenzellen entstandene hoch attenuierte RacH-Virus und (3) ein von RacH abgeleitetes Virus, bei dem mittels RED-Rekombination das UL-48-Gen gezielt deletiert wurde. UL48 codiert für das eTIF-Protein (*equine trans-inducing factor*), das als Transaktivator die Expression des einzigen *immediate early* Proteins von EHV-1 einleitet und damit den Replikationsvorgang initiiert. EHV- $\Delta$ UL48-Vektoren sind deshalb in ihrer Replikation stark eingeschränkt, können aber auf einer trans-komplementierenden Zelllinie (RK13-48) hochtitrig vermehrt werden.

In die abgestuft attenuierten Vektor-Varianten wurden unterschiedliche Transgene eingesetzt. Anschließend wurden deren Sicherheit und ihre immunogenen Eigenschaften analysiert.

Der Sicherheitsaspekt wurde zum einen anhand der vektor-viralen pathogenen Eigenschaften zum anderen mittels Biodistributions-Analysen von Luciferase-codierenden EHV-1 im Mausmodell beurteilt. Die auf RacH basierenden Vektoren EHV-luc und EHV-luc- $\Delta$ UL48 erwiesen sich nach intranasaler Applikation in Balb/c Mäusen als apathogen, wohingegen der auf RacL basierende EHV-L-luc zu reversiblen klinischen Symptomen wie starkem Gewichtsverlust führte. Eine Analyse der Biodistribution durch *in vivo Imaging* und quantitative *Real-Time-PCR* zeigte, dass die Vektoren abhängig von der Applikationsroute (intranasal vs. intramuskulär) im entsprechenden Gewebe bzw. Kompartiment verbleiben und sich nicht unkontrolliert im Körper der Maus ausbreiten. Dabei

wies EHV-luc sowohl die stärkste Transgen-Expression als auch die höchste Zahl an Genom-Äquivalenten in den Mausgeweben auf.

Für Immunisierungsstudien wurden Vektoren hergestellt, die für das HIV-Hüllprotein gp120 codieren. Sowohl EHV-gp120 als auch EHV-gp120- $\Delta$ UL48 induzierten in Balb/c Mäusen nach intranasaler Applikation gp120-spezifische zelluläre und humorale Immunantworten. Eine heterologe *Prime/Boost* Strategie mit einer DNA-Grundimmunisierung und zweifachem intranasalen *Boost* mit EHV-gp120 induzierte darüber hinaus gp120-spezifische mukosale humorale Immunantworten. Die immunogenen Eigenschaften von EHV-gp120- $\Delta$ UL48 erwiesen sich dabei gegenüber EHV-gp120 als deutlich reduziert, was Daten aus früheren Immunisierungsstudien, die mit HIV-*gag* als Reporterkonstrukt durchgeführt wurden, bestätigte.

EHV-1-Vektoren können humane *in vitro* generierte Dendritische Zellen transduzieren und deren Maturation hervorrufen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die EHV-1-Vektoren auch primäre Monozyten bzw. Makrophagen und B-Zellen transduzieren können und die Expression des codierten Transgens vermitteln. Dies ist zum einen vielversprechend hinsichtlich des Einsatzes EHV-1-basierter rekombinanter Vakzine im Menschen, zum anderen ließen sich EHV-1-Vektoren auch anstelle kostenintensiver Peptide zur Restimulation von T-Zellen in *ex vivo* Assays einsetzen.

Zur Abschätzung des Impferfolges in einem *in vivo* Belastungsmodell (*Challenge-Modell*) wurde in den pathogenen EHV-L-luc-Vektor zusätzlich ein HIV-*gag*-Gen eingebracht, um damit eine HIV-Infektion im Mausmodell zu imitieren. Eine intranasale Infektion mit EHV-L-luc-gag von Balb/c Mäusen, die zuvor mit hoch attenuierten rekombinanten pockenviralen Vektoren (NYVAC-gag) immunisiert worden waren, zeigte im Vergleich mit nicht-immunisierten Mäusen, dass die intranasale Immunisierung mit NYVAC-Vektoren einen Schutz vor der EHV-L-luc-gag Infektion induzierte, wohingegen eine intramuskuläre Immunisierung das Immunsystem der Balb/c Mäuse sogar negativ beeinflusste. Diese Effekte wurden jedoch nicht nur durch das Gag-Antigen verursacht, sondern wurden vor allem durch die NYVAC-Vektoren selbst hervorgerufen.

## Einleitung

### A.1 HIV

#### A.1.1 Epidemiologie

Nach Angaben der WHO und UNAIDS sind mittlerweile weltweit etwa 33 Millionen Menschen mit HIV infiziert, und die Zahl steigt weiterhin. 2008 haben sich 2,7 Millionen Menschen neu infiziert, und zwei Millionen sind an den Folgen von AIDS gestorben. Die neusten Entwicklungen zeigen, dass das Virus sich derzeit verstärkt in Osteuropa und Teilen Asiens ausbreitet, wobei die momentan am stärksten betroffenen Regionen die Länder im Süden von Afrika sind. Dort leben 67 % der weltweit mit HIV infizierten Menschen. Frauen und Männer sind dabei gleichermaßen betroffen, da die Übertragung meist über heterosexuellen Geschlechtsverkehr oder von der Mutter auf ihr Kind stattfindet. In anderen Ländern sind vor allem Prostituierte, praktizierende homosexuelle Männer und Drogenabhängige aufgrund der erhöhten Ansteckungsgefahr durch zahlreiche wechselnde Sexualpartner und kontaminierte Injektionsnadeln betroffen. Warum der bevorzugte Übertragungsweg zwischen unterschiedlichen Regionen variiert, ist derzeit noch nicht geklärt. (WHO und UNAIDS, AIDS epidemic update 2009).



**Abb. A-1) Verteilung der HIV-positiven Menschen auf der Welt**

Angegeben sind die Zahlen an HIV-positiven Menschen des jeweiligen Erdteils. Derzeit sind insgesamt 33,4 Millionen Menschen der Erdbevölkerung betroffen. (nach: AIDS epidemic update 2009, WHO)

### A.1.2 Krankheitsverlauf

Der Krankheitsverlauf von HIV wird in drei Phasen eingeteilt: die akute Phase, die Latenzphase und die AIDS- (*acquired immunodeficiency syndrome*) Phase.

In der akuten Phase treten in 20 bis 30 % der Fälle grippeähnliche Symptome wie allgemeine Abgeschlagenheit, Lymphknotenschwellung, Nachtschweiß, Appetitverlust und Hautausschlag auf. Diese Symptome können einige Tage anhalten. Währenddessen kommt es zu einer starken Virusvermehrung, so dass bis zu  $10^8$  Partikel pro Milliliter Blut nachgewiesen werden können und eine Ansteckungsgefahr anderer Personen besonders groß ist. Da  $CD4^+$ -Zellen das Hauptreservoir für HI-Viren darstellen, kommt es zu einer starken Dezimierung dieser Population während der akuten Phase (Veazey et al., 1998; Susanne Modrow et al., 2003).

In der anschließenden Latenzphase verbleibt das Virus vorwiegend vom Immunsystem unerkant in ruhenden  $CD4^+$ -Zellen in einer labilen Präintegrationsform oder einer stabilen Postintegrationsform (Zamborlini et al., 2007; Alexaki et al., 2008). In dieser Zeit, die mehrere Jahre andauern kann, ist nur eine geringe Konzentration an Virus im Blut nachweisbar. Dabei sinkt die Zahl an  $CD4^+$ -Zellen langsam ab. Als kritische Grenze gelten 200  $CD4^+$ -Zellen pro Mikroliter Blut bis in der dritten Phase die klinischen Symptome von AIDS auftreten (1992).

Bakterien, Pilze und Viren, die bei einem gesunden Menschen nur selten eine Erkrankung verursachen, können sich nun ungehindert ausbreiten. Schließlich erliegt der Patient meist einer lebensbedrohlichen, opportunistischen Infektion. Die Entwicklung zum Vollbild AIDS kann heute wirksam verhindert werden, wenn schon zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion mit der HAART (*highly active retroviral therapy*), also mit der Verabreichung antiretroviraler Medikamente, begonnen wird. Derzeit sind 25 solcher Medikamente zugelassen, von denen der Patient immer mehrere gleichzeitig einnehmen muss (De Clercq, 2010). Auf diese Weise wird die Viruslast langfristig niedrig gehalten, wodurch auch die Ansteckungsgefahr anderer stark verringert wird. Eine Heilung kann durch diese Behandlung jedoch nicht erreicht werden. Die Hauptursache ist wahrscheinlich die Persistenz von HIV in langlebigen  $CD4^+$ -Zellen, in denen das Virus unerkant im Körper verbleibt (Finzi et al., 1997; Finzi et al., 1999). Darüber hinaus werden Monozyten und Dendritische Zellen als weiteres Reservoir der Latenz für HIV diskutiert (Überblick: (Coleman & Wu, 2009)). Zudem sind die antiretroviralen Medikamente sehr kostspielig und führen aufgrund starker Nebenwirkungen zu erheblichen Beeinträchtigungen der Lebensqualität. Problematisch ist auch die Versorgung der Betroffenen mit den nötigen Medikamenten in Ländern mit schlechter Infrastruktur und die dazugehörige Überwachung der Patienten. Die einfachste Lösung wäre die Verhinderung der Ausbreitung der HIV-Pandemie durch Vorbeugung neuer Infektionen. Dies wird unter anderem mit Aufklärungskampagnen versucht, stößt aber in der Realität auf

viele Hindernisse. Deshalb ist es von großem Interesse, einen Impfstoff zu entwickeln, um das Fortschreiten der Pandemie aufzuhalten.

### A.1.3 Herausforderungen an die HIV-Impfstoffentwicklung

Wenige Jahre nachdem das HI-Virus von den Arbeitsgruppen Luc Montagniers und Robert Gallos aus HIV-Patienten 1983 zum ersten Mal isoliert wurde (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983; Gallo *et al.*, 1983), begann man mit der Entwicklung eines HIV-Impfstoffes. Seitdem wurden zahlreiche Vakzinekandidaten untersucht und zum Teil bereits im Menschen getestet. Doch bis jetzt ist es nicht gelungen, einen protektiven Impfstoff zu entwickeln.

Eine der Ursachen ist die hohe Variabilität von HIV. Es sind zwei Typen von HIV beschrieben worden: HIV-1 und HIV-2. HIV-2 ist weniger virulent und beschränkt sich geographisch hauptsächlich auf Westafrika und Indien (de Silva *et al.*, 2008). Weitverbreitet hingegen sind Viren des HIV-1 Typs. HIV-1 wird in drei Hauptgruppen eingeteilt: M (*main*), O (*outlier*) und N (*non-main* und *non-outlier*). Die meisten HIV-1 Subtypen gehören zur M-Gruppe, die momentan 22 genetische Formen, sogenannte *Clades*, beinhaltet. In infizierten Individuen entstehen ständig neue Virus-Varianten vor allem aufgrund der hohen Mutationsrate während der reversen Transkription bei der Virusreplikation und durch den mutagenen Einfluss des wirtsspezifischen APOBEC3-Enzyms. Dieses Enzym führt durch die Desaminierung von Cytosin-Basen zu Uracil-Resten und damit zu einer Vielzahl genetischer Veränderungen im viralen Genom (Bishop *et al.*, 2004; Romani *et al.*, 2009). Zudem ist es möglich, dass Viren unterschiedlicher Subtypen innerhalb eines Individuums rekombinieren. Dadurch entstehen immer wieder neue Virus-Varianten, die dem Immunsystem des Wirts entgehen können (Überblick: (Lal *et al.*, 2005).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Infektion mit C-*Clade* oder B-*Clade* HIV-1 in 80 % der Fälle nur von einem Virus initiiert wurde (Abrahams *et al.*, 2009; Keele *et al.*, 2008). Hat eine Infektion eines Menschen stattgefunden, persistiert die HI-virale DNA lebenslang in ruhenden CD4<sup>+</sup>-Zellen im Körper (Finzi *et al.*, 1999). Dort bleibt das Virus vom Immunsystem unerkant bis es zu einer erneuten Vermehrung kommt. Aufgrund dieser Tatsache wird eine Vakzine eine Infektion höchstwahrscheinlich nur verhindern können, wenn sie die Induktion einer sterilen Immunität gegen HIV induziert.

Erschwerend kommt hinzu, dass HIV viele Mechanismen besitzt, der humoralen und zellulären Immunantwort durch den Wirt zu entgehen (Wei *et al.*, 2003; Barouch *et al.*, 2002; Peyerl *et al.*, 2004). Dabei sind die Korrelate einer schützenden Immunantwort immer noch unklar (Pantaleo & Koup, 2004).

Als gesichert gilt die besondere Rolle der mukosalen Immunantwort, zum einen, weil es in der Mukosa zum ersten Kontakt mit dem Virus kommt, zum anderen aber auch, weil das Hauptreservoir, die CD4<sup>+</sup>-Zellen, hauptsächlich dort vorzufinden ist (Shacklett *et al.*, 2009).

Diese CD4<sup>+</sup>-Zellen sind damit auch das erste Ziel einer HIV-Infektion (Veazey et al., 1998; Mehandru et al., 2004).

Eine erfolgreiche Vakzine sollte also möglichst Immunantworten gegen konservierte Bereiche des HI-Virus induzieren und eine breite Diversität aufweisen. Dabei sollte vor allem ein Immunschutz in der Mukosa aufgebaut werden, um das Virus gleich zu Beginn einer Infektion abzufangen.

### **A.1.3.1 HI-virale Hüllproteine als Vakzinekandidat**

#### **A.1.3.1.1 Neutralisierende Antikörper gegen die Hüllproteine**

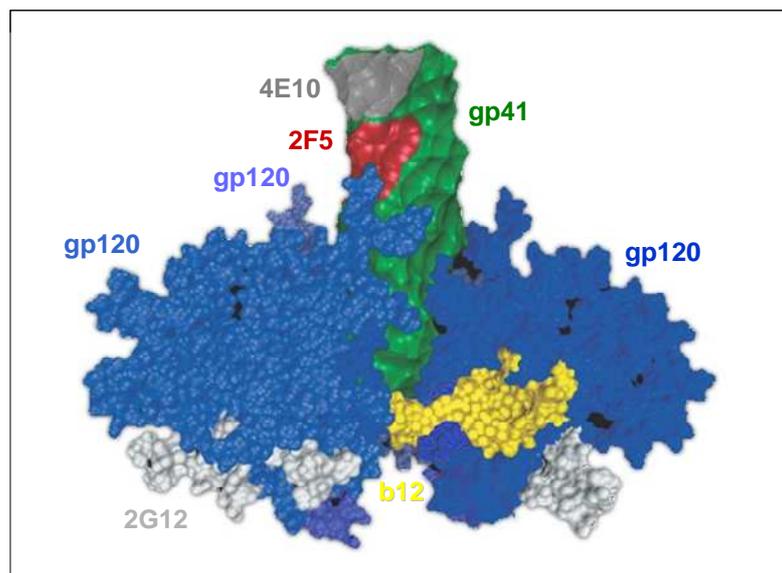
Das beste Korrelat für einen Schutz durch bisher bekannte Impfstoffe sind neutralisierende Antikörper. Auch gegen HIV-1 gibt es neutralisierende Antikörper, die gegen virale Glykoproteine auf der Virusoberfläche gerichtet sind (Burton *et al.*, 2004). Diese Glykoproteine sind als trimere Komplexe angeordnet, die sich aus je drei Transmembranproteinen gp41 und den daran nicht-kovalent assoziierten Oberflächenproteinen gp120 zusammensetzen. Diese Komplexe interagieren mit den humanen CD4-Rezeptoren und CCR5- oder CXCR4-Korezeptoren (Chemokinbinderezeptoren) auf der Zelloberfläche und initiieren so die Infektion einer Zielzelle. Dabei finden wesentliche Konformationsänderungen der Proteine statt, die schließlich das Fusionieren der viralen Membran mit der Zellmembran ermöglichen (Wyatt & Sodroski, 1998). Während dieses Vorgangs werden lineare Epitope des gp41 Hüllproteins frei zugänglich, welche durch die beiden neutralisierenden humanen Antikörper 2F5 (Muster *et al.*, 1993) und 4E10 (Stiegler *et al.*, 2001) erkannt werden. Diese aus Langzeitüberlebenden, den sogenannten „*long term non-progressors*“, isolierten neutralisierenden Antikörper können dem zufolge nur während der Fusion des Virus mit der Wirtszelle neutralisierende Wirkung zeigen (Frey *et al.*, 2008). Derzeit versucht man einen Impfstoff zu generieren, der die relevanten Epitope von gp41, in der zur Induktion breitneutralisierender Antikörper korrekten Konformation darstellen kann. Zusätzlich werden unter anderem verschiedene Adjuvantien und unterschiedliche Immunisierungsstrategien mit einbezogen um die Wirksamkeit zu verbessern (Montero *et al.*, 2008).

Auch gegen die nach Außen gerichteten gp120-Proteine des HIV-Hüllprotein-Komplexes gibt es neutralisierende Antikörper. Die gp120-Proteine bestehen jeweils aus fünf variablen und fünf konstanten Regionen. Die konstanten Regionen liegen geschützt in der inneren Domäne, wohingegen die variablen Regionen in der äußeren Domäne exponiert sind und aufgrund ihrer Veränderlichkeit keinen geeigneten Angriffspunkt für breitneutralisierende Antikörper bieten. Durch die Oligomerisierung und eine starke Glykosylierung, die bis zu 50 % der Molekülmasse ausmachen kann, wird gp120 zusätzlich vom Immunsystem abgeschirmt (Pantophlet & Burton, 2006; Wyatt *et al.*, 1998; Kwong *et al.*, 1998).

Erschwerend kommt hinzu, dass der sogenannte Glykanschild selbst auch immer wieder Mutationen unterliegt (Wei *et al.*, 2003).

Trotzdem konnten zwei breitneutralisierende monoklonale Antikörper, b12 und 2G12, gegen gp120 isoliert werden, die eine sehr große Bandbreite an Primärisolaten neutralisieren können (Binley *et al.*, 2004). Das Epitop des b12 Antikörpers überlappt dabei mit der CD4-Bindestelle des gp120 Proteins. Das Epitop von 2G12 sind ungewöhnlicherweise Manosereste des Glykanschilds ohne direkten Kontakt zu darunter liegenden Aminosäuren (Abb.A-2). Diese sind jedoch als Bindestelle der Glykane für das Glykosilierungsmuster damit für die Bildung des Epitops für 2G12 verantwortlich (Gray *et al.*, 2007; Calarese *et al.*, 2003).

Diese Beobachtungen zeigen, dass es auch trotz der breiten Diversität von HIV breitneutralisierende Antikörper gegen das Virus gibt und die Induktion humoraler Immunantworten einen wichtigen Aspekt einer HIV-Vakzine darstellt.



**Abb. A-2) Modell eines HIV-1 Hüllproteinkomplexes.**

Die Epitope der breitneutralisierender Antikörper 4E10 (dunkelgrau), 2F5 (rot), 2G12 (grau) und b12 (gelb) sind farbig markiert. Die drei gp120 Proteine sind in blau dargestellt, der in diesem Modell sichtbare Teil von gp41 in grün. Die Epitope für 4E10 und 2F5 sind vor der Bindung mit dem CD4-Rezeptor nicht für Antikörper zugänglich. (nach (Burton *et al.*, 2004))

**A.1.3.1.2 Rekombinantes gp120 als Vakzine**

Breit neutralisierende Antikörper gegen gp120 würden mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit einen effektiven Schutz vor einer HIV-Infektion induzieren (Ferrantelli & Ruprecht, 2002). Erste Hinweise darauf lieferte der Einsatz von neutralisierenden Antikörpern in hohen Dosen als passive Immunisierung in Makaken, wodurch eine Übertragung von SHIV verhindert wurde (Parren *et al.*, 2001; Veazey *et al.*, 2003; Mascola *et al.*, 2000). Aber auch die aktive Immunisierung von Schimpansen mit rekombinantem gp120 erzielte sowohl einen Schutz

vor einer Infektion mit einem homologen Virusstamm (homologer *Challenge*) (Berman *et al.*, 1990; el Amad *et al.*, 1995) als auch vor einem HIV-Primärisolat (heterologer *Challenge*) (Berman *et al.*, 1996). Darauf hin folgten klinische Phase I und II Studien in HIV-negativen Menschen zur Sicherheit und Immunogenität von rekombinantem gp120. Sie zeigten die Verträglichkeit des Impfstoffes sowie die Induktion humoraler Immunantworten, die denen geschützter Schimpansen sehr ähnlich waren (Francis *et al.*, 1998; Pitisuttithum *et al.*, 2004; Belshe *et al.*, 1994; Nitayaphan *et al.*, 2000). Allerdings weisen diese Antikörper gegen das gp120-Protein keine neutralisierende Wirkung gegen Primärisolate aus Patienten auf (Mascola *et al.*, 1996; Connor *et al.*, 1998). Trotzdem führte man erste doppelt-blinde, Placebo-kontrollierte Phase III Studien mit rekombinantem gp120 in den USA und den Niederlande sowie in Thailand durch. Dabei zeigte sich jedoch, dass die Immunisierung weder einen Schutz vor einer Infektion bietet noch einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf nimmt (Flynn *et al.*, 2005; Gilbert *et al.*, 2005; Pitisuttithum *et al.*, 2006). Dennoch lieferten diese Studien wichtige Daten für die weitere Entwicklung einer HIV-Vakzine. Im Vordergrund steht deshalb die Weiterentwicklung des Immunogens, um gezielt breitneutralisierende Antikörper induzieren zu können. Derzeitige Strategien befassen sich mit der Nachbildung von kompletten Struktur des gp41/gp120 trimeren Komplexes oder der Verwendung von Peptiden als Antigen für neutralisierende Antikörper (Pantophlet & Burton, 2006).

### **A.1.3.2 Rolle der T-Zellantworten**

Ein weiteres wesentliches Ziel der derzeitigen HIV-Impfstoffentwicklung liegt in der Induktion von spezifischen zytotoxischen T-Zellen (CTL). CTL sollen allgemein die Ausbreitung einer Infektion innerhalb des Körpers durch Zerstörung infizierter Zellen und Ausschüttung von Cytokinen aufhalten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass sie auch bei einer HIV-1-Infektion, insbesondere bei der Replikationskontrolle, eine wichtige Rolle spielen (Harrer *et al.*, 1996; Koup *et al.*, 1994; Kuroda *et al.*, 1999; Barouch *et al.*, 2002). Einen wichtigen Hinweis auf den starken Einfluss bei einer HIV-Infektion gibt die schnelle Entstehung von Flucht-Mutanten unter dem Selektionsdruck von CTL auf HI-Viren in einem Patienten. Dabei entstehen Viren, die aufgrund von Mutationen in wichtigen CTL-Epitopen der zellulären Immunantwort entgehen und die anfänglichen Virus-Varianten ersetzen können (Peyerl *et al.*, 2004; Borrow *et al.*, 1997). Versuche in Makaken ohne CTL-Aktivität zeigten darüber hinaus, dass es bei einer fehlenden zellulären Immunantwort zu einer gesteigerten HIV-Virämie kommt und folglich zu einem verstärkten Abfall der CD4<sup>+</sup>-Zellzahl (Matano *et al.*, 1998; Schmitz *et al.*, 1999).

Den vielversprechendsten Hinweis lieferte die Untersuchung von HIV-1-exponierten, nicht infizierten Menschen. In diesen fand man HIV-1-spezifische CTL-Antworten, obwohl keinerlei

Virus nachweisbar war (Rowland-Jones et al., 1998; Herr et al., 1998). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass spezifische CTL die ersten, kleinen Infektionsherde eindämmen und damit die Abwehr der Infektion bewirkt haben. Allerdings konnte nur in seltenen Fällen eine Infektion durch spezifische T-Zell-Antworten verhindert werden. Ein zusätzlicher wichtiger Faktor dabei ist die genetische Voraussetzung eines Individuums. So sind die Art und die Anzahl der verschiedenen HIV-Epitope, die infizierte Individuen präsentieren können, abhängig vom HLA (*Human Leukocyte Antigen*)-Phänotyp eines Menschen. Dabei stellten sich bestimmte HLA-B Allele zur Kontrolle der Viruslast als besonders günstig heraus (Geldmacher et al., 2007; Honeyborne et al., 2007; Kiepiela et al., 2004; Frahm et al., 2005). Des Weiteren scheint auch die Art der T-Zell-Antwort eine wichtige Rolle zu spielen. So zeigen die Untersuchungen von Langzeit-Überlebenden, dass diese nicht nur akute Effektor-T-Zellen sondern auch langlebigen polyfunktionale Gedächtnis-T-Zellen (CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> und IL-2<sup>+</sup>) besitzen (Pantaleo & Koup, 2004; Harari et al., 2007).

Es ist umstritten, ob eine Vakzine, die vorwiegend T-Zell-Antworten induziert, eine sterile Immunität gewährleisten kann, da hauptsächlich bereits infizierte Zellen prozessierte Antigene an T-Zellen präsentieren können. Es wäre jedoch bereits eine große Verbesserung, wenn die Viruslast des einzelnen Patienten gesenkt und somit der Krankheitsverlauf verzögert werden würde. Dies könnte schließlich zu einer Eindämmung der Pandemie führen, da die Ansteckungsgefahr von Sexualpartnern mit der Viruslast korreliert (Girard *et al.*, 2006; Letvin, 2006).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine ideale HIV-Vakzine eine lang anhaltende humorale sowie zelluläre Immunantwort induzieren sollte. Diese Antworten sollten sowohl quantitativ als auch qualitativ gut sein, so dass breitneutralisierende Antikörper und eine breite T-Zell-Antwort gegen konservierte HIV-Epitope induziert werden. Dabei wäre von Vorteil, wenn vor allem die Mukosa einen Immunschutz aufweist, um bereits beim ersten Kontakt mit dem Virus eine Infektion zu verhindern.

### **A.1.3.3 Derzeitiger Stand der HIV-Vakzine Entwicklung**

Neben dem Antigen beeinflusst vor allem die Wahl des verwendeten Vektorsystems, welche Teile des Immunsystems durch die Vakzine angesprochen werden. Gegen viele Viruserkrankungen werden lebend attenuierte Vakzine eingesetzt, da sie weitestgehend den natürlichen Krankheitsverlauf darstellen. Dadurch werden meist sowohl humorale als auch zelluläre Immunantworten induziert, die eine spätere Erkrankung erfolgreich verhindern (Pantaleo & Koup, 2004). Der Einsatz von attenuierten HIV im Tiermodell zeigte jedoch, dass diese persistieren und selbst AIDS hervorrufen können, so dass der Einsatz im Menschen aus Sicherheitsgründen unmöglich ist (Baba *et al.*, 1995; Baba *et al.*, 1999). Im Vergleich dazu wären Totimpfstoffe genau wie die Immunisierung mit Peptiden, Proteinen bzw.

Untereinheiten des HI-Virus zwar sicher, waren jedoch für die Induktion von breit neutralisierenden Antikörpern sowie CTL-Antworten nur bedingt geeignet (Barouch, 2008). Aktuelle Strategien befassen sich deswegen mit der Verwendung von Plasmid-DNA oder rekombinanten Vektoren, die bakteriellen oder viralen Ursprungs sind. Diese Vektoren ermöglichen das Einbringen von Antigen-codierender DNA in Zellen des Organismus, wo die Antigene anschließend exprimiert werden. Idealerweise werden dafür optimierte Sequenzen verwendet, deren Codongebrauch der Zielzelle angepasst wurde und für eine Stabilisierung der transkribierten mRNA sorgt (Graf *et al.*, 2004). Plasmid-DNA hat den Vorteil, dass sie ein sehr gutes Sicherheitsprofil aufweist und ausschließlich die Expression des gewünschten Antigens induziert. Jedoch ruft sie erst nach mehrfacher Injektion hoher Dosen eine ausreichende Immunantwort in Primaten oder Menschen hervor (Graham *et al.*, 2006). Die Ursache liegt wahrscheinlich bei der ineffizienten Transfektion der Zellen. Durch Einsatz von Adjuvantien und unterschiedlichen Verabreichungstechniken wie z. B. Elektroporation wird gegenwärtig an einer Verbesserung der erzielten Ergebnisse gearbeitet (Barouch *et al.*, 2000; Chong *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008; Luckay *et al.*, 2007).

Als die vielversprechendste Immunisierungsstrategie hat sich derzeit eine Kombination aus einer Plasmid-DNA Grundimmunisierung (*Prime*) und einer anschließenden Immunisierung mit viralen Vektoren (*Boost*) herausgestellt. Darauf basierend gibt es zahlreiche klinische Studien, in denen unterschiedliche Vektorsysteme evaluiert werden (Barouch, 2008).

#### **A.1.3.4 Virale Vektoren als HIV-Impfstoffkandidaten**

##### **A.1.3.4.1 Allgemein**

Viren schleusen natürlicherweise genetisches Material in eukaryontische Zellen. Normalerweise ermöglicht dieser Vorgang die Replikation und Vermehrung des viralen Genoms. Werden Viren im Labor jedoch so modifiziert, dass sie Fremd-DNA enthalten, können sie entsprechend ihres natürlichen Zelltropismus als rekombinante virale Vektoren für den heterologen Gentransfer eingesetzt werden.

Codiert die Fremd-Sequenz darüber hinaus für ein Immunogen, entstehen Vakzinekandidaten, die nach der Transduktion der Wirtszelle die Expression des Antigens ermöglichen und damit Immunantworten induzieren können. Neben dem Antigen selbst beeinflussen die Eigenschaften des Vektorsystems das immunogene Potential des Vakzinekandidaten, beispielsweise der virusspezifische Zelltropismus, eventuell vorhandene präexistierende Immunität in der Bevölkerung, die Pathogenität oder die Verpackungskapazität. Darüber hinaus sollten die viralen Vektoren möglichst wenig eigene Proteine exprimieren und eine gute Expression des Transgens aufweisen, damit Immunantworten hauptsächlich gegen das Antigen und nicht gegen den Vektor selbst induziert werden.

Viele virale Vektorsysteme wurden bereits in klinischen Studien untersucht wie Adenovirus Typ 5 (Ad5)-Vektoren und pockenvirale Vektorsysteme basierend auf Canary-Pox-Viren, MVA (modifiziertes Vaccinia Virus Ankara), NYVAC (New York Vaccinia Virus) oder Fowlpox-Vektoren (Robert-Guroff, 2007; Gomez et al., 2007d; Gomez et al., 2007e). Dabei wurden die bisher größten klinischen Studien mit Canarypox- (Phase III) oder Ad5-Vektoren (Phase II) durchgeführt (<http://www.iavireport.org>).

#### **A.1.3.4.2 Ad5-Vektoren**

Ad5-Vektoren erfüllen viele Voraussetzungen für ein sicheres und effizientes Vektorsystem. Sie können sowohl ruhende als auch sich teilende Zellen transduzieren, in denen sie eine hohe Expressionsrate ihres bis zu 8 kb großen Transgens zeigen. Zu ihren Zielzellen gehören auch professionelle Antigen-präsentierende Zellen wie Dendritische Zellen, so dass sie gute humorale wie zelluläre Immunantworten induzieren können. Dabei integrieren die replikationsinkompetenten Ad5-Vektoren nicht in das Wirtsgenom. Ein Nachteil ist jedoch der große Anteil an Ad5-Seropositiven in der Bevölkerung, wodurch bereits eine hohe Vektorimmunität vorhanden ist (Robert-Guroff, 2007; Harro et al., 2009).

Untersuchungen in Affen mit Ad5-Vektoren in Kombination mit einer DNA Grundimmunisierung erwiesen sich als sehr vielversprechend (Shiver et al., 2002; Casimiro et al., 2003). Zwar wurde durch die Immunisierung nicht die Infektion mit SHIV verhindert, aber sie reduzierte die Viruslast beträchtlich und sorgten für einen Erhalt der CD4<sup>+</sup>-Zellzahlen (Watkins et al., 2008). Nachdem feststand, dass die Ad5-Vektoren auch im Menschen gut verträglich sind und darüber hinaus spezifische T-Zell-Antworten induzieren (Priddy et al., 2008; Catanzaro et al., 2006; Harro et al., 2009), erfolgte eine Placebo-kontrollierte, doppelt-blinde Studie zur Wirksamkeit der Vakzine. In dieser Studie (HVTN 502 oder „STEP“) wurde eine Mischung aus drei rekombinanten Ad5-Vektoren, die jeweils HIV-1-*gag*, *-pol* oder *-nef* (B-Clade) enthielten, verabreicht. 3000 Probanden aus Nord- und Südamerika sowie der Karibik und Australien erhielten dabei jeweils drei Dosen des Impfstoffes (Buchbinder et al., 2008). Dies führte in 77 % der Probanden zu spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antworten und in 41 % der Probanden zu CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Antworten (McElrath et al., 2008). Trotzdem wurde die Studie 2007 vorzeitig beendet, nachdem sich herausstellte, dass die Vakzine nicht, wie erwartet, die Zahl an Neuinfektionen reduzierte oder eine Virämie günstig beeinflusste. Stattdessen traten sogar mehr neuinfizierte (meist homosexuelle) Männer in der Gruppe der Geimpften (49 Probanden) im Vergleich zur Placebo-Kontrollgruppe (33 Probanden) auf. Nur eine Frau, die ein Placebo erhalten hatte, infizierte sich in dieser Zeit (Buchbinder et al., 2008). Dabei zeigte sich insgesamt ein Trend, dass eine vorhandene starke Immunantwort gegen Ad5 vor der Immunisierung (neutralisierender Antikörpertiter > 200) das Risiko einer HIV-Infektion eventuell begünstigt. Die Gründe dafür sind bis jetzt noch nicht geklärt. Die Vermutung, dass Ad5-spezifische

CD4<sup>+</sup>-Zellen, z. B. als Reservoir für die Virusreplikation, eine Rolle für die HIV Prädisposition spielen, konnte bis jetzt nicht bestätigt werden (Hutnick *et al.*, 2009). Dagegen spricht auch, dass die präexistierenden Ad5-spezifischen Antikörper keinen Einfluss auf die Höhe der Vektor-spezifischen T-Zell-Antworten nach der Vakzinierung in den Probanden hatten (O'Brien *et al.*, 2009). *Ex vivo* Experimente gaben Hinweise darauf, dass Immunkomplexe aus Ad5-spezifischen Antikörpern mit Ad5-Virionen T-Zellen in Wechselwirkung mit Dendritischen Zellen so beeinflussen, dass sie verbesserte Bedingungen für eine HIV-Replikation in T-Zellen schaffen (Perreau *et al.*, 2008). Weiterhin bleibt aber offen, ob es ein Versagen des Ad5-Impfstoffes oder einer T-Zell-induzierenden Vakzine *per se* ist. Darüber hinaus zeigte die Studie, dass es möglich wäre, dass auch andere Faktoren, wie z. B. ob ein Mann beschnitten ist oder nicht, Einfluss auf das Ansteckungsrisiko haben können.

#### **A.1.3.4.3 Pockenvirale Vektoren**

Auch attenuierte Vogel- und Säuger-Pockenviren werden als virale Vektorsysteme evaluiert. Beide sind in humanen Zellen replikationsdefizient und integrieren nicht ins Wirtszellgenom. Ihre Replikation und damit auch die komplette Expression der viralen Gene erfolgt in der natürlichen Wirtszelle im Cytoplasma. Pockenvirale Vektoren können bis zu 25 kb große Transgene aufnehmen und zeigen gute immunogene Eigenschaften. Ein wesentlicher Nachteil ist jedoch die wahrscheinlich sehr hohe Vektorimmunität in der Bevölkerung aufgrund von Kreuzreaktionen durch die früher gesetzlich vorgeschriebene Pockenschutzimpfung (Pastoret & Vanderplassen, 2003).

Die bisher besten Erfolge einer klinischen Studie mit einem viralen Vektorsystem als HIV-Impfstoffkandidat erreichte die Placebo-kontrollierte, doppelt-Blindstudie RV144 in Thailand. Dazu wurden 16 402 Teilnehmer zwischen 18 und 30 Jahre unabhängig von HIV-Risikogruppen rekrutiert und in zwei gleiche Gruppen aufgeteilt. Eine davon erhielt ein Placebo, die andere Gruppe vier Immunisierungen mit gp120 exprimierenden Canarypox-Vektoren (ALVAC) und zwei Booster-Immunisierungen mit rekombinantem gp120 (AIDSVAX B/E). Dadurch konnten in den immunisierten Probanden sowohl spezifische T-Zell-Antworten als auch spezifische Antikörper induziert werden (Belshe *et al.*, 1998; 2001; Nitayaphan *et al.*, 2004). Der Vergleich der Neuinfizierten beider Gruppen (74 der geimpften Gruppe versus 51 der Placebogruppe) ergab einen 31,2 %igen Schutz vor einer HIV-Infektion. Ein erhoffter positiver Einfluss auf den Erhalt der CD4<sup>+</sup>-Zellzahl konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Rerks-Ngarm *et al.*, 2009). Auch wenn nur ein geringer Schutz vor einer HIV-Infektion erreicht werden konnte, zeigt dies, dass möglicherweise die Kombination unterschiedlicher Vakzine der Schlüssel zur Induktion einer wirksamen Immunantwort sein könnte; vor allem angesichts der Tatsache, dass AIDSVAX B/E alleine

weder eine Infektion verhindert noch den Krankheitsverlauf positiv beeinflusst (Pitisuttithum et al., 2006; Flynn et al., 2005).

Auch andere pockenvirale Vektoren sind vielversprechende Kandidaten für eine HIV-Vakzine. NYVAC entstand aus dem Kopenhagen Stamm durch Deletion von 18 Genen, die das Wirtsspektrum und die Virulenz beeinflussen, was zu einem hoch attenuierten pockenviralen Vektor führte (Tartaglia et al., 1992). MVA entstand nach einer Serie von Passagen in embryonalen Hühnerfibroblastenzellen, wodurch die Viren unter anderem Gene zur Immunabwehr verloren und ebenfalls stark attenuiert wurden (Blanchard et al., 1998). Sowohl NYVAC als auch MVA zeigten in Mausstudien gute Transgen-Expression und immunogene Eigenschaften (Wild et al., 2009a; Gomez et al., 2007e; Gomez et al., 2007d). Im Menschen bewiesen sie in Phase I Studien eine gute Verträglichkeit, wobei die besten Immunantworten in Kombination mit einer DNA-Grundimmunisierung erreicht wurden (Bart et al., 2008; McCormack et al., 2008; Peters et al., 2007).

Auch andere klinische Studien mit viralen Vektorsystemen zeigten, dass heterologe Immunisierungsstrategien homologen *Prime/Boost*-Strategien vorzuziehen sind. Dabei spielt wahrscheinlich die Vektorimmunität eine große Rolle, die nach dem ersten Kontakt mit dem Vektor in den meisten Fällen auftritt. In einer aktuellen Phase Ib Studie (HVNT 078) untersucht man momentan eine heterologe *Prime/Boost*-Strategie mit rekombinanten NYVAC- und Ad5-Vektoren an 80 Ad5-seronegativen, HIV-negativen Probanden in der Schweiz, nicht zuletzt auch im Hinblick darauf, weitere Hinweise für das Versagen der Ad5 Vektoren in der „STEP“-Studie zu erlangen.

Die Etablierung weiterer viraler Vektorsysteme wird zudem mehr Kombinationsmöglichkeiten von Impfstoffen eröffnen und dadurch helfen eine Vakzine zu entwickeln, die mit der Induktion einer breiten humoralen und zellulären Immunantwort einen Schutz gegen HIV bieten kann.

#### **A.1.3.5 Lösungsansätze zur Herstellung einer Vakzine**

Eine Vakzine gegen HIV sollte vor allem zytotoxische T-Zell- und Antikörper-Antworten im Genitaltrakt und anderen mukosalen Oberflächen induzieren. Um dieses Ziel zu erreichen, werden basierend auf den bisher gewonnenen Daten verbesserte Immunogene entwickelt, die eine optimale Präsentation von Epitopen für breit neutralisierende Antikörper und zur CTL-Erkennung ermöglichen. Breitneutralisierende Antikörper sind das bessere Korrelat zur Induktion einer sterilen Immunität, T-Zell-Antworten weisen in der Regel jedoch eine breitere Immunantwort auf. So konnten kreuzreaktive T-Zellen, die mehrere Subtypen erkennen, bereits erfolgreich induziert werden. Darüber hinaus kann eine heterologe Impfstrategie bessere Ergebnisse erzielen als homologe. Dabei erwiesen sich Impfstoffkandidat, die allein keine Effektivität aufwiesen, wie AIDSVAX B/E, in Kombination mit anderen als vielversprechend, wie die RV144 Studie in Thailand gezeigt hat. Zusätzlich haben die Immunisierungsrouten und

die verwendeten Adjuvantien Einfluss auf die resultierenden Immunantworten. So konnte eine Immunisierung mit HIV-gp41 und einem Polypeptid der Reversen Transkriptase, das an CTB gekoppelt war, sublingual verabreicht, spezifische IgA Antikörper in der Mukosa sowie spezifische CTL im Genitaltrakt induzieren (Hervouet *et al.*, 2010).

Das zeigt, dass die Wirksamkeit einer HIV-Vakzine von vielen Faktoren abhängt und die richtige Kombination aus Antigen, Vektorsystem und Immunisierungsstrategie ausschlaggebend sein wird.

#### **A.1.4 Tiermodelle für HIV-1**

Ein wichtiges Instrument für die HIV-Vakzine Entwicklung ist die Untersuchung von Vakzineandidaten in Tiermodellen, bevor klinische Studien in Menschen durchgeführt werden können. Als Tiermodell zur Untersuchung des Verlaufs von HIV-1 Infektionen und der Effektivität von Impfstoffen kommt nur der Schimpanse in Frage, denn kein anderes Lebewesen neben dem Menschen kann von HIV-1 infiziert werden (Alter *et al.*, 1984). Doch Schimpansen entwickeln nur vereinzelt AIDS, und auch die HIV-spezifische Immunantwort unterscheidet sich stark zu der einer humanen Reaktion (Rutjens *et al.*, 2003). Aufgrund dessen und aus ethnischen Gründen werden Schimpansen als HIV-1 Tiermodell immer seltener eingesetzt. Alternativ nutzt man verstärkt SIV, HIV-2 oder chimäre Viren aus HIV-1 und SIV, sogenannte SHIV, als Modellsysteme in anderen Primatenmodellen.

Ein Mausmodell zur Untersuchung von HIV-1 wäre von großem Vorteil. Mäuse sind die am häufigsten verwendeten Labortiere und die damit verbundene Methodik ist gut etabliert. Sie haben einen verhältnismäßig geringen Platzbedarf und ermöglichen Experimente mit relativ großen Tierzahlen, die statistisch signifikante Aussagen erlauben. Dies ist nicht zuletzt auf ihren relativ kurzen Vermehrungszyklus mit großen Wurfgrößen zurückzuführen. Darüber hinaus ist es verhältnismäßig einfach, Tiere genetisch zu verändern. Die Etablierung eines geeigneten Kleintiermodells ist von großer Wichtigkeit, da zur Entwicklung einer HIV-Vakzine aller Voraussicht nach die Testung noch zahlreicher Kandidaten und Protokolle nötig sein wird.

##### **A.1.4.1 Humanisierte Mäuse**

Bis jetzt gibt es noch kein gängiges Mausmodell, in dem HIV-1 *in vivo* persistieren kann. Grund dafür sind unter anderem die fehlenden Rezeptoren für den Eintritt des Virus in die Zelle. Die Entwicklung transgener Mäuse, die den humanen CD4-Rezeptor sowie den Chemokinrezeptor CCR-5 exprimieren, ermöglichte es zumindest, Zellen *in vivo* zu infizieren (Browning *et al.*, 1997), jedoch kam es kaum zu einer Freisetzung neuer Virionen. *In vitro* Experimente zeigten, dass ein Defekt beim Viruszusammenbau dafür verantwortlich ist (Mariani *et al.*, 2000). Die Ursache sind wahrscheinlich fehlende Wirtszellfaktoren wie das humane Cyclin T1, das durch das murine Cyclin T1 nicht ersetzt werden kann. Im Menschen

führt die Bindung des humanen Cyclin T1 an das regulatorische HIV-1 Protein Tat zur Transaktivierung des TAR-Elements und leitet somit eine effiziente Replikation ein (Bieniasz *et al.*, 1998).

Doch nicht nur T1 ist für die geringe Virionen Freisetzung verantwortlich. Darüber hinaus fehlen viele weitere Wirtszellfaktoren, die bei jedem Schritt der komplexen HIV-1 Replikation eine Rolle spielen, wie beispielsweise der Spleißing-Inhibitor p32, APOBEC, Fut-3 oder TRIM5 $\alpha$  (Überblick in (Sorin & Kalpana, 2006) und (Arhel & Kirchhoff, 2010)).

Einen Lösungsansatz, um dieses Problem zu umgehen, stellen humanisierte Mäuse dar. Durch die Transplantation humaner Zellen in transgene Mäuse sind Zielzellen für HIV-1 vorhanden und damit alle zellulären Voraussetzungen für eine effektive Replikation. Erste Versuche mit bestrahlten Mäusen, in die humane Knochenmarkszellen und/oder Blutzellen transplantiert wurden, erlaubten jedoch aufgrund der Abwehrreaktionen der Mäuse gegen die fremden Zellen nur Kurzzeitstudien zur Untersuchung humoraler Immunantworten gegen HIV (Schutten *et al.*, 1996).

Eine Verbesserung brachte die Verwendung von Mäusen mit einem schweren kombinierten Immundefekt, sogenannten SCID-Mäusen. Diesen wurden entweder PBMCs in den Bauchraum (huPBL-SCID Modell) (Boyle *et al.*, 1995; Tary-Lehmann *et al.*, 1995) oder humanes fetales Thymus- bzw. Lebergewebe unter die Nierenkapsel transplantiert (SCID-hu (Thy/Liv) Modell) (Bonyhadi & Kaneshima, 1997). Diese Kleintiermodelle können zur Untersuchung von HIV-Infektionen, Pathogenese und Wirksamkeit von anti-HIV-1-Medikamenten eingesetzt werden. Jedoch ist es dadurch nicht möglich ein vollständig funktionales humanes Immunsystem in Mäusen zu etablieren, denn in huPBL-SCID Mäusen ist das Repertoire an verfügbaren B- bzw. T-Zellen sehr beschränkt. Darüber hinaus werden vorhandene T-Zellen schnell inaktiv und reagieren nach einer T-Zell-Rezeptor Stimulierung nicht mehr. Dabei existieren die transplantierten Zellen nicht länger als sechs Monate (Mosier *et al.*, 1988). SCID-hu (Thy/Liv) Mäuse entwickeln überhaupt keine reifen B-Zellen oder zelluläre Immunantworten (Borkow, 2005; Van Duyn *et al.*, 2009). Mäuse, die zusätzlich an einer autoimmunen Diabetes (NOD: *non-obese diabetic*) leiden, zeigen eine Verbesserung bei der Etablierung eines humanen Immunsystems in Mäusen sowie eine erhöhte Virus-Replikation nach einer HIV-1-Infektion. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich am Verlust ihres angeborenen Immunsystems, speziell den NK-Zellen (Koyanagi *et al.*, 1997). Der Nachteil der NOD/SCID-Mäuse liegt aber in der Neigung, häufig Thymus-Lymphome zu entwickeln (Prochazka *et al.*, 1992). Die bisher untersuchten SCID-Mausmodelle lassen also keine Evaluierung von HIV-1 Vakzinen zu.

Eine Weiterentwicklung humanisierter Mausmodelle stellten Mäuse mit defekten Genen für das Rekombination-aktivierende Rag-2 und die Cytokinrezeptor  $\gamma$  Kette (Rag2<sup>-/-</sup> $\gamma$ c<sup>-/-</sup>) dar. Dadurch besitzen die Tiere keinerlei funktionelle murine T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen

mehr (Berges *et al.*, 2006; Goldman *et al.*, 1998). Nach einer intrahepatischen Verabreichung humaner CD34<sup>+</sup>-Zellen aus Nabelschnurblut können dann humane DCs, T- und B-Zellen in Blut, Leber, Milz, Knochenmark, Vagina und im darmassoziierten Immunsystem nachgewiesen werden (Traggiai *et al.*, 2004; An *et al.*, 2007). Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> Mäuse bieten ein gutes Modell zur Untersuchung der HIV-1 Pathogenese, jedoch konnten nur unzureichende HIV-spezifische humorale Immunantworten nachgewiesen werden, wodurch sie für Wirksamkeitsstudien von HIV-Vakzinekandidaten ebenfalls ungeeignet sind (Baenziger *et al.*, 2006; An *et al.*, 2007).

An der weiteren Verbesserung eines humanisierten Mausmodells zur Untersuchung von HIV-1 Vakzinen wird weiterhin gearbeitet. Aktuell entwickelt man sogenannte Trimer Mäuse, deren Knochenmark nach einer Bestrahlung durch das von SCID-Mäusen ersetzt wird. Anschließend werden humane PBLs intraperitoneal verabreicht, wodurch eine schnelle Entwicklung humaner T- und B-Zellen erreicht wird. Die CD4<sup>+</sup>-Zellen können mit HIV-1 infiziert werden, woraufhin deren Zahl stark absinkt. Doch hauptsächlich aufgrund der sehr kurzen Beständigkeit des transplantierten Immunsystems (ein bis zwei Monate) ist auch dieses Mausmodell bis jetzt nicht für Vakzinestudien geeignet (Ayash-Rashkovsky *et al.*, 2005) Überblick: (Borkow, 2005; Van Duyne *et al.*, 2009; Boberg *et al.*, 2008).

#### **A.1.4.2 Chimäre Viren**

Ein anderer Ansatz zur Untersuchung von HIV-1 im Mausmodell ist die Veränderung des Virus und nicht des murinen Wirts um eine permissive Infektion zu ermöglichen. Damit kann die zeit- und kostenintensive Herstellung und Haltung transgener humanisierter Mäuse umgangen werden. Chimäre Viren wurden bereits entwickelt (1) durch Pseudotypisierung von HIV-1 mit Membranproteinen eines mauspathogenen Virus, (2) durch Kombination des HIV-1 Genoms mit der Hülle eines anderen Virus oder (3) durch Verwendung von mauspathogenen Viren, die nur einzelne Gene von HIV-1 tragen.

Die Pseudotypisierung mit Membranproteinen eines mauspathogenen Virus ermöglicht die Nutzung muriner Zellrezeptoren und generiert damit Viren mit einem angepassten murinen Zelltropismus unabhängig vom humanen CD4-Rezeptor (Schauber *et al.*, 2004; Lusso *et al.*, 1990); Überblick: (Cronin *et al.*, 2005). Der Austausch der kompletten HIV-1 Hüllmembran durch z. B. die eines murines Leukämievirus (MuLV) hat letztendlich denselben Effekt. Auch diese chimären Viren besitzen noch das komplette HIV-1 Genom. Es konnte gezeigt werden, dass sie primäre murine Splenozyten *in vitro* infizieren, die zehn bis vierzehn Tage nach Transplantation in naive Mäuse, HIV-Partikel freisetzen. In geimpften Mäusen hingegen werden diese Zellen aufgrund HIV-spezifischer Immunantworten entsprechend früher eliminiert (Hinkula *et al.*, 2004). Wegen der fehlenden humanen Wirtszellfaktoren ist die Replikation dieser chimären HI-Viren in Mäusen jedoch relativ gering. Die Nutzung replikationsfähiger, mauspathogener Viren, die nur noch ein HIV-Gen exprimieren, umgehen

diese Problematik und ermöglichen das Auslesen von Immunantworten gegen ein einzelnes HIV-Antigen. Ein Beispiel für ein solches Virus sind rekombinante Tiantan Viren rTTV-lucgag, deren pockenvirales Genom die Gene für eine *firefly*-Luciferase und für HIV-1-*gag* enthält. Der Vorteil dieser Viren ist die Möglichkeit direkt über die Luciferase-Aktivität die Virusmenge abzuschätzen. Der Nachteil ist jedoch, dass die Zielorgane von rTTV-lucgag nach einer intraperitonealen Infektion Ovarien, Uterus und Gebärmutterhals sind und damit nicht einer natürlichen HIV-Distribution entsprechen (Huang *et al.*, 2009).

Eine Verbesserung solcher chimären *Challenge*-Viren wäre eine Kombination aus einem HIV-1 und einem mauspathogenen Virus, das in der Mukosa lokalisiert ist, um die übliche Infektionsroute von HIV-1 zu imitieren, wie z. B. das Equine Herpesvirus Typ 1 (EHV-1).

## **A.2 EHV-1**

### **A.2.1 EHV-1 – ein Herpesvirus**

EHV-1 gehört zu den Herpesviren und infiziert nach derzeitigem Kenntnisstand ausschließlich Pferde. Herpesvirusinfektionen durch andere Vertreter dieser Ordnung kommen auch in vielen anderen Wirbeltierklassen vor. Jedoch äußern sich die Symptome jeweils sehr unterschiedlich, obwohl sich die Biologie der unterschiedlichen Herpesviren sehr ähnelt. Alle Viren besitzen ein lineares doppelsträngiges DNA-Genom, das im Zellkern infizierter Zellen repliziert und schließlich in neue Nachkommenviren verpackt durch Lyse der Wirtszelle freigesetzt wird. Außerdem besitzen alle Herpesviren die Fähigkeit vom Immunsystem unerkannt in einem latenten Zustand im Wirtsorganismus zu verbleiben, wobei es immer wieder zu einer Reaktivierung mit einer erneuten lytischen Infektion kommen kann. Die meisten Herpesviren, so auch EHV-1, besitzen ein sehr enges Wirtsspektrum, so dass Zoonosen, also die Übertragung vom Tier auf den Mensch oder umgekehrt, bisher nicht beobachtet werden konnten (Modrow *et al.*, 2003).

Aufgrund ihrer pathogenen Eigenschaften, ihres Zelltropismus und ihrer Replikationsfähigkeit werden die Herpesviren (Familie der Herpesviridae) in drei Subfamilien eingeteilt:  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Herpesviren. Die Vertreter der  $\alpha$ -Herpesviren können ein relativ breites Spektrum an Zellen infizieren und persistieren in Nervenzellen der Ganglien. Zu ihnen werden sechs für Pferde pathogene Herpesviren gezählt, darunter EHV-1. Daneben gehören auch die humanpathogenen Herpes-Simplex-Viren-1 bis -3 dazu, die zu bläschenartigen Hautausschlägen führen, sowie diverse andere tierpathogene Herpesviren.

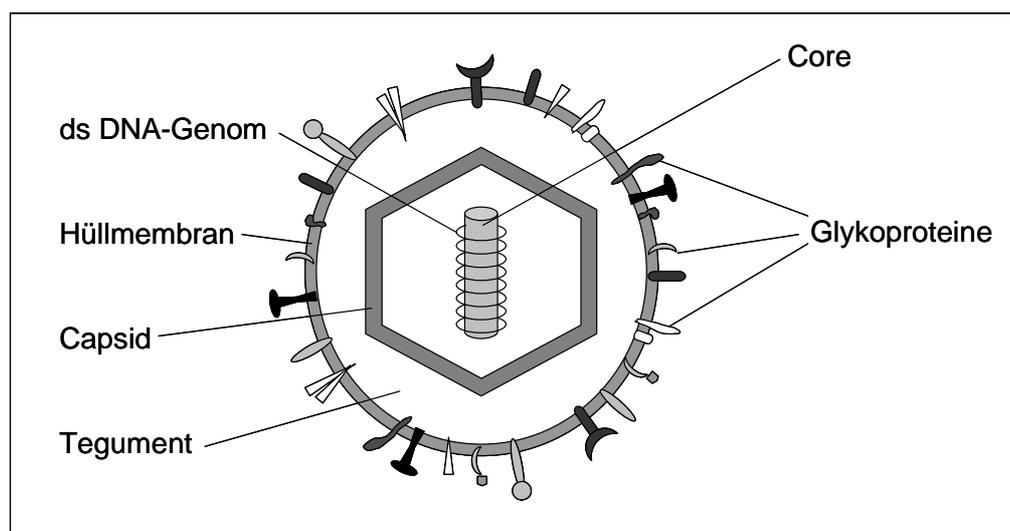
Dagegen zeichnen sich die  $\beta$ -Herpesviren durch ein vergleichsweise enges Spektrum an infizierbaren Zellen aus und haben einen wesentlich langsameren Vermehrungszyklus mit

einhergehender Riesenzellbildung (Cytomegalie). Zu ihnen zählt unter anderem das humanpathogene Herpesvirus 5, auch bekannt als humanes Cytomegalievirus.

Die dritte Subfamilie sind die  $\gamma$ -Herpesviren, die ebenfalls ein sehr enges Wirtszellspektrum haben. Sie infizieren im Gegensatz zu  $\alpha$ -Herpesviren B- oder T-Lymphozyten aber auch Epithel-, Endothel- oder Fibroblastenzellen (Davison *et al.*, 2009; Modrow *et al.*, 2003).

### A.2.2 Aufbau eines EHV-1 Viruspartikels

Wie bei allen Herpesviren besteht ein Viruspartikel des EHV-1 aus einem ikosaedrischen Capsid mit einer durchschnittlichen Größe von 115-130 nm, in dem sich das lineare doppelsträngige DNA-Genom um das Protein-Core befindet (McGeoch *et al.*, 2006). Zwischen der Hüllmembran und dem Capsid befindet sich das Tegument, welches vor allem regulatorische Proteine enthält. Dabei handelt es sich hauptsächlich um das Tegumentprotein eTIF, das unter anderem für die Freisetzung von behüllten Viren mitverantwortlich ist (von Einem *et al.*, 2006). In die Hüllmembran, die von der Zellmembran der Wirtszelle abgeleitet ist, sind die viralen Glykoproteine eingelagert.



**Abb. A-3 Schematischer Aufbau eines EHV-1 Partikels.**

Dargestellt ist das virale Genom assoziiert mit den Core Proteinen im Inneren des ikosaedrischen Capsids. Dieses liegt eingebettet im Tegument, das von einer von der Wirtszellmembran abgeleiteten Hüllmembran umgeben ist. In dieser Membran sind unter anderem die viral codierten Glykoproteine integriert.

Bislang sind zwölf der viralen Glykoproteine von EHV-1 bekannt, von denen die meisten an der Adsorption, Penetration, der zellvermittelten Ausbreitung und der Freisetzung von Viren beteiligt sind (Übersicht siehe Tab. A-1). Davon sind die Glykoproteine gB, gC sowie gD und wahrscheinlich gH und gL für die Fusion des Viruspartikels mit der Zellmembran verantwortlich (Csellner *et al.*, 2000; Neubauer *et al.*, 1997; Osterrieder, 1999; Stokes *et al.*, 1996). Darüber hinaus kann die Ausbreitung auch zellvermittelt erfolgen, woran zusätzlich

die Proteine gK und gM beteiligt sind (Neubauer & Osterrieder, 2004; Osterrieder *et al.*, 1996a).

Die dritte Möglichkeit für EHV-1, in eine Zelle zu gelangen, ist die Endozytose-vermittelte Aufnahme von Virionen durch die Wirtszelle. Der komplette Vorgang ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Es konnte aber bereits gezeigt werden, dass das RSD-Integrin Bindemotiv (Aminosäuren 152-154) des gD Proteins daran beteiligt ist (Van de Walle *et al.*, 2008).

Hat EHV-1 eine Zelle infiziert, bietet das virale gG Protein durch seine Chemokin-bindenden Eigenschaften eine Möglichkeit, dem wirtseigenem Immunsystem zu entgehen. Von gG existiert darüber hinaus auch eine sezernierte Form, die nur aus dem extrazellulären Anteil des Proteins besteht. Deletionsmutanten, denen das gG Protein fehlt, zeigen eine deutlich erhöhte Pathogenität im Mausmodell (von Einem *et al.*, 2007; Bryant *et al.*, 2003).

Das Glykoprotein gp2 ist ein Virulenzfaktor von EHV-1 (Smith *et al.*, 2005). Fehlt das gp2 Protein, so kommt es *in vitro* zu einer verringerten Freisetzung von Virus aus infizierten Zellen, obwohl die Virusreplikation an sich nicht gestört wird. Das Ausmaß ist dabei jeweils vom verwendeten EHV-1 Stamm abhängig (Rudolph *et al.*, 2002; von Einem *et al.*, 2004).

Glykoprotein	essentiell	Funktion
<b>gB</b>	Ja	Penetration, zellvermittelte Ausbreitung
<b>gC</b>	Nein	Adsorption und Freisetzung
<b>gD</b>	Ja	Penetration, zellvermittelte Ausbreitung und Endozytose-vermittelte Virusaufnahme
<b>gE</b>	Nein	zellvermittelte Ausbreitung
<b>gG</b>	Nein	Virales Chemokin-Bindeprotein
<b>gH</b>	wahrscheinlich	unbekannt, wahrscheinlich Beteiligung an der Fusion
<b>gI</b>	Nein	zellvermittelte Ausbreitung
<b>gK</b>	wahrscheinlich	zellvermittelte Ausbreitung, Freisetzung
<b>gL</b>	wahrscheinlich	Unbekannt, wahrscheinlich Beteiligung an der Fusion
<b>gM</b>	Nein	Penetration, zellvermittelte Ausbreitung
<b>gN</b>	Nein	Prozessierung von gM
<b>gp2</b>	Nein	Virulenzfaktor, Inflammation

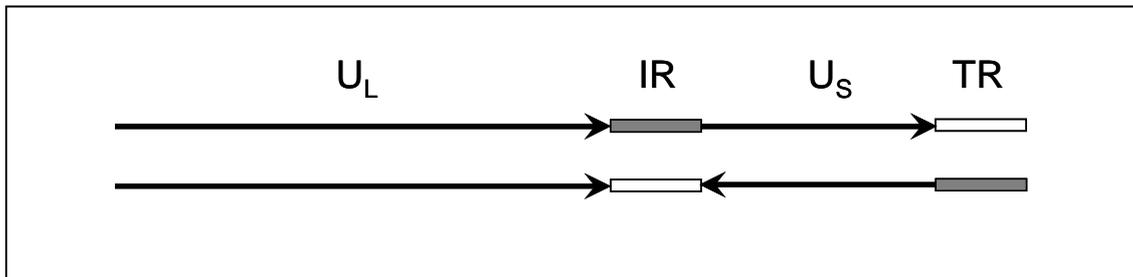
**Tab. A-1) Glykoproteine in der Hüllmembran von EHV-1 und deren Funktion**

Die Tabelle gibt eine Übersicht über die zwölf bekannten Glykoproteine von EHV-1, deren Funktion und deren Essentialität (nach (Osterrieder & Van de Walle, 2010).

### A.2.3 Genom von EHV-1

EHV-1 hat ein etwa 150000 Basenpaar langes doppelsträngiges DNA-Genom. Es besteht aus einem langen ( $U_L$ ) und einem kurzen Sequenzabschnitt ( $U_S$ ), der von zwei repetitiven Sequenzen, den *Terminal* und *Inverted Repeat* Regionen, flankiert wird. Der kurze Abschnitt kann dabei in zwei unterschiedlichen Orientierungen zwischen den repetitiven Sequenzen

vorliegen. Somit kann das Genom (wie in Abb. A-4 gezeigt) in zwei unterschiedlichen Isoformen auftreten. Es weist insgesamt 80 offene Leserahmen auf, die wahrscheinlich 76 distinkte Gene beinhalten (Telford *et al.*, 1992).



**Abb. A-4) Darstellung der möglichen Isoformen des EHV-1 Genoms**

Das gesamte Genom umfasst etwa 150 kb und enthält einen langen und einen kurzen Sequenzabschnitt, der von zwei repetitiven Sequenzen flankiert wird. Der kurze Sequenzabschnitt kann dabei in zwei unterschiedlichen Orientierungen vorkommen.

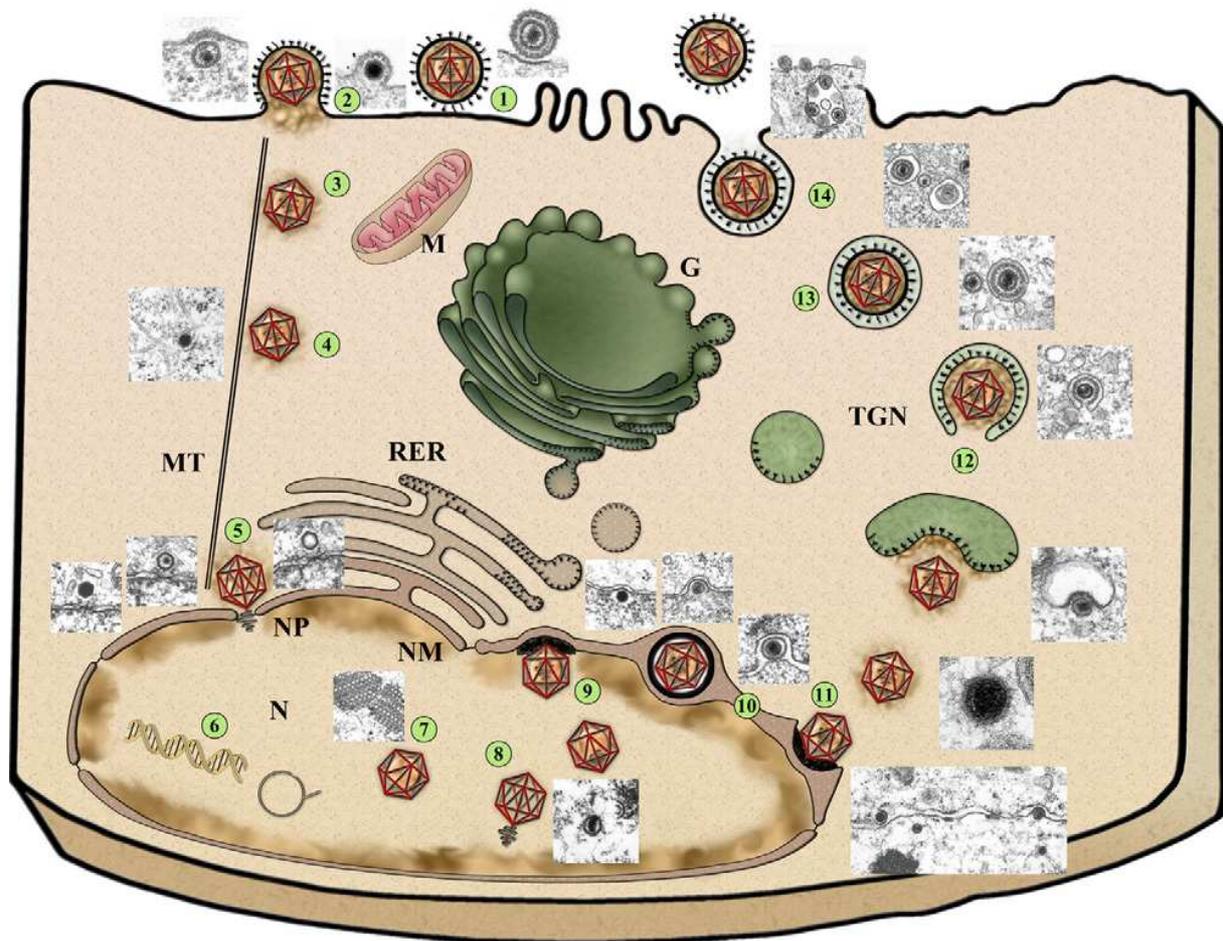
$U_L$ : Unique Long Region; IR: Inverted Repeat; TR: Terminal Repeat;  $U_S$ : Unique Short Region

## A.2.4 Replikation von EHV-1

Wie auch andere Herpesviren tritt EHV-1 hauptsächlich über die direkte Fusion mit der Plasmamembran in Zellen ein. Dabei interagieren die viralen Glykoproteine gB, gC und gD, wahrscheinlich unter Beteiligung der Proteine gH und gL, mit einem bisher unbekanntem zellulären Rezeptor (Stokes *et al.*, 1996; Wellington *et al.*, 1996; Neubauer *et al.*, 1997; Osterrieder, 1999; Csellner *et al.*, 2000; Frampton, Jr. *et al.*, 2005). Ein weiterer Weg für das Virus in die Zelle zu gelangen ist die Aufnahme über Endozytose. Ob es sich dabei um einen Clathrin- oder Caveolae-abhängigen oder einem Energie- und pH-abhängigen Prozess handelt, wird anscheinend von den jeweils verwendeten Zelllinien und Virusstämmen beeinflusst (Frampton, Jr. *et al.*, 2007; Hasebe *et al.*, 2009). Es wird diskutiert, dass das RSD-Integrin-Bindemotiv im gD Protein für eine effiziente Infektion von Mononucleären Zellen über ein zelluläres Integrin verantwortlich ist. Diese Zellen können so von EHV-1 als „Transportmittel“ genutzt werden und spielen deshalb eine wichtige Rolle bei der Ausbreitung des Virus im Pferd (Osterrieder & Van de Walle, 2010).

Nach erfolgreicher Penetration der Zelle gelangen die Viruscapside über die Mikrotubuli zu den Kernporen. Dort wird die DNA in den Zellkern entlassen, wo sie schließlich transkribiert wird (Sodeik *et al.*, 1997). Dabei werden die einzelnen Gene nach einer streng regulierten zeitlichen Abfolge abgelesen, so dass man *immediate early* (sehr frühe), *early* (frühe) und *late* (späte) Gene unterscheidet. Im Genom von EHV-1 liegt jeweils eine Kopie des einzigen *immediate early* Gens in beiden Repeat Regionen vor (Grundy *et al.*, 1989). Darüber hinaus codiert EHV-1 für schätzungsweise 45 *early* sowie 29 *late* Gene. Die Replikation der viralen DNA beginnt vier Stunden, nachdem eine Zelle infiziert wurde und benötigt eine viral codierte

DNA Polymerase (O'Callaghan & Osterrieder, 1999). Zusammen mit den viralen Strukturproteinen bilden sich im Zellkern virale Nukleocapside, für deren Ausschleusung drei Mechanismen diskutiert werden. Zum einen gibt es das „*luminal model*“, das davon ausgeht, dass die erste Hülle, die das Virus erhält, bestehen bleibt und die Freisetzung über den sekretorischen Weg erfolgt (Johnson & Spear, 1982). Zum anderen konnte gezeigt werden, dass sich die Anzahl und Struktur von Kernporen einer infizierten Zelle verändern (Wild *et al.*, 2005) und so wahrscheinlich die Ausschleusung von Capsiden ermöglicht, die dann im Cytosol eine vom Golgi-Komplex stammende Membranhülle erhalten (Wild *et al.*, 2009b).



**Abb. A-5) Schema mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Replikationszyklus eines Alphaherpesvirus mit dem *envelopment-deenvelopment Model* (aus (Mettenleiter *et al.*, 2009)**

Nachdem die Viren an die Zelle adsorbiert haben (1) und in die Zelle eingedrungen sind (2), werden die Capside über Mikrotubuli (MT) zum Zellkern (N) transportiert (3, 4). Die Capside binden an die Kernporen (NP) und entlassen das virale Genom in den Zellkern (5). Im Zellkern findet die Transkription der viralen Gene und die Genom Replikation statt (6). Vor dem Verpacken der viralen DNA in Capside (8) wird die als Konkatemere vorliegende replizierte DNA in die entsprechenden Einheiten geschnitten (7). Durch Knospung an der inneren Kernmembran (INM) (9) und anschließende Fusionierung mit der äußeren Kernmembran (11) wandern die viralen Capside durch den perinucleären Raum (10). Die Herstellung reifer Viruspartikel erfolgt über eine Knospung in Vesikel des Trans-Golgi-Netzwerks (TGN), in die bereits die viralen Glykoproteine eingelagert sind (12). Die Vesikel wandern an die Zelloberfläche, wo sie mit der Plasmamembran fusionieren und so gereifte virale Partikel freisetzen.

RER: Rauhes endoplasmatisches Retikulum; M: Mitochondrium; G: Golgi Apparat

Die meisten Erkenntnisse sprechen jedoch für das „*envelopment-deenvelopment*“ Model. Dabei gelangen die Capside durch einen Knospungsvorgang an der inneren Kernmembran in den perinukleären Raum. Die so aus der inneren Kernmembran entstandene Hülle ermöglicht durch die Fusionierung mit der äußeren Kernmembran den Transport der nackten Capside in das Cytoplasma (Granzow *et al.*, 2001). Anschließend erfolgt die Anlagerung der Tegumentproteine und eine erneute Behüllung über Knospung der Partikel in Vesikel des Trans-Golgi-Netzwerks, in deren Membran die viralen Glykoproteine der Virushülle eingelagert sind (Mettenleiter *et al.*, 2009). Diese komplexen Vorgänge, an denen eine Vielzahl an Proteinen beteiligt ist, sind derzeit noch nicht vollständig geklärt. Jedoch konnte eine essentielle Rolle des eTIF-Proteins von EHV-1 bei dieser zweiten Behüllung gezeigt werden. Schließlich erfolgt an der Zellmembran die Fusion mit dem Golgi-Vesikel und somit die Freisetzung von viralen Partikeln (von Einem *et al.*, 2006).

### **A.2.5 Distribution von EHV-1 im natürlichen Wirt**

Eine typische Eigenschaft von  $\alpha$ -Herpesviren ist ihr enges Wirtsspektrum. So traten nachweisliche Infektionen mit EHV-1 bisher nur bei Pferden auf, können dafür aber ubiquitär in allen Pferdepopulationen nachgewiesen werden. Die Übertragung des Erregers findet über die Luft oder über direkten bzw. indirekten Kontakt statt. Kommt es zu einer Erkrankung durch EHV-1, erfolgt zuerst die Infektion des Epithels im oberen Respirationstrakt, welche sich durch typische Symptome einer Atemwegserkrankung äußert. Mittels infizierten T-Lymphozyten und Monozyten kann sich EHV-1 im Körper des Pferdes ausbreiten (Kydd *et al.*, 1994). Dabei werden Endothelzellen anderer Organe oder der Blutgefäße infiziert, wodurch die Durchblutung der umliegenden Gewebe gestört wird. Bei trächtigen Stuten kann dies durch die hämatogene Übertragung auf die Uterusschleimhaut zu Komplikationen führen. Vor allem im letzten Trimester der Tragzeit kommt es, aufgrund der Fehlversorgung des Fetus, gehäuft zu Aborten. Bei einer starken Beeinträchtigung der Blutschanke zwischen dem Fetus und der Mutter kam es auch zu direkten Infektionen des Fetus (Mayr *et al.*, 1968; Smith *et al.*, 1992; Smith & Borchers, 2001). Nur in sehr seltenen Fällen konnten in Pferden durch die Auswirkungen der Immunantwort Beeinträchtigungen der Blutversorgung von Neuronen beobachtet werden, die zu Störungen des zentralen Nervensystems führen (Kohn & Fenner, 1987).

Nach der Primärinfektion verbleibt EHV-1 wie alle Herpesviren latent im Wirt. In Pferden konnte virale DNA im Ganglion trigeminale, Lymphgewebe, vor allem dem, das mit dem respiratorischen Trakt assoziiert ist, und in PBMCs nachgewiesen werden (Welch *et al.*, 1992; Slater *et al.*, 1994). Die Regulation des latenten Zustandes z. B. über die Expression Latenz-assoziiierter Transkripte, konnte bisher noch nicht umfassend geklärt werden (Baxi *et al.*, 1995; Chesters *et al.*, 1997).

## A.2.6 EHV-1 im Mausmodell

Um Kenntnisse über die Biologie von EHV-1 zu erlangen, wurden neben Pferden aufgrund der einfacheren Handhabung auch Mäuse als Tiermodell benutzt. (van Woensel et al., 1995a; Baxi et al., 1996c; Walker et al., 1999; Gosztonyi et al., 2009; Awan et al., 1990; Field et al., 1992). Dabei werden Mäuse des Balb/c Stamms aufgrund der unter experimentellen Bedingungen relativ guten Infizierbarkeit bevorzugt eingesetzt (Awan et al., 1990). Dies ermöglichte die genauere Charakterisierung der Pathogenese, des Zelltropismus und der immunologischen Wechselwirkungen des pathogenen EHV-1 Stamms Ab4, der ursprünglich aus einem infizierten Pferd isoliert wurde (Patel & Edington, 1983). Unter Verabreichung einer Dosis von  $10^7$  Plaque bildende Einheiten (Pfu) / Maus können auch bei Balb/c Mäusen typische Symptome einer Infektion wie Atemwegserkrankungen und Zell-assoziierte Virämien hervorgerufen werden (Awan et al., 1990). Darüber hinaus kann eine Ab4-Infektion bei trächtigen Mäusen Aborte verursachen (Awan et al., 1995).

Erfolgt die experimentelle intranasale Infektion einer Balb/c Maus, findet zunächst die Replikation der Viren in der nasalen Mukosa, der Trachea und der Lunge statt. Zudem kann es während der akuten Phase der Infektion zu einer Zell-assoziierten Virämie kommen, bei der EHV-1 in wenigen Blutleukozyten nachweisbar ist. Histologische und elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass im weiteren Verlauf der Krankheit EHV-1 vor allem im Flimmerepithel und Pneumozysten der Lunge vorzufinden ist, einhergehend mit der Zerstörung dieser Zellen (Awan et al., 1990). Baxi et al. konnte darüber hinaus Ab4 virale DNA mit einer *nested* PCR auch im Gehirn, Ganglion trigeminale und der Leber während der akuten Phase nachweisen (Baxi et al., 1996b).

Die Pathogenese ist jedoch stark abhängig von der eingesetzten Dosis sowie dem Attenuierungsgrad des eingesetzten EHV-1 Stamms. Als zuverlässiger Indikator für die Pathogenität eines EHV-Stamms in Mäusen stellte sich der Gewichtsverlust eines Tieres nach einer Infektion heraus (van Woensel et al., 1995a).

Es wird angenommen, dass Ab4 latent in neuronalen Zellen der Maus (Marshall & Field, 1997) bzw. im Riechkolben, Ganglion trigeminale und PBMCs vorliegen kann (Baxi et al., 1996a).

## A.2.7 EHV-1 als Vektorsystem

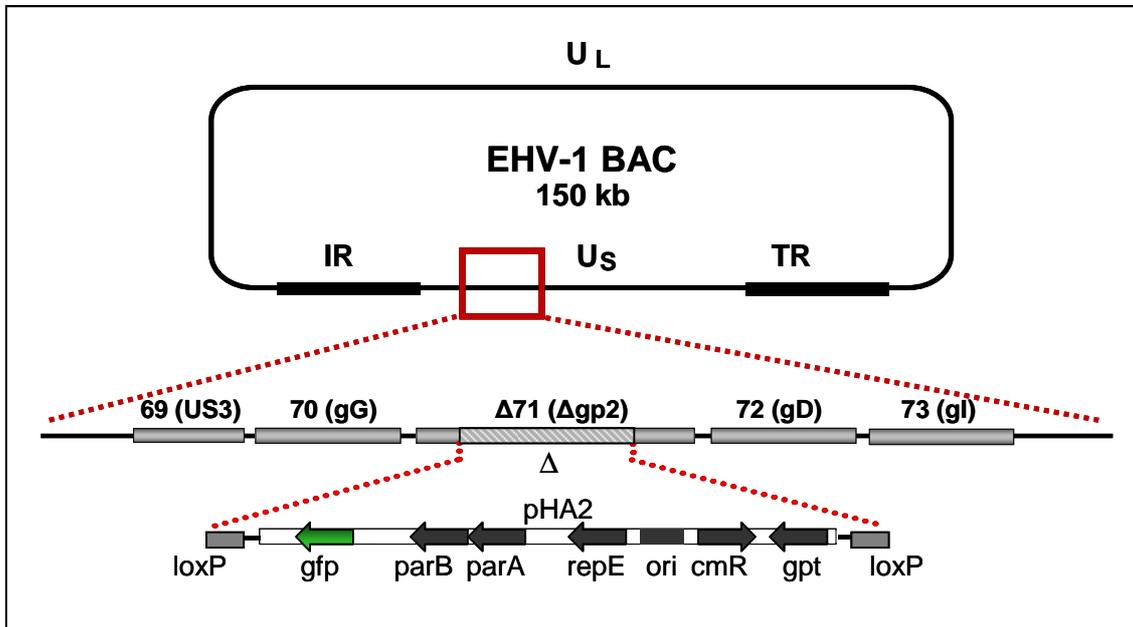
### A.2.7.1 Herstellung rekombinanter EHV-1-Vektoren

Einen wesentlichen Fortschritt zur Aufklärung der sehr komplexen Biologie von EHV-1 lieferte die Entwicklung von *Bacterial Artificial Chromosomes* (BAC) (Messerle et al., 1997). Diese ermöglichen die gezielte Manipulation und stabile klonale Vermehrung relativ großer

herpesviraler Genome, wie dem von EHV-1, in Prokaryonten durch das Einbringen einer miniaturisierten Form des prokaryontischen Fertilitätsplasmids (Mini-F Plasmid). Die Mini-F Sequenz enthält die Gene *oriS* und *repE*, die eine unidirektionale Replikation des Plasmids vermitteln sowie die Gene *parA* und *parB*, die dafür sorgen, dass nicht mehr als zwei Plasmidkopien in einer Zelle vorhanden sind. Darüber hinaus ermöglicht eine Chloramphenicol-Resistenz-Kassette (*cmR*) die Selektion von BAC tragenden Klonen. Eine Weiterentwicklung der Mini-F Sequenz erfolgte über das Einfügen der eukaryontischen Selektionsmarker-Gene für die Guaninphosphoribosyl-Transferase (*gpt*) (Messerle *et al.*, 1997) und das Grün-Fluoreszierende-Protein (*gfp*) (Adler *et al.*, 2000), sowie das Anfügen von *loxP*-Sites (Messerle *et al.*, 1997) (s. Abb.A-6).

Die Herstellung viraler BACs findet zunächst in eukaryontischen Zellen statt. Dazu werden Zellen gleichzeitig infiziert und mit Mini-F DNA transfiziert um eine homologe Rekombination der Mini-F Sequenz in das virale Genom zu ermöglichen. Mit Hilfe der eukaryontischen Marker *gpt* oder *gfp* können Zellen mit rekombinanten BACs identifiziert werden. Anschließend werden diese viralen BACs isoliert und in prokaryontische Zellen transformiert, wo sie genetisch verändert werden können. Da das herpesvirale Genom für eine Manipulation mit klassischen Klonierungstechniken durch herkömmliche Restriktionsenzyme zu umfangreich (bis 220 kb (Messerle *et al.*, 1997)) ist, werden genetische Veränderungen vorwiegend über homologe Rekombination durchgeführt. Aufgrund ihrer Genauigkeit und ihrer hohen Effizienz werden dabei meist Phagen-basierte Rekombinationssysteme wie das RED-System des  $\lambda$ -Phagen verwendet. Dabei genügen bereits 50 bp lange homologe Bereiche, um eine erfolgreiche Rekombination mit Hilfe der drei  $\lambda$ -Phagenproteine Exo, Bet und Gam durchzuführen. Gam trägt über die Bindung prokaryontischer RecBCD Komplexe vorwiegend zur Stabilität der doppelsträngigen linearen DNA bei, die mit dem BAC rekombinieren soll (Murphy, 2007). Exo besitzt eine Exonucleaseaktivität, die durch den Abbau von doppelsträngiger DNA in 5'-3' Richtung einzelsträngige Überhänge produziert (Carter & Radding, 1971), die wiederum durch Bet Proteine stabilisiert werden. Die Bet Proteine vermitteln darüber hinaus den Kontakt zwischen homologen, einzelsträngigen Sequenzen (Li *et al.*, 1998; Karakousis *et al.*, 1998). Durch die Integration eines inaktiven  $\lambda$ -Prophagen mit vorgelagertem temperatursensitiven Promotor in *E. coli* „EL250“ kann durch einfache Erhöhung der Kultivierungstemperatur auf 37 °C die Expression dieser Rekombinationsproteine induziert werden (Lee *et al.*, 2001).

Diese Methode wurde weiter modifiziert, so dass es mittlerweile möglich ist, rückstandsfreie Deletionen, gezielte Insertionen oder Mutationen in der BAC-Sequenz durchzuführen (Tischer et al., 2006; Datsenko & Wanner, 2000; Zhang et al., 1998).



**Abb. A-6) Schematische Darstellung eines EHV-1 BAC.**

Das EH-virale Genom liegt in zirkularisierter Form vor. Der offene Leserahmen US71 wurde ersetzt durch die pHA2 Sequenz (Mini-F Plasmid), die von loxP Sequenzen flankiert ist. Sie enthält die regulatorischen Gene repE, parA und parB, die die DNA-Replikation und die Kopienzahl des Plasmids in der Zelle kontrollieren. Darüber hinaus codiert das Mini-F Plasmid für einen *Origin of Replication* (ori) zur klonalen Vermehrung der DNA in Prokaryonten und ein Gen für die Chloramphenicol-Resistenz (cmR) zur Aufrechterhaltung eines Selektionsdrucks in Prokaryonten. Das Grün-Fluoreszierende-Protein-Gen (gfp), und das Guaninphosphoribosyl-Transferase-Gen (gpt) dienen als eukaryontische Selektionsmarker.

UL: *Unique Long Region*; US: *Unique Short Region* TR: *Terminal Repeat Region*; IR: *Internal Repeat Region*; gG: Glykoprotein G; gD: Glykoprotein D; pCMV: Promotor des Cytomegalievirus; pA: *Bovine-growth-hormone-polyA-site*; loxP: loxP-site

Nach Transfektion viraler BAC in permissive eukaryontische Zellen erfolgt die Replikation infektiöser Virionen, deren veränderte biologische Eigenschaften gezielt analysiert werden können. Dies schafft die Möglichkeit zur systematischen Untersuchung von Funktionen einzelner Virusproteine, zur Entwicklung gezielt attenuierter Viren, z. B. für eine Anwendung als Impfstoff gegen EHV-1, oder zur Herstellung von rekombinanten Viren, die für Fremd-Gene codieren und damit für einen heterologen Gentransfer eingesetzt werden können.

#### A.2.7.2 Potential von EHV-1 als virales Vektorsystem

Die Möglichkeit mit relativ geringem Aufwand rekombinante EHV-1 durch RED-Rekombination mit viralen BACs herzustellen und von diesen, aufgrund des kurzen Replikationszyklus, hochtitrige Virusstocks zu produzieren, sind gute Voraussetzungen für ein virales

Vektorsystem. Solche Vektorsysteme finden beim heterologen Gentransfer in der Genterapie, als Impfstoffe oder auch bei *in vitro* Experimenten Anwendung.

In unserer Gruppe konnte im Mausmodell bereits gezeigt werden, dass EH-virale Vektoren Potential als HIV-Vakzine besitzen. So wurden nach intranasaler oder intramuskulärer Verabreichung bereits mit geringen Dosen (ab  $10^4$  Pfu) gute Transgen-spezifische Immunantworten induziert. Als besonders vielversprechend erwies sich die intranasale Verabreichung des Virus in Kombination mit einer systemisch applizierten Plasmid DNA-Immunsierung. Mit dieser heterologen *Prime/Boost*-Strategie konnte neben einer verstärkten systemischen Transgen-spezifischen Immunantwort zusätzlich eine sehr gute humorale Immunantwort in der Mukosa induziert werden, die insbesondere hinsichtlich der Wirksamkeit eines HIV-Impfstoffes von großer Bedeutung ist (Hofmann-Sieber et al., 2010). Im Gegensatz zu anderen Vektorsystemen wie das der Ad5-Vektoren oder der pockenviralen Vektoren gibt es gegen EHV-1 keine präexistierende Immunantworten im Menschen. Auch Antikörper gegen humane Herpesviren zeigten keine Kreuzreaktivität gegen EHV-1 (Trapp et al., 2005). Darüber hinaus erwiesen sich EHV-1 bislang im Menschen als apathogen und zeigten *in vitro* eine stark beeinträchtigte Replikation in humanen Zellen.

#### **A.2.7.3 Unterschiedlich attenuierte EHV-1-Vektoren**

Zur Untersuchung des immunogenen Potentials von EHV-1-Vektoren wurden Viren des hoch attenuierten RacH-Stamms verwendet. Diese sind von dem „Rac“-Isolat aus einem abortiven Fohlen in Polen abgeleitet (Mayr et al., 1965) und haben ihre Virulenz durch 256faches Passagieren auf embryonalen Schweinenierenzellen verloren. Dabei wurde unter anderem jeweils eine 850 bp große Sequenz in der *Inverted* und *Terminal Repeat* Region deletiert, die den Verlust des IR6-Proteins zur Folge hat (Hubert et al., 1996). IR6 ist der Hauptvirulenzfaktor von EHV-1 und an dem Behüllungsprozess der Nukleocapside an der inneren Kernmembran beteiligt (Osterrieder et al., 1998; Osterrieder et al., 1996b). Ohne IR6 kommt es zu temperatursensitiven Viren, die bei 40 °C kaum noch Nachkommenviren produzieren und *in vivo* ihre Pathogenität im Mausmodell verloren haben (Osterrieder et al., 1996b). Der auch für Pferde apathogene RacH-Stamm wird derzeit als EHV-1 Lebend-Impfstoff eingesetzt (Prevaccinol®, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim).

Zur weiteren Erhöhung der Vektorsicherheit wurden Vektoren hergestellt, deren offener Leserahmen (ORF) UL48 in der  $U_L$ -Region des Virus-Genoms gezielt deletiert wurde (von Einem et al., 2006; Hofmann-Sieber et al., 2010). Dieser codiert für den *equine Trans-inducing Factor* (eTIF), ein essentielles Tegumentprotein, das als Bestandteil des Virions mit in die Zelle eingeschleust wird (Lewis et al., 1997a). Dort fungiert es als Transaktivator für das einzige *immediate early*-Gen und initiiert damit die Virusreplikation (Lewis et al., 1993). Erst spät im Replikationszyklus wird UL48 selbst exprimiert und schließlich in das Tegument neu produzierter Viren integriert (Lewis et al., 1993; Lewis et al., 1997b; Purewal et al.,

1994). Alle bisher gewonnenen Daten über derartige Deletionsmutanten deuten darauf hin, dass eine Infektion dieser Viren nach ein bis drei Replikationszyklen zum Erliegen kommt. In humanen Zellen wird die von EVH-1 ohnehin schon schlechte Replikation *in vitro* durch das Entfernen von UL48 sogar vollständig gehemmt. Auch diese sehr hoch attenuierte Virus-Variante zeigte im Mausmodell unter Verwendung von heterologen Prime/Boost Strategien gute immunologische Eigenschaften, wenn auch deutlich schwächere als die UL48-haltiger Vektoren (Hofmann-Sieber et al., 2010).

Der Verlust des eTIF-Proteins kann durch eine transkomplementierende Zelllinie (RK13-48), die das eTIF-Protein konstitutiv exprimiert, nahezu vollständig aufgehoben werden (von Einem *et al.*, 2006). Für diese Arbeit wurden so auf RacH basierende hochtitrige UL48-defiziente Virusstocks hergestellt, die als EHV- $\Delta$ UL48 bezeichnet werden.

Des Weiteren wurden pathogene rekombinante RacL Vektoren verwendet. RacL stammt von einem Ende der 1950er gewonnenen Isolat aus einem fehlgeborenen Fohlen in Polen ab. Diese Viren sind sowohl in Pferden als auch in Versuchstieren hochvirulent (Mayr *et al.*, 1965). Sie zeigen im Vergleich mit RacH und UL48-deletierten Vektoren den Einfluss der Attenuierung auf die biologischen Eigenschaften des Vektorsystems.

Sowohl von RacH als auch RacL sind BAC hergestellt worden (pRacH und pRacL) (Rudolph & Osterrieder, 2002; Rudolph et al., 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Transgene in unterschiedlich stark attenuierte EHV-1-Vektoren eingefügt und zur Analyse Transgen-spezifischer, immunogener Eigenschaften im Mausmodell eingesetzt.

### **A.3 Zielsetzung**

Ziel dieser Arbeit war es, das Sicherheitspotential und die immunogenen Eigenschaften von Equinen Herpesviralen Vektoren im Mausmodell zu untersuchen. Dazu sollten abgestuft attenuierte rekombinante Vektoren mit unterschiedlichen Transgenen hergestellt werden.

Zur Untersuchung der Sicherheit sollten die Pathogenität, die vor allem anhand des Gewichtsverlusts der Tiere bestimmbar ist, ermittelt und die Biodistribution analysiert werden. Als Applikationsroute stand dabei die intranasale Verabreichung im Vordergrund, da bereits gezeigt werden konnte, dass über diese neben systemischen zusätzlich Transgen-spezifische mukosale Immunantworten induziert werden können. Dazu sollten Untersuchungen mit dem *in vivo Imager an* der lebenden Maus sowie Luciferase-Assays und quantitative *Real Time* PCRs von Mausgeweben durchgeführt werden.

Aufbauend auf den gewonnenen Erkenntnissen sollte ein *in vivo* Belastungsmodell (*Challenge*-Modell) mit einem pathogenen EHV-1-Vektor, der sowohl ein *Luciferase*-Gen als Reporter sowie ein *HIV-gag*-Gen trägt, entwickelt werden. Dazu sollten Balb/c Mäuse über unterschiedliche Routen mit rekombinanten pockenviralen Impfstoffkandidaten immunisiert werden. Ein anschließender *Challenge* mit dem pathogenen EHV-L-luc-gag sollte dann Aufschluss über einen vorangegangenen Impferfolg liefern.

Mit Hilfe von *gp120*-tragenden EHV-1-Vektoren sollte des Weiteren das immunogene Potential der Vektoren, spezifische Immunantworten gegen das Hüllprotein zu induzieren, untersucht werden.

Darüber hinaus sollten *ex vivo* Experimente mit humanen peripheren mononukleären Zellen Hinweise liefern, ob EHV-1-Vektoren auch in Menschen immunogenes Potential besitzen.

## B. Material und Methoden

### B.1 Material

#### B.1.1 Vektoren

Bezeichnung	Quelle
pcDNA3.1(+)	Eukaryontisches Expressionsplasmid (Invitrogen, Karlsruhe)
pEP	Plasmid zur Herstellung von Transferkonstrukten für die Generierung rekombinanter BAC (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Bernd Karsten Tischer, Cornell University, Ithaca, NY, USA)
pBAD-I-SceI	Plasmid zur Arabinose-induzierbaren Expression von <i>I-SceI</i> (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Bernd Karsten Tischer, Cornell University, Ithaca, NY, USA)
pGL4. luciferase	Plasmid mit codonoptimierter <i>firefly</i> Luciferase (Promega, Mannheim)
pSCA	Plasmid zur Klonierung von PCR-Produkten (Stratagene, La Jolla, USA)

Tab. B.1) Übersicht der verwendeten Plasmide

#### B.1.2 Kommerzielle Kits

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

Tab. B.2) Übersicht der verwendeten kommerziellen Kits

#### B.1.3 Versuchstiere

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

### B.1.4 Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Sigma und Merck, Zellkulturmaterialien von den Firmen Falcon, GibcoBRL, Lonza, Invitrogen 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.1.5 Häufig verwendete Lösungen

PBS-Puffer: 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl

Luria Bertani (LB)-Medium: Trypton 10 g/l; Hefeextrakt 5 g/l; NaCl 5 g/l

## B.2 Methoden

### B.2.1 Herstellung von DNA-Konstrukten

#### B.2.1.1 Verwendete Prokaryontische Zellen

Zur Amplifikation von Plasmiden wurden die Bakterienstämme DH5α und DH10B, zur Herstellung rekombinanter Bacmide die Bakterienstämme EL250 und GS1783 verwendet.

Bezeichnung	Beschreibung
<b>DH5α</b>	F- <i>supE44 ΔlacU169 (φ80 lacZΔM15) hsdR1 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i> (Hanahan, 1983)
<b>DH10B</b>	F- <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara,leu)7649 galU galK rspL nupG</i> (Gibco BRL)
<b>EL250</b>	F- <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara,leu)7649 galU galK rspL nupG [lcl857 (cro-bioA)&lt;&gt; araC-PBADflpe]</i> (Lee <i>et al.</i> , 2001)
<b>GS1783</b>	wie EL250, enthalten zusätzlich das Arabinose induzierbare <i>Sce-I</i> Gen im Genom (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Nicolaus Osterrieder)

Tab. B.3) Verwendete Bakterienstämme

#### B.2.1.2 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 und GS1783 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.2.1.3 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 ( $OD_{600}$  0,2-0,4). Nach Erreichen der optimalen Zelldichte wurde die Zellsuspension geerntet, 10 min bei 3200 x g und 4 °C zentrifugiert und das Bakterienpellet in eiskaltem RF 1-Puffer (100 mM RbCl, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 30 mM Kac, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 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 x g und 4 °C zentrifugiert und das Pellet in eiskaltem RF2-Puffer (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 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.2.1.4 Transformation chemisch-kompetenter Bakterien**

100 µl chemisch-kompetente Bakterien (siehe Kapitel B.2.1.3) wurden auf Eis aufgetaut, anschließend Ligationsansatz (siehe Kapitel B.2.1.8) zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde für 45 s bei 42 °C ein Hitzeschock durchgeführt und der Ansatz sofort 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium und 1stündigem Schütteln bei 37 °C wurde die Bakteriensuspension auf geeigneten Selektionsagar ausplattiert und bei 37 °C inkubiert.

### **B.2.1.5 Aufreinigung von Plasmid DNA**

Zur Isolierung kleiner Mengen an Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden 2 x 1,5 ml über Nacht gewachsener Bakterienkultur für 1 min bei 20000 x g (Eppendorf Tischzentrifuge) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß geerntet. Das Pellet wurde in 200 µl Puffer P1 (Qiagen, Hilden) resuspendiert. Anschließend erfolgte eine alkalische Lyse der Zellen mit 200 µl Puffer P2 (Qiagen, Hilden) für 5 min bei RT. Danach wurde das Lysat mit 200 µl Puffer P3 (Qiagen, Hilden) für 5 min auf Eis neutralisiert. Nach Zentrifugation für 5 min (20000 x g), wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol und mind. 20minütiger Zentrifugation bei 16 °C gefällt. Die Plasmid-DNA wurde mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und das getrocknete Pellet in 50 µl sterilem Tris/HCl pH 7,5 aufgenommen.

Größere Mengen an Plasmid DNA (0,2 bis 2,5 µg) wurden mit dem *Plasmid Maxi, Midi oder Mega Kit* (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aus *E. coli* isoliert.

### B.2.1.6 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

DNA Proben wurden mit 1/5 des Probenvolumens mit DNA-Auftragspuffer (0,001 % [w/v] Bromphenolblau, 0,001 % [w/v] Xylencyanol, 60 mM EDTA, 36 % [v/v] Glycerin) versetzt und zur Analyse auf ein Agarosegel (0,8 bis 2 % Agarose, je nach Größe der erwarteten Fragmente, in TBE Puffer (8,5 mM Tris, 89 mM Borsäure, 0,47 mM EDTA) und 50 ng/ml Ethidiumbromid) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 5 bis 10 V/cm. Zur Bestimmung der Größe von DNA-Molekülen mittels Gelelektrophorese wurde der 100 bp DNA Marker (NEB, Frankfurt) oder der 1 kB DNA Marker (NEB, Frankfurt) verwendet. Die Dokumentation analytischer Gele erfolgte bei UV-Licht (312 nm) in einer Dunkelkammer.

### B.2.1.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des *Qiagen Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

### B.2.1.8 Ligation

Für eine Ligation wurden 50 ng linearisierter Vektor mit der 3-fachen molaren Masse an Insert in Quick Ligase Puffer (NEB, Frankfurt) (10 µl Gesamtvolumen) gemischt. Anschließend wurde 1 µl Quick T4 DNA Ligase (NEB, Frankfurt) zugegeben, gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Transformation der *E. coli* erfolgte mit 2 µl des Ligationsansatzes wie unter B.2.1.4 beschrieben.

### B.2.1.9 Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA erfolgte mit Enzymen der Firma NEB (Frankfurt am Main) nach Angaben des Herstellers.

### B.2.1.10 Sequenzierung

Klonierte Konstrukte oder Transgene rekombinanter Viren wurden stets mittels Sequenzierung bei der Firma Geneart (Regensburg) überprüft. Die dafür eingesetzten Oligos sind in Tabelle B.4 beschrieben.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Verwendung
<b>CMV_fw</b>	GTCATCGCTATTACCATG	Sequenzierung
<b>T7_fw</b>	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierung
<b>Bgh_rev</b>	TAGAAGGCACAGTCGAGG	Sequenzierung
<b>luc_675fw</b>	CATCTTCGGCAACCAGATC	Sequenzierung luciferase
<b>luc_819rev</b>	GAATAGCTCC TCCTCGAAG	Sequenzierung luciferase
<b>luc_1185fw</b>	CATGATCATGAGCGGCT	Sequenzierung luciferase
<b>gp120_481fw</b>	ACCGTGGTGAGGGACAGGAAGC	Sequenzierung gp120 (CN54)

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Verwendung
gp120_981fw	CCAGAACAAGACCATCAAGTTC	Sequenzierung gp120 (CN54)
Csgpn_-55fw	CTGGCTTATCGAAATTAATACG	Sequenzierung Csgpn (CN54)
Csgpn_3000fw	TGAACACCATGCTGAACA	Sequenzierung Csgpn (CN54)
Csgpn_+1180	GCCACATCGCCAGGAACTGCAG	Sequenzierung Csgpn (CN54)
Csgpn_4000fw	CGAGCAGACCAGGGCCAA	Sequenzierung Csgpn (CN54)
Csgpn_4500fw	AGATCAAGGCCCTGACCG	Sequenzierung Csgpn (CN54)
Csgpn_+2178	GACTTCAGGGAGCTGAACAAGAG	Sequenzierung Csgpn (CN54)
Csgpn_5000fw	ACCCCGGCCCGGCGTG	Sequenzierung Csgpn (CN54)
Csgpn_3006rev	GTAATTCCTGAAGTCCTCGTAC	Sequenzierung Csgpn (CN54)
Csgpn_6000fw	CCCACACCAACGACGTGA	Sequenzierung Csgpn (CN54)
Csgpn_+3107	GCAGCACCTGCTGAGGTGG	Sequenzierung Csgpn (CN54)
Gag_510fw	GCTGAACATGGGGATCACCTC	Sequenzierung gag (97CN001)
Gag_680fw	GCCCAGGGGCAGCGACATCG	Sequenzierung gag (97CN001)
Gag_1248fw	CAGATGAAGGACTGCACCGA	Sequenzierung gag (97CN001)
Gag_290fw	GAGATCGACGTGCGGGACAC	Sequenzierung gag (97CN001)

Tab. B.4) Verwendete Oligos für die Sequenzierung

### B.2.1.11 Anlegen von Glycerinkulturen

3 ml einer über Nacht gewachsenen Bakterienkultur wurden geerntet und in 600 µl LB-Flüssigmedium resuspendiert. Anschließend wurden 300 µl steriles Glycerin (87 %) zugegeben und die Bakteriensuspension sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte in Cryotubes bei -80 °C.

### B.2.2 Herstellung und Verifizierung rekombinanter EHV-1

Sowohl von RacH als auch RacL wurden BAC hergestellt (pRacH und pRacL) (Rudolph et al., 2002; Rudolph et al., 2002; Rudolph & Osterrieder, 2002). In dieser Arbeit verwendetes pRacH enthielt die pHA2 Sequenz in invertierter Orientierung und wird deshalb als pRacHrv bezeichnet. Beide BACs wurden freundlicher Weise von Nikolaus Osterrieder (Freie Universität Berlin) zur Verfügung gestellt.

BAC Bezeichnung	Bezeichnung resultierendes Virus	Beschreibung
pRacHrv	EHV	Deletion des <i>gfp</i> ; Einfügen eines CMV-Promotors und einer bgh-PolyA-Site
pRacHrv-ΔUL48	EHV-ΔUL48	Deletion des <i>gfp</i> ; Einfügen eines CMV-Promotors und einer bgh-PolyA-Site; Deletion von UL48

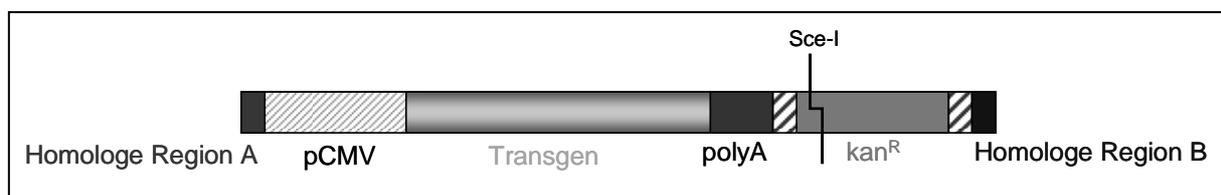
BAC Bezeichnung	Bezeichnung resultierendes Virus	Beschreibung
pRacHrv-gpn- $\Delta$ UL48	EHV-gpn- $\Delta$ UL48	Substitution des <i>gfp</i> durch HIV-syngagpolnef (CN54); Deletion von UL48
pRacHrv-gp120- $\Delta$ UL48	EHV-gp120- $\Delta$ UL48	Substitution des <i>gfp</i> durch HIV-gp120 (CN54); Deletion von UL48
pRacHrv-luc	EHV-luc	Substitution des <i>gfp</i> durch firefly luciferase
pRacHrv-luc- $\Delta$ UL48	EHV-luc- $\Delta$ UL48	Substitution des <i>gfp</i> durch firefly luciferase ; Deletion von UL48
pRacL-luc	EHV-L-luc	Substitution des <i>gfp</i> durch <i>firefly luciferase</i> in pRacL
pRacL-luc-gag	EHV-L-luc-gag	Substitution des <i>gfp</i> durch <i>firefly luciferase</i> in pRacL; Substitution des <i>gpt</i> durch HIV gag (97001 CN54)

Tab. B.5) Hergestellte rekombinante BAC und Bezeichnung der resultierenden Viren

### B.2.2.1 Generierung rekombinanter BACs

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

Durch Klonierung des gewünschten Transgens in die *multiple cloning site* des pEP-Plasmids und anschließender Restriktion mit der *Homing* Endonuklease *I-Ceu* erhielt man ein lineares Transferkonstrukt, das das Transgen mit einem CMV-Promotor und einer polyA-site sowie eine Kanamycin-Resistenz Kasette beinhaltet. Zudem befinden sich an den Enden Sequenzen, die zu der gewünschten Rekombinationsstelle im BAC homolog sind (auf- und abwärts Bereich des *gfp*-Gens s. Abb. B-1). Die Herstellung von Konstrukten mit alternativen homologen Bereichen erreichte man durch Anhängen der entsprechenden Sequenzen in einer PCR über das pEP Plasmid mit entsprechenden Oligos (Tab. B.6) siehe B.2.2.1.3.



#### Abb. B-1 Transferkonstrukt für die homologe Rekombination.

Das lineare doppelsträngige DNA-Fragment besitzt am 3'- und 5'-Ende 80 bp lange Sequenzen (hier A und B) die zur Zielsequenz homolog sind. Außerdem beinhaltet es das Transgen mit vorgelagertem CMV-Promotor sowie eine anschließende polyA Sequenz. Eine Kanamycin-Resistenz-Kasette ( $kan^R$ ) dient zur Selektion von Rekombinanten nach erfolgreicher Integration. Zudem weist es eine *Sce-I* Erkennungssequenz für die spätere Deletion der  $kan^R$  Kasette auf.

Die Transformation von rekombinationskompetenten *E. coli* Zellen führte dann zu einer entsprechenden Integration im BAC. In einem zweiten Schritt wurde das auf dem pBAD-Plasmid (EL250) oder im Genom der GS1783 vorhandene *I-SceI*-Gen über einen

Arabinose-induzierbaren Promotor eingeschaltet. Diese *Homing* Endonuklease schnitt das BAC an der einzigen *I-SceI*-spezifischen Schnittstelle zwischen dem Transgen und der Kanamycin-Resistenz-Kassette. Durch einen zweiten Rekombinationsprozess der zu einer Verknüpfung von weiteren homologen Sequenzen innerhalb des Konstrukts vor und nach der Resistenz-Kassette führte, kam es zu einer Rezirkularisierung der daraufhin Kanamycin-sensitiven BAC-Sequenz.

#### **B.2.2.1.1 Einbringen des Rekombinationskonstrukts**

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

EL250 mit pRacHrv-gfp oder GS1783 mit pRacL-gfp wurden in LB-Selektionsmedium bis zur frühen exponentiellen Wachstumsphase angezogen ( $OD_{600}$  0,2-0,4). Nach Erreichen der optimalen Zelldichte wurde die Zellsuspension 15 min bei 42 °C (Einschalten des hitzeinduzierbaren Rekombinationssystems) und anschließend 15 min auf Eis inkubiert. Die Ernte der Zellen erfolgte für 10 min bei 3200 x g und 4 °C. Daraufhin wurde das Bakterienpellet 3 x in je 2 ml eiskaltem, sterilem 10 % Glycerin gewaschen und schließlich in 50 µl je 5 ml eingesetzter Bakterienkultur aufgenommen. Elektrokompetente Bakterien wurden stets frisch hergestellt und nicht gelagert.

Für die Elektroporation wurden 50 µl elektrokompetente Bakterien mit 100 ng linearem Transferkonstrukt 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, die Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und unter Schütteln 1 bis 3 h bei 32 °C inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf einem geeigneten Selektionsagar ausplattiert und bei 32 °C inkubiert. Nach 24 bis 48 h wurden Kolonien gepickt und mittels Kolonie-PCR analysiert.

#### **B.2.2.1.2 Ausrekombination der Kanamycin-Resistenz-Kassette**

In der PCR positiv getestete Klone wurden in LB-Flüssigselektionsmedium überimpft und bei 32 °C über Nacht geschüttelt. 100 µl der Vorkultur wurden in 2 ml LB-Medium, welches Ampicillin (100 µg/ml) (Selektionsdruck für pBAD in EL250) und Chloramphenicol (34 µg/ml) oder nur Chloramphenicol (34 µg/ml) (GS1783) enthielt, überführt und 2 bis 4 h bei 32 °C unter Schütteln inkubiert. Durch Zugabe von 2 ml LB-Medium mit Chloramphenicol (34 µg/ml) (für EL250 zusätzlich Ampicillin (100 µg/ml)) und jeweils 1 % [w/v] Arabinose wurde die Expression des *I-SceI*-Enzyms für 60 min induziert. Anschließend erfolgte das Anschalten des Rekombinationssystems bei 42 °C für 30 min. Nach weiteren 3 h Schütteln bei 32 °C wurden je 100 µl einer 1:10, 1:100 und einer 1:1000 Verdünnung in LB-

Flüssigmedium auf LB-Agar mit Ampicillin (100 µg/ml) (für EL250 Zellen zusätzlich Chloramphenicol (34 µg/ml)) und 1 % [w/v] Arabinose für 48 h bei 32 °C inkubiert. Kanamycinsensitive Klone wurden mittels geeigneter Replika-Selektionsplatten (mit und ohne Kanamycin (50 µg/ml)) ermittelt und durch PCR-Analyse auf Entfernung der Kanamycin-Resistenz Kasette hin überprüft.

### B.2.2.1.3 Einbringen eines zweiten Transgens

Zur Herstellung von EHV-L-luc-gag wurde anstelle des *gpt*-Gens in der Mini-F Sequenz ein weiteres Transgen, das gag (97CN001), eingebracht. Dazu wurde ein Transferkonstrukt mit den Oligos pEP\_homE und pEP\_homF (s. Tab. B-6) mittels PCR hergestellt, das die entsprechenden homologen Sequenzen am 3'- und 5'-Ende beinhaltet (vgl. Abb.B-1). Als Ziel-DNA für die PCR diente der pEP-gag Vektor. Die weitere Durchführung entspricht der Beschreibung unter B.2.2.1.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Verwendung
<b>Oligos zur Herstellung von Konstrukten zur Rekombination</b>		
<b>Firefly_luc2_pGL4 fw<sup>+</sup>BamHI</b>	GGGATCCGTAAAGCCACCATGGAAGATG	Klonierung des Luciferase-Gens in den pEP-Vektor
<b>Firefly_luc2_pGL4 rev<sup>+</sup>EcoRV</b>	GCGATATCTTACACGGCGATCTTGCC	Klonierung des Luciferase-Gen in den pEP-Vektor
<b>pEP_homE</b>	TCAGCCGAGTGTGAGTAGTTCCCCGATTAA TTAAGGCCGCGAGCTTCTAGGATGTACGGG CCAGATATACGC	Amplifikation des Konstrukts für den Austausch des <i>gpt</i> -Gens mit gag und Anhängen der homologen Sequenzen
<b>pEP_homF</b>	GCAATAAACAAGTTAACGGTACCCGGGTCT AGATGATCCGCTACCGGTTATGTCTTCCCA ATCCTCCCCC	Amplifikation des Konstrukts für den Austausch des <i>gpt</i> -Gens mit gag und Anhängen der homologen Sequenzen
<b>Oligos zur Überprüfung der Rekombination</b>		
<b>Transgen_fw</b>	GCGCACGGTTATGTGGAC	Transgen-Amplifikation aus BAC im <i>gfp</i> -Genlokus
<b>Transgen_rev</b>	CGCAGCTTGATATCGAATTC	Transgen-Amplifikation aus BAC im <i>gfp</i> -Genlokus
<b>pRacHrv ΔUL48_fw</b>	CTGGACCCAACGGTTACGAT	UL48-Deletion aus BAC-DNA
<b>pRacHrv ΔUL48_rev</b>	GGCCAACATGTTAAGTCTGGAA	UL48-Deletion aus BAC-DNA

Tab. B.6) Verwendete Oligos für die BAC-Rekombination

Eine weitere Verifizierung der rekombinanten BACs erfolgte mittels Analyse der spezifischen Restriktionsmuster und Southern-Blot-Analysen.

#### **B.2.2.1.4 Aufreinigung von Bacmid-DNA**

Für die Präparation von Bacmid-DNA wurden 4,5 ml einer über Nacht gewachsenen *E. coli* Kultur geerntet. Das Pellet wurde in 100 µl Puffer P1 (Qiagen, Hilden) resuspendiert. Anschließend erfolgte eine alkalische Lyse der Zellen mit 200 µl Puffer P2 (Qiagen, Hilden) für 5 min bei RT. Danach wurde das Lysat mit 150 µl Puffer P3 (Qiagen, Hilden) für 5 min auf Eis neutralisiert. Die Extraktion der DNA erfolgte durch Zugabe von 500 µl Phenol/Chloroform pH 7,0 (Pierce, Rockford USA) und 100maliges Schwenken. Nach Zentrifugation (10 min, 20000 x g, 4 °C) enthält die obere Phase die DNA. Diese wurde durch Zugabe zu 400 µl kalten Ethanol und 40 µl NaOAc (3M pH 5,2) bei 10 min 20000 x g (4 °C) gefällt. Das Pellet wurde in 200 µl sterilem deionisiertem H<sub>2</sub>O resuspendiert, 800 µl Ethanol wurden zugegeben und die Bakterien nochmals pelletiert (10 min, 20000 x g, 4 °C). Anschließend erfolgte eine RNAase-Behandlung. Hierfür wurde das trockene Pellet in 30 µl Tris/HCl pH 7,5 mit 2 µg/ml RNase A und 5 U/ml RNase T1 (RNase Mix von Fermentas, St. Leon-Rot) aufgenommen und 30 min bei 37 °C inkubiert. Bei allen Vorgängen wurde dabei darauf geachtet keine zu großen Scherkräfte auf die BAC-DNA auszuüben um Strangbrüche zu vermeiden.

#### **B.2.2.1.5 Genotypisierung mittels Southern Blot Analyse (Southern, 1975)**

Rekombinante BAC-DNA wurde mit einem Southern-Blot analysiert. Dafür wurden Restriktionsanalysen mit Enzymen der Firma NEB (Frankfurt am Main) nach Angaben des Herstellers durchgeführt und die Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese (0,8 % Agarose in TAE-Puffer (20 mM Tris, 20 mM Eisessig, 100 ml 1 mM EDTA pH 8,0)) über Nacht aufgetrennt. Als Größenstandard wurde der Digoxigenin (DIG)-markierte DNA-Standard II (Roche, Mannheim) verwendet. Anschließend wurde das Agarosegel in 200 ml TAE Puffer mit 50 ng / ml EtBr gefärbt und dokumentiert. Darauf folgten zwei Inkubationen in Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) und zwei in Neutralisierungspuffer (0,5 M Tris, 1,5 M NaCl, pH 7,5) für je 15 min. Die so behandelten DNA-Fragmente wurden in Transferpuffer (20xSSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M NaCl, pH 7,5) mittels Kapillarkraft über 16 h auf eine positiv geladene Nylonmembran (0,45 µm Biotin Plus, PALL, Pensacola Florida, USA) übertragen. Nach dem Transfer wurde die DNA mit Hilfe eines UV-Crosslinker (UV Stratalinker 2400, Stratagene, Heidelberg) auf der Nylonmembran fixiert. Danach folgte das Blocken freier Bindestellen der Membran für 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)) und im Anschluss die Hybridisierung mit

der denaturierten (68 °C, 10 min) DIG-markierten Sonde für 16 h bei 42 °C. Die DIG-markierte Sonde wurde unter Verwendung des DIG-PCR Probe Synthesis Kit (Roche, Mannheim) gemäß Herstellerangaben hergestellt (Verwendete Oligos siehe Tab. B.7). Nach der Hybridisierung wurde die Membran je zweimal in nicht-stringentem Waschpuffer (2x SSC mit 0,1 % [w/v] SDS) und zweimal in hoch-stringentem Waschpuffer (0,2x SSC+ 0,1 % SDS) für je 10 min bei 65 °C gewaschen.

Der Nachweis hybridisierter, DIG-markierter Sonden erfolgte mit Hilfe Alkalischer-Phosphatase-konjugierter anti-DIG-Antikörper (Roche, Mannheim). Die Membran wurde dazu für 5 min in Maleinsäurepuffer (150 mM NaCl, 100 mM Maleinsäure, pH 7,5) mit 0,3 % Tween äquilibriert und anschließend bei RT für 30 min in *Blocking*-Lösung (1 % *Blocking*-Reagenz (Roche, Mannheim) in Maleinsäurepuffer) inkubiert. Die Bindung des anti-DIG-Antikörpers (1:10000 in *Blocking*-Lösung) erfolgte für 30 min bei RT. Nach 2 x 15 min Waschen in Maleinsäurepuffer mit 0,3 % Tween 20, wurde die Membran 5 min in Detektionspuffer (100 mM Tris/HCl pH 9,5, 100 mM NaCl) äquilibriert. Nachdem die Membran für 2 min in dem lumineszierenden Phosphatase-Substrat CSPD (1:100 in Detektionspuffer; Roche) inkubiert worden war, wurde sie mit dem ChemiluxPro (Intas, Brüssel, Belgien) analysiert.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Verwendung
<b>Firefly_luc_1828rev</b>	GCTACCTGGTAGCCCTTGTA	Luciferase-Sonde
<b>Firefly_luc_1259fw</b>	GCATGTTACACCAGCTGG	Luciferase Sonde
<b>gp120_481fw</b>	ACCGTGGTGAGGGACAGGAAGC	gp120-Sonde
<b>gp120_1114rev</b>	CTGCTGGCGAACTTGATG	gp120-Sonde
<b>Csgpn_2178fw</b>	GACTTCAGGGAGCTGAACAAGAG	C-gpn Sonde
<b>Csgpn_2656rev</b>	TGCAGCAGGC AGTTGTCCTC	C-gpn Sonde
<b>gfp_142fw</b>	CCCTGAAGTTCATCTGCACC	gfp-Sonde
<b>gfp_516rev</b>	GATCTTGAAGTTCACCTTGATG	gfp-Sonde

Tab. B.7) Verwendete Oligos zur Herstellung DIG-markierter Sonden

## B.2.2.2 Generierung von EHV-1-Virusstocks

### B.2.2.2.1 Verwendete Zelllinien

Zur Generierung und Vermehrung von Viren wurden die eukaryontischen Zelllinien RK13 und RK13-48 verwendet.

Die Zelllinien RK13 (Kaninchen-Nieren-Epithelzelllinie (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Zellbank für Zelllinien in der Veterinärmedizin, Friedrich-Löffler Institut, Insel

Riems)) und RK13-48 (von RK13-Zellen abgeleitete Zelllinie; konstitutive Expression des EHV-Gens UL48) (von Einem *et al.*, 2006) wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in Komplettmedium (DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium) mit 10 % inaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml)) kultiviert. RK13-48 Zellen erhielten zudem Geneticin (500 µg/ml) um den Selektionsdruck für das UL48-Gen aufrechtzuerhalten. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 bis 1:7,5 subkultiviert.

#### **B.2.2.2.2 Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)**

Für eine Transfektion mit BAC-DNA wurden 5 x 10<sup>5</sup> RK13 oder RK13-48 Zellen in 6-Well-Platten ausgesät. 24 h später wurde das Medium durch DMEM ohne Antibiotika ersetzt. 2 µg DNA in 100 µl DMEM wurden mit 5 oder 10 µl PEI (1 mg/ml, pH 7,2, sterilfiltriert) gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der DNA-PEI-Mix zu den Zellen gegeben. Nach 4-6 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte der Austausch des Mediums durch Komplettmedium.

Nach Auftreten eines deutlichen cytopathischen Effekts (ca. 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 Zelllysate aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### **B.2.2.2.3 Herstellung hochtitriger Virusstocks**

Die Herstellung erfolgte über zwei Amplifikationsrunden. Im ersten Schritt erfolgte eine Vermehrung der Viren durch eine Infektion konfluenter RK13 oder RK13-48 in einer T75 Zellkulturflasche (BD, Heidelberg) mit 1 ml Transfektionsüberstand (s. B.2.2.2.2). Nach Ablösung des Zellrasens nach 3–5 Tagen wurden Zellen und Zellüberstand geerntet und durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37 °C aufgeschlossen. Danach wurde das Zelllysate aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Zur Herstellung eines hochtitrigen Virusstocks wurden 12 konfluent bewachsene T175 Zellkulturflaschen (BD, Heidelberg) mit 500 µl Zelllysate der 1. Vermehrungsrunde in 10 ml Medium 1 h unter Standardbedingungen inkubiert. Dabei wurden die Flaschen mehrmals geschwenkt. Danach erfolgte ein Mediumwechsel mit je 40 ml Komplettmedium. Die Zellen und der Zellüberstand wurden nach Ablösen des Zellrasens (nach 3-5 Tagen) geerntet und durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37 °C aufgeschlossen. Zur Abtrennung von Zelltrümmern wurden die Lysate 10 min bei Raumtemperatur und 1000 x g zentrifugiert. Die Anreicherung der Viren aus den Überständen erfolgte mittels Ultrazentrifugation (SW32 Rotor (BD Pharmingen, Heidelberg), 2 h, 4 °C, 25000 rpm) durch je 5 ml sterile 30 %ige Sacharoselösung in H<sub>2</sub>O pro 35 ml Lysat. Die Viruspellets wurden in je 100 µl PBS aufgenommen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die

Virussuspensionen vereinigt, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### **B.2.2.2.4 Bestimmung von Virustitern mittels Plaque-Assay**

Die Bestimmung von Virustitern wurde mit RK13 bzw. RK13-48 Zellen in 12-Well-Platten durchgeführt. Hierzu wurde das Medium der konfluenten Zellen quantitativ entfernt und durch unterschiedliche Verdünnungen an aufgereinigtem Virus (B2.5.2) ersetzt (Gesamtvolumen 150 µl). Anschließend wurde 1 h bei gelegentlichem Schwenken unter Standardbedingungen inkubiert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel mit 2 ml 0,25x Methocelmedium (verdünnt aus 1x Methocelmedium: 25 g/l (w/v) Methylzellulose, 9,4 g/l (w/v), MEM-Pulver 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2 mM Glutamin und Kompletmedium). Nach Auftreten deutlicher Plaques im Zellrasen 2 bis 4 Tage nach Infektion wurde das Methocelmedium abgenommen, und der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit Fixierer (PBS mit 5 % (v/v) Formalin) 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die nachfolgende Färbung des Zellrasens wurde mit Kristallviolett-Färbelösung (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 deionisiertem Wasser gewaschen und getrocknet. Der Virustiter (Pfu/ml) berechnete sich aus der Anzahl der Plaques x Verdünnungsfaktor x 1/0,15 ml

#### **B.2.2.2.5 Aufreinigung von genomischer und viraler DNA**

Für die Isolierung genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen bzw. genomischer und viraler DNA aus infizierten Zellen wurden  $5 \times 10^5$  bis  $5 \times 10^6$  Zellen geerntet, einmal in PBS gewaschen und anschließend in 200 µl PBS aufgenommen. Die weitere Präparation erfolgte mit dem QIAamp DNA Kit (QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die Konzentration wurde mit dem Nanodrop (ThermoScientific, Wilmington, USA) bestimmt. Die DNA wurde anschließend als Ziel-DNA für eine analytische PCR eingesetzt und die Richtigkeit des Produkts gegebenenfalls durch eine Sequenzierung (B.2.2.6) bestätigt.

#### **B.2.2.2.6 Nachweis der Transgen-Expression**

##### **B.2.2.2.6.1 Western Blot Analyse**

###### **B.2.2.2.6.1.1 Aufbereitung von Proteinproben**

Transfizierte bzw. infizierte eukaryontische Zellen wurden geerntet, einmal mit PBS gewaschen (300 x g; 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]) unter Zugabe von Proteaseinhibitoren (1 Tablette / 10 ml (Complete<sup>TM</sup>; Roche, Mannheim)) aufgenommen. Nach 30 min Inkubation auf Eis unter

regelmäßigem Mischen auf dem Vortex (Scientific Industries, New York, USA) wurden die Zelllysate für 10 min bei 20 800 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden in frische Reaktionsgefäße überführt und eine Proteinbestimmung nach Bradford (s. B.2.3.2) durchgeführt. Nach Zugabe von 1/5 Probenvolumen an 6 x Laemmli-Probenpuffer (312,5 mM Tris/ HCl, pH 6,8; 5 % [w/v] SDS, 25 %  $\beta$ -Mercaptoethanol, 2,5 mM EDTA, 25 % [v/v] Glycerin, 0,0125 % [w/v] Bromphenolblau) erfolgte die Inkubation der Proben für 5 min bei 95 °C. Bis zur Verwendung wurden sie bei -20 °C gelagert.

#### B.2.2.2.6.1.2 Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)

Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge in den aufbereiteten Proteinproben erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Dafür wurde 1-5  $\mu$ l Probe je Well zu 160  $\mu$ l PBS pipettiert und anschließend 40  $\mu$ l BioRad Protein-Assay Reagenz (BioRad, München) zugegeben und gut durchmischt. Nach 5 min Inkubation bei RT erfolgte eine Extinktionsmessung bei 595 nm (Microplate Reader von Eppendorf, Hamburg). Die Proteinmenge wurde relativ, bezogen auf einen mitgeführten BSA-Standard, berechnet.

#### B.2.2.2.6.1.3 SDS-PAGE und Western Blot

Zur Analyse der spezifischen Proteinexpression wurden 20 – 50  $\mu$ g der wie unter B.2.2.2.6.1.1 vorbereiteten Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend unter Verwendung einer „SemiDry-Blotting“-Apparatur (Serva, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers bei 15 Volt konstant für 1 bis 1,5 h aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (Porengröße 0,45  $\mu$ m von Schleicher & Schuell, Dassel) überführt. Nach dem Blotting wurden freie Bindungsstellen auf der Membran mit Magermilchpulver (5 % [w/v] in TTBS (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 500 mM NaCl; 0,1 % Tween) blockiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit einem spezifischen primären Antikörper (verdünnt in TTBS) bei 4 °C über Nacht. Nach 3 x 10minütigen Waschschritten mit TTBS wurde für 1 h bei RT ein für den Primär-Antikörper spezifischer, mit einer Alkalischen Phosphatase oder einer Meerretichperoxidase-konjugierter sekundärer Antikörper (verdünnt in TBS) eingesetzt. Die Detektion durch die Alkalische Phosphatase erfolgte durch Zugabe von NBT/BCIP (Roche, Mannheim) (1:500 verdünnt in AP-Färbepuffer (100 mM Tris-HCl, pH 9,5; 50 mM  $MgCl_2$ ; 100 mM NaCl)) bis ein violett gefärbter Niederschlag gut sichtbar war. Die Detektion durch die Meerretichperoxidase erfolgte durch Inkubation der Membran nach Herstellerangaben mit dem *SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce, Rockford USA) und anschließender Visualisierung im ChemiluxPro (Intas, Brüssel, Belgien).

Zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen wurde der Precision Prestained Protein Standard (BioRad, München) verwendet.

Bezeichnung	Quelle	Beschreibung	Verdünnung in TTBS
<b>Anti-Luciferase</b>	Acris, Herford	Ziege, polyklonal	1 : 2000
<b>Anti-GFP</b>	Takara/Clonotech, Saint-Germain-en-Laye/ Frankreich	Kaninchen, polyklonal	1 : 500
<b>Anti-β-Actin (AC-15)</b>	Sigma, Deisenhofen	Maus, monoklonal,	1 : 5000
<b>HIV-1 gp120 #42 (CHO)</b>	MRC	Kaninchen, polyklonal	1 : 5000
<b>HIV-1 C-Clade (Klon CB-4/1)</b>	Charité Berlin	Maus, monoklonal	1 : 2000

Tab. B.8a) Übersicht der verwendeten Primärantikörper

Bezeichnung	Quelle	Beschreibung	Verdünnung in TTBS
<b>Anti-Maus-IgG-AP</b>	Bio-Rad, München	Ziege, Erkennung von Maus IgG	1 : 3000
<b>Anti-Maus-IgG-HRP</b>	Dako, Hamburg	Hase, Erkennung von Maus IgG, polyklonal	1 : 2000
<b>Anti-Ziege-IgG-AP</b>	Dianova, Hamburg	Hase, Erkennung von Ziege IgG	1 : 2000
<b>Anti-Kaninchen-IgG-AP</b>	DAKO, Hamburg	Erkennung von Kaninchen IgG,	1 : 2000
<b>Anti-Kaninchen-IgG-HRP</b>	Pierce, Waltham	Ziege, Erkennung von Kaninchen IgG	1 : 2000

Tab. B.8b) Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper

#### **B.2.2.2.7 Luciferase-Assay**

Die Bestimmung der Luciferase Aktivität erfolgte mit Reagenzien des Luciferase-Assays von Promega (Mannheim). Dazu wurden infizierte RK13-Zellen geerntet und einmal mit PBS gewaschen (300 x g; 5 min; 4 °C). Anschließend wurden die Zellen in 200 µl Lysepuffer (CCLR) aufgenommen. Nach 30 min Inkubation auf Eis unter regelmäßigem Mischen auf dem Vortex (Scientific Industries, New York, USA) erfolgte das Entfernen von Zelltrümmern durch 15 sec Zentrifugation bei 20000 x g (Eppendorf Tischzentrifuge). Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Davon wurden 20 µl mit 100 µl Substrat auf dem Vortex gemischt und die Lumineszenz sofort im Lumat 9501 (Berthold, Bad Wildbach) für 10 sec in Relativen Lichteinheiten (RLU) gemessen. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration der Lysate nach Bradford (B.2.2.3.6.1.2) wurden die RLU pro eingesetzter Proteinmenge angegeben.

#### **B.2.2.2.8 Durchflusszytometrische Analysen**

Die Analysen erfolgten analog wie auch unter B.2.4.3 beschrieben.

## B.2.3 Herstellung von NYVAC-Virusstocks

### B.2.3.1 Verwendete Zelllinien

Zur Vermehrung von Viren wurden die eukaryontischen Babyhamster Nierenfibroblasten BHK-21 (ATCC: CCL-10) und zur Bestimmung des Virustiters die Hühner Fibroblastenzelllinie DF-1 (Foster, 1998) verwendet.

Die Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in Komplettmedium (DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit 5 % inaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml)) kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 bis 1:7,5 subkultiviert.

### B.2.3.2 Herstellung hochtitriger Virusstocks

Zur Herstellung hochtitriger NYVAC-Virusstocks wurden 10 Petrischalen (à 150 cm<sup>2</sup> Fläche, (BD, Heidelberg)), die konfluent mit BHK Zellen bewachsene waren, mit einer *multiplicity of infection* (m.o.i.) von 0,5 mit NYVAC-wt oder NYVAC-gag infiziert (zur Verfügung gestellt von Kathrin Kindsmüller und Katharina Böckl, Regensburg). Dazu wurde das Komplettmedium (DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit 5 % inaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml)) abgenommen und durch 10 ml DMEM-Medium ohne Zusätze ersetzt. Nach Zugabe der Viren wurden die Zellen für 2 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden 10 ml DMEM mit 4 % FKS, 200 U/ml Penicillin und 200 µg/ml Streptomycin zugegeben. Nach 2-3 Tagen wurden Zellen und Zellüberstand einer Petrischale jeweils in ein 50 ml Reaktionsgefäß (BD, Heidelberg) überführt und zentrifugiert (1500 rpm, 15 min). Es folgte ein Waschschriff mit je 3 ml PBS (1500 rpm, 15 min), bevor die Zellen zu insgesamt zwei Fraktionen vereinigt und danach ein weiteres Mal in je 10 ml PBS gewaschen wurden. Durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37 °C erfolgte der Zellaufschluss und damit die Freisetzung der NYVACs. Danach wurden die Zellen 2 x für 1 min bei 4 °C im Ultraschallbad behandelt um eventuell entstandene Aggregate zu trennen. Das Lysate wurde 5 min bei 4 °C und 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um verbliebene Viren aus dem Pellet zu isolieren, wurde dieses in 20 ml PBS auf dem Vortex gelöst. Anschließend erfolgte eine Behandlung im Ultraschallbad (2 x für 1 min bei 4 °C) und die Entfernung der Zelltrümmer durch Zentrifugation (5 min, 1500 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde mit dem der ersten Ultraschallbehandlung vereinigt. Die Anreicherung der Viren erfolgte mittels Ultrazentrifugation (SW32 Rotor (BD Pharmingen, Heidelberg), 1 h, 4 °C, 20000 rpm) durch je 20 ml sterile 45 %ige Saccharoselösung in PBS pro 13,3 ml Virusüberstand. Die Viruspellets wurden in je 8 ml PBS aufgenommen und vereinigt. Nach Mischen auf dem Vortex erfolgte abermals eine Behandlung im Ultraschallbad (2 x für 1 min bei 4 °C) und eine Aufreinigung über eine Ultrazentrifugation. Dazu wurden jeweils 20 ml

steriler 45 %ige Saccharoselösung (in PBS) mit 16 ml Virussuspension überschichtet und in einem SW32 Rotor (BD Pharmingen, Heidelberg) für 1 h bei 4 °C und 20000 rpm zentrifugiert. Jedes Pellet wurde in je 1 ml sterilem PBS aufgenommen. Nach Zusammenführen der Virussuspensionen erfolgte die Lagerung in Aliquots bei -80 °C

Die Qualitätskontrolle wurde mittels Western Blot Analyse wie unter B.2.2.6.1 beschrieben mit einem p24-spezifischen Antikörper und einem Anti-NYVAC-Kaninchen-Serum durchgeführt. Zur Ladungskontrolle wurde  $\beta$ -Aktin nachgewiesen.

Bezeichnung	Quelle	Beschreibung	Verdünnung in TTBS
<b>HIV-1 C-Clade (Klon CB-4/1)</b>	Charité Berlin	Maus, monoklonal	1 : 2000
<b>Anti-NYVAC</b>	eigene Herstellung	Kaninchen, Serum	1 : 1000
<b>Anti-<math>\beta</math>-Actin (AC-15)</b>	Sigma, Deisenhofen	Maus, monoklonal,	1 : 5000

**Tab. B.9) Übersicht der verwendeten Primärantikörper**

### **B.2.3.3 Bestimmung von NYVAC-Virustitern mittels Plaque-Assay**

Die Bestimmung von Virustitern wurde mit konfluenten DF-1 Zellen in 12-Well-Platten durchgeführt. Hierzu wurde das Medium quantitativ entfernt und durch unterschiedliche Verdünnungen an aufgereinigtem Virus in Komplettmedium (DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium) mit 5 % inaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100  $\mu$ g/ml)) ersetzt (Gesamtvolumen 200  $\mu$ l). Nach 1,5 h Inkubation unter gelegentlichem Schwenken bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde der Überstand abgesaugt und durch Komplettmedium (DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium) mit 5 % inaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100  $\mu$ g/ml)) ersetzt. Nach 3 Tagen traten deutliche Plaques im Zellrasen auf, die nach Färbung der Zellen mit Kristallviolett-Färbelösung wie unter B.2.2.4 beschrieben, gezählt wurden. Der Virustiter (Pfu/ml) berechnete sich aus der Anzahl der Plaques x Verdünnungsfaktor x 1/0,2 ml

## **B.2.4 Mausstudien**

### **B.2.4.1 Haltung und Immunisierung von Versuchstieren**

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Immunisierungsstudien wurden weibliche Mäuse der Inzuchtrasse BALB/cAnNCrl (H-2d) im Alter von 54-56 Tagen verwendet. Die Tiere wurden in der Tierversuchsanlage H4 des Universitätsklinikums Regensburg gehalten.

Zur intramuskulären (i.m.) und intranasalen (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 eingetrofft.

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.2.4.2 Auslesen von Immunantworten**

##### ***B.2.4.2.1 Auslesen zellulärer Immunantworten***

Die Population der Maussplenozyten setzt sich größtenteils aus B-Lymphozyten (50-60 %), CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (ca. 25 %) und CD8<sup>+</sup>-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- $\gamma$  produzierenden CD8<sup>+</sup>-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- $\gamma$  produzierender Zellen erfolgte mittels intrazellulärer IFN- $\gamma$  Färbung von CD8<sup>+</sup>-Zellen mit anschließender durchflusszytometrischer Analyse.

##### Generierung von primären Maussplenozyten

Mausmilzen wurden unter Verwendung eines sterilen Präparationsbestecks entnommen und in 5 ml Waschwasser (PBS mit 1 % FKS) 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 (5 min, 300 x g, RT). Zur Entfernung der Erythrozyten (Hämolyse) wurden die Zellen in Lysepuffer (5 ml/Milz) (150 mM NH<sub>4</sub>Cl; 1 mM KHCO<sub>3</sub>; 0,1 mM Na<sub>2</sub>EDTA; pH 7,2) resuspendiert und sofort pelletiert (5 min, 300 x g, RT). Anschließend wurde zweimal in je 10 ml Waschwasser gewaschen (5 min, 300 x g, RT). Danach erfolgte die Aufnahme der Zellen in Kompletmedium (RPMI-1640 Medium mit 10 % inaktiviertem FKS, Pen/Strep (100 je U/ml), 2 mM Glutaminlösung und 50 µM  $\beta$ -Mercaptoethanol). 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.

Generierung von primären Maus-Lymphozyten aus der Lunge

Vor der Organentnahme erfolgte die Perfusion der Maus mit 1 ml PBS über die linke Herz-Vorkammer zur Entfernung venösen Blutes um Kontaminationen mit Blutlymphozyten in der Lunge zu vermeiden. Anschließend wurden die Lungen mit einem sterilen Präparationsbesteck entnommen, mit einer Schere zerkleinert und in ein 15 ml Reaktionsgefäß mit 1,3 ml Medium (RPMI 1640, 5 % FKS) je Lunge überführt. Nach Zugabe von in RPMI gelöster, sterilfiltrierter Kollagenase IV (Sigma C5138) zu einer Endkonzentration von 300 U/ml erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für eine Stunde unter gelegentlichem Mischen auf dem Vortex um die Zellverbände aufzulösen. Die Isolierung der Lymphozyten erfolgte über eine Percoll-Dichtezentrifugation. Dazu wurden die Zellen zentrifugiert (300 x g, 5 min) und das Pellet in 2 ml 40 % Percoll (Sigma P4937) (v/v in 150 mM NaCl; Dichte: 1,0578) aufgenommen. Diese Suspension wurde anschließend vorsichtig auf 3 ml 67 % Percoll (v/v in 150 mM NaCl; Dichte: 1,0929) gegeben. Nach Zentrifugation bei 1000 x g für 25 min (ohne Bremse) befanden sich die Lymphozyten sichtbar als weiße Phase zwischen den beiden Percoll-Schichten. Die Lymphozyten wurden vorsichtig mit Hilfe einer Pipette abgenommen und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen 2 x in mindestens 5 ml PBS gewaschen (300 x g, 5 min).

Bestimmung von CD8<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Lymphozyten mittels durchflusszytometrischer Analyse

Zur Bestimmung von IFN- $\gamma$  produzierenden CD8<sup>+</sup> Zellen in der Splenozytenpopulation wurde mit Hilfe Fluoreszenz-gekoppelter, spezifischer Antikörper eine Oberflächenfärbung der CD4- und CD8-Rezeptoren sowie eine intrazelluläre Färbung von IFN- $\gamma$  durchgeführt.

Dazu wurden die präparierten Maussplenozyten auf eine Konzentration von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt und je 100  $\mu$ l in eine Vertiefung einer 96-Well-Platten überführt. Anschließend wurden unterschiedliche Stimulationsansätze vorbereitet. Dafür wurde spezifisches Peptid A9I (Gag Epitop) oder C13L (gp120 Epitop) (10 mM) je 1:500 in RPMI Medium verdünnt und 100  $\mu$ l der Verdünnungen zu den Splenozyten gegeben. Als Negativkontrolle wurden ausschließlich 100  $\mu$ l RPMI Medium, als Positivkontrolle 100  $\mu$ l einer PMA/Iono-Lösung eingesetzt, die unspezifisch eine starke IFN $\gamma$ -Produktion induziert (PMA/Iono-Lösung: 0,1  $\mu$ g/ml Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), 1  $\mu$ g/ml Ionomycin (Iono) in RPMI Medium). Die Zugabe von 1  $\mu$ g Brefeldin A (BFA) zu allen Stimulationsansätzen verhindert die IFN- $\gamma$ -Sekretion und ermöglicht so die intrazelluläre Anreicherung des Proteins in den stimulierten Zellen. Nach Inkubation der Zellen für 6 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Zellen zweimal mit 200  $\mu$ l FACS-Puffer (PBS mit 1 % FKS und 1 g/l NaN<sub>3</sub>) gewaschen (5 min, 300 x g, RT) und anschließend in eine 96-Well-Rundbodenplatte überführt. Um die Fc-Rezeptoren zu blockieren, wurde je 100  $\mu$ l einer CD16/32 Antikörperlösung (1:100 verdünnt in FACS-Puffer) zu den Splenozyten gegeben und 10 min bei 4 °C inkubiert.

Anschließend wurden die CD4- und CD8-Oberflächenproteine durch Zugabe von 10 µl einer Antikörperverdünnung von Anti-CD4-FITC (1:20 verdünnt in FACS-Puffer) und Anti-CD8-APC (1:20 verdünnt in FACS-Puffer) 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 NaN<sub>3</sub>) gewaschen (5 min, Raumtemperatur, 300 x g). Danach wurden die Proben in 250 µl Cytotfix/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 x g) und anschließend für 25 min mit 100 µl IFN-γ-PE Antikörper-Lösung (Verdünnung 1:200 in Perm/Wasch-Puffer) bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten in Perm/Wasch-Puffer (5 min, 4 °C, 500 x g) wurde das Zellpellet in einer geeigneten Menge FACS-Puffer aufgenommen und die Probe im Durchflusscytometer analysiert (FACScalibur; BD Pharmingen, Heidelberg).

Bezeichnung	Quelle	Beschreibung	Verdünnung in FACS-Puffer
<b>Anti-Maus CD4</b>	BD, Heidelberg	Ratte, Erkennung von Maus CD4 Oberflächenrezeptoren	1 : 200
<b>Anti-Maus CD16/32</b>	BD, Heidelberg	Ratte, monoklonal, Erkennung von Maus Fc-Rezeptoren (CD16/CD32)	1 : 200
<b>Anti-Maus CD8a (Ly-2)</b>	BD, Heidelberg	APC-gekoppelt, Ratte, Erkennung von Maus CD8 Oberflächenrezeptoren	1 : 200
<b>Anti-Maus IFN-γ</b>	BD, Heidelberg	PE-gekoppelt, Ratte, Erkennung von Maus IFN-γ	1 : 200

**Tab. B.10) Verwendete Antikörper zur Bestimmung von zellulären Immunantworten**

#### **B.2.4.2.2 Auslesen humoraler Immunantworten**

##### Gewinnung von Mausseren

Den Versuchstieren wurde einen Tag vor der Grundimmunisierung und 10 Tage nach der zweiten *Booster*-Immunsierung durch Anritzen 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 (10 min, 5200 x g; 4 °C) und der klare Überstand als Serum in frische Probengefäße überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Serum bei -20 °C gelagert.

Antikörper-ELISA (Ig gesamt)

Die Bestimmung der Antikörpertiter von Env-spezifischen Gesamtimmunglobulinen erfolgte mittels Endpunktdilutions-ELISA.

Dafür wurden 96-Well Maxisorb Platten (Nunc, Wiesbaden) mit je 50 ng gp140<sub>CN54</sub> (Simon Jeffs, London, UK) in Carbonatpuffer (0,2 M NaHCO<sub>3</sub> pH 9,5 eingestellt mit 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) beschichtet (finale Proteinkonzentration je Well 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-Well 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 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem sechsmaligem Waschen wurden je 100 µl TMB-Substratlösung (BD, Heidelberg) zugegeben. Im Dunkeln erfolgte die Inkubation der Proben bei Raumtemperatur so lange, bis eine deutliche blaue Farbentwicklung eintrat. Dann wurde die Reaktion mit 100 µl 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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.

Bezeichnung	Quelle	Beschreibung	Verdünnung
<b>Anti-Maus Ig HRP-gekoppelt</b>	Dako, Hamburg	Kaninchen, polyklonal	1 : 2000

**Tab. B-11) Verwendete Antikörper für Ig-gesamt Antikörper-ELISA**

Gewinnung von bronchoalveolaren Lavagen (BAL)

Zehn Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Mäuse mit CO<sub>2</sub> 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 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 20000 x g zentrifugiert und der klare Überstand in frische Probengefäße überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die BALs bei -20 °C gelagert.

IgA Antikörper ELISA

Die Bestimmung der Antikörpertiter von Env-spezifischen IgA erfolgte mittels Endpunktdilutions-ELISA.

Dafür wurden 96-Well Platten (Nunc, Wiesbaden) mit je 50 ng gp140<sub>CN54</sub> (Simon Jeffs, London, UK) in 100 µl Carbonatpuffer (0,2 M NaHCO<sub>3</sub> pH 9,5 eingestellt mit 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) beschichtet 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-Well 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) 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem zehnmalem 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, 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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 dreimal so hoch ist, wie die einer auf derselben Platte parallel gemessenen Negativkontrolle. Als Negativkontrolle dienten bronchoalveolare Lavagen von nicht immunisierten Mäusen.

Bezeichnung	Quelle	Beschreibung	Verdünnung
<b>Anti-Maus IgA Biotin-gekoppelt (C10-1)</b>	BD Pharmingen, Heidelberg	Ratte, monoklonal, spezifische Erkennung von Maus-IgA	1:1000

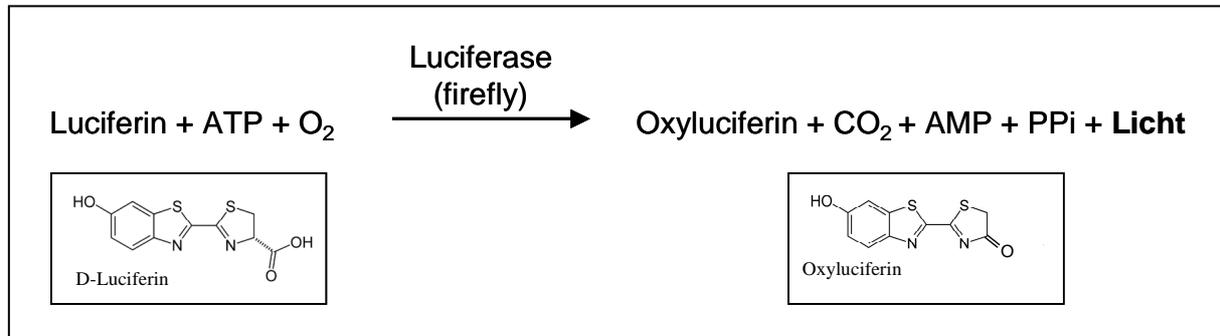
**Tab. B.12) Verwendete Antikörper für IgA Antikörper ELISA**

### **B.2.4.3 Nachweis von EHV-1 in Mausgeweben**

#### **B.2.4.3.1 In vivo Imaging**

Die Luciferase Aktivität in lebenden Balb/c Mäusen wurde mit dem Xenogen IVIS 200 System (Caliper Life Science GmbH, Rüsselsheim) aufgenommen. Es wurden immer drei Tiere zur selben Zeit behandelt. Dafür wurden sie ständig mit 2 % Isoflurane (Baxter, Unterschleißheim) narkotisiert. Die Tiere erhielten 6 mg D-Luciferin (Promega, Mannheim) in

100 µl PBS intraperitoneal appliziert. Der chemische Prozess zur Lichtentstehung ist in Abb. B-2 dargestellt. Nach 5 min Inkubation wurde ein Lichtbild und die Lichtemission für 10 min in der Imaging Kammer mit einer hochempfindlichen *CCD*-(*charge-coupled device*) Kamera aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit der Living Image<sup>®</sup> Software, Version 2.60.1.



**Abb. B-2) Biolumineszenzreaktion der *firefly* (*Photinus Pyralis*) Luciferase.**

Als Substrat dient D-Luciferin (PubChem 5459882), das unter Verwendung der Kofaktoren ATP und molekularem Sauerstoff durch das Enzym Luciferase zu Oxyluciferin, Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>), AMP, Pyrophosphat (PPi) und Licht umgesetzt wird.

#### **B.2.4.3.2 Gewinnung von Probenmaterial**

##### Gewinnung von Mausgeweben

Die mit Kohlenstoffdioxid getötete Maus wurde auf Styropor fixiert, das Fell mit Alkohol befeuchtet und die Felldecke der Bauchseite entfernt. Der Brustkorb wurde geöffnet und Blut mit einer Spritze, in die 1 Tropfen Heparin vorgelegt worden war, aus der rechten Herzkammer entnommen. Daraufhin erfolgte eine Perfusion mit PBS über die linke Herzkammer um möglichst viel Blut aus den Organen zu entfernen, da vor allem das Hämoglobin die Luciferase-Aktivität in späteren Test negativ beeinflussen hätte können (Colin *et al.*, 2000). Folgende Gewebe wurden entnommen: Herz, Lunge mit Trachea, Gehirn, Ganglion trigeminale, Nase (Nasenmuschel und Schleimhäute), Leber (Teile beider Leberlappen), Milz, Nieren, Ovarien, Lymphknoten (*axillaris*, *axillaris accessorius*, *mandibularis*, *mandibularis accessorius*, *cervicalis profundus cranialis*) (Van den *et al.*, 2006). Um Kontaminationen zu verhindern, wurde für jedes Organ frisch gereinigtes und desinfiziertes Besteck verwendet. Nach Entnahme wurde das Probenmaterial sofort mit PBS abgespült, in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit rundem Boden überführt und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Gewebe bei – 80 °C gelagert.

##### Herstellung von Homogenaten aus Gewebeproben

Die gewonnenen Gewebeproben (Herz, Lunge mit Trachea, Gehirn, Nase (Nasenmuschel und Schleimhäute), Leber (Teile beider Leberlappen), Milz und Nieren aus Balb/c Mäusen wurden auf Eis aufgetaut und je 80 µl pro 25 mg Probe (maximal jedoch 700 µl) kaltes PBS

zugegeben (s. Tab. B.14). Anschließend erfolgte der Aufschluss der Gewebe für 30 sec mit dem TissueRuptor (Qiagen, Hilden).

Gewebe	Durchschnittliche Masse (mg)	PBS Zugabe (ml)
<b>Herz</b>	140	0,4
<b>Lunge &amp; Trachea</b>	250	0,7
<b>Gehirn</b>	400	0,7
<b>Nase</b>	25	0,16
<b>Leber</b>	180	0,7
<b>Milz</b>	100	0,3
<b>Niere</b>	280	0,7

**Tab. B.13) Durchschnittliche Masse und Volumen der PBS-Zugabe für die Homogenisierung der angegebenen Gewebe.**

10 µl der Homogenate wurde sofort mittels eines Luciferase-Assay (Promega, Mannheim) analysiert (s. B.2.5.3.2). Das verbleibende Material wurde bis zur Isolierung der DNA bei -80 °C gelagert.

#### Gewinnung genomischer und viraler DNA

Für die Isolierung genomischer DNA bzw. genomischer und viraler DNA aus Mausgeweben wurden 25 mg Gewebehomogenat von Balb/c aus Herz, Lunge mit Trachea, Gehirn, Nase (Nasenmuschel und Schleimhäute), Leber (Teile beider Leberlappen) oder Nieren, 10 mg Gewebehomogenat der Milz, 200 µl Vollblut, oder komplette Lymphknoten bzw. Ovarien eingesetzt. Unter Zugabe von 100 µl ATL-Puffer (aus QIAamp DNA Kit (QIAGEN, Hilden)) und 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) wurden die Zellen bei 56 °C 400 rpm lysiert (1-4 h) bis eine klare Lösung entstand. Die weitere Präparation erfolgte mit dem QIAamp DNA Kit (QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die DNA aus Vollblut wurde dabei zweimal über eine QIAamp Säule gereinigt, um für die PCR inhibitorische Faktoren abzutrennen. Die Konzentration der aufgereinigten DNA wurde anschließend mit dem Nanodrop (ThermoScientific, Wilmington, USA) bestimmt und lag je nach Ausgangsmaterial zwischen 10 und 200 ng / ml.

#### **B.2.4.3.3 Luciferase-Assay von Mausgeweben**

Luciferase-Assays wurden mit einem kommerziellen Kit von Promega (Mannheim) durchgeführt. Dazu wurden 10 µl Gewebehomogenat in 200 µl Lysepuffer (CCLR) für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte das Entfernen von Zelltrümmern durch 15 sec Zentrifugation bei 20000 x g (Eppendorf Tischzentrifuge). Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. 20 µl dieses Lysats wurden nach Zugabe von 100 µl Substrat auf dem Vortex (Scientific Industries, New York, USA) gemischt und die Lumineszenz im Lumat 9501 (Berthold, Bad Wildbach) für 10 sec in Relativen Lichteinheiten

(RLU) gemessen. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration der Lysate nach Bradford wurde die RLU pro eingesetzter Proteinmenge angegeben.

#### **B.2.4.3.4 Quantitative Real-Time PCR (qRT) für den Virusnachweis in Mausgeweben**

Als Ziel-DNA diente entweder aufgereinigtes Plasmid pSCA-gpD oder pSCA-GAPDH zum Erstellen von Standardkurven oder mit dem QIAamp DNA Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigte DNA aus Mausgeweben (verdünnt zu 10 ng DNA /  $\mu\text{l}$  in  $\text{H}_2\text{O}$ ).

Für die qRT PCR wurden je 9  $\mu\text{l}$  Mastermix und 1  $\mu\text{l}$  DNA (5  $\mu\text{l}$  2 x Universal Taqman Mastermix (ABI, Foster City, USA), je 0,9 mM Oligos und 0,25 mM Sonde) pro *Well* einer 48-*Well*-Platte (ABI, Foster City, USA) luftdicht mit Folien (ABI, Foster City, USA) verschlossen. Dabei erfolgte das Vorlegen des Mastermixes und die Zugabe der Probe in unterschiedlichen Räumen. Zusätzlich wurden alle Flächen und Geräte regelmäßig mit NaOCl abgewischt um falsch positive Ergebnisse durch Kontaminationen zu vermeiden. Die Platte wurde in dem StepOne Cycler (ABI, Foster City, USA) wie folgt inkubiert: 95 °C 10 min, 40 Zyklen: 95 °C 15 sec, 60 °C 1 min.

Dabei wurde die Fluoreszenz jeweils am Ende der Elongation gemessen. Eine Wertung der qRT PCR erfolgte mit der StepOne-Software (ABI, Foster City, USA), wenn die Positivkontrolle (1000 Kopien pSC-A gpD), die bei jedem PCR-Lauf in zwei Ansätzen eingesetzt wurde, positiv war. Zusätzlich musste jede DNA-Probe eine eindeutige GAPDH-Amplifikation aufweisen.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Verwendung
<b>GAPDH-Sonde</b>	JOE-CCCTGCATCCACTGGTGCTGCC-BHQ1	Markiertes Oligo als Sonde für die qRT PCR
<b>gpD-Sonde</b>	FAM-CAAAGGAGTTTCCACCACCCCGCT-BHQ1	Markiertes Oligo als Sonde für die qRT PCR
<b>gpDfw</b>	GTTTCGAGGACGCCAGGATAG	Amplifikation gpD
<b>gpDrev</b>	TAGCGCAGTCGCGTTGTATCT	Amplifikation gpD
<b>GAPDHfw</b>	GGGCTGCCCAGAACATCA	Amplifikation GAPDH
<b>GAPDHrev</b>	CCGTTTCAGCTCTGGGATGAC	Amplifikation GAPDH

Tab. B.14) Verwendete Oligos für die qRT PCR

#### **B.2.4.3.5 Isolierung von EHV-1 aus Maus-Lungen**

##### Entnahme von Lungen

Die getötete Maus wurde auf Styropor fixiert, das Fell mit Alkohol befeuchtet und die Felldecke der Bauchseite entfernt. Der Brustkorb wurde durch einen Schnitt links und rechts durch die Rippen geöffnet und die Maus zum Entfernen des Blutes aus der Lunge perfundiert. Dazu wurde eine Öffnung in die rechte Herzvorkammer geschnitten, aus der das

Blut austreten konnte und 1 bis 2 ml steriles PBS über die linke Herzkammer gespritzt. Anschließend wurde die Trachea freigelegt und während sie mit einer Pinzette fixiert wurde im Halsbereich durchtrennt und die Lunge mit dem Herz herauspräpariert. Nach Entfernen des Herzens und der Trachea wurde die Lunge in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Gewebe bei -80 °C gelagert.

### Titration von EHV-1 aus Lungen

Zur Bestimmung von EHV-1-Titern in der Lunge wurden die Organe in 500 µl DMEM-Medium (1 % Pen/Strep) mit einem Mikropistill (Roth, Karlsruhe) homogenisiert. Die Homogenate wurden bei - 80 °C nochmals eingefroren. Nach Zentrifugation bei 12000 rpm für 5 min wurden je 30 µl Überstand zur Herstellung einer Verdünnungsreihe (jeweils 1:10 in Medium) eingesetzt. Je 200 µl einer Verdünnung wurden mit konfluenten RK13 Zellen in einem *Well* einer 12-*Well*-Platten für 1 h unter gelegentlichem Schwenken bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel durch 2 ml 0,25 x Methocelmedium (verdünnt aus 1x Methocelmedium: 25 g/l (w/v) Methylzellulose, 9,4 g/l (w/v), MEM-Pulver 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2 mM Glutamin und Kompletmedium). Nach Auftreten deutlicher Plaques im Zellrasen 2 bis 4 Tage nach Infektion wurde das Methocelmedium abgenommen, der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen und die Zellen im Anschluss mit Fixierer (PBS mit 5 % (v/v) Formalin) 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die nachfolgende Färbung des Zellrasens wurde mit Kristallviolett-Färbelösung (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 und getrocknet. Der Virustiter (Pfu/ml) berechnete sich aus der Anzahl der Plaques x Verdünnungsfaktor x 1/0,15 ml

## **B.2.5 Infektionsstudien humaner PBMCs**

### **B.2.5.1 Isolierung humaner PBMCs aus Vollblut**

Die Isolierung der PBMCs (*peripher blood mononuclear cells*) erfolgte aus heparanisiertem Blut von humanen Spendern durch Abtrennen der Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten. Je 12,5 ml Blut wurden dazu in ein 50ml-Reaktionsgefäß (Greiner Bio-One, Frickenhausen) überführt, mit P2 (PBS, 2% FKS) auf 35 ml aufgefüllt und durch leichtes Schwenken vermischt. Zur Vorbereitung der Leucosep<sup>®</sup>-Röhrchens (Greiner Bio-One, Frickenhausen) wurden 15 ml Pancoll (PANBiotech, Aidenbach) für 1 min bei 300 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurden 35 ml des verdünnten Blutes vorsichtig in das Leucosep<sup>®</sup>-Röhrchen überführt und 30 Minuten bei 1000 x g ohne Bremse zentrifugiert. Die weiße Phase oberhalb der Trennscheibe des Leucosep<sup>®</sup>-Röhrchen bestehend aus PBMCs und

Thrombozyten wurde abgenommen und in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch zweimaliges Waschen (10 min, 300 x g, RT) mit je 45 ml P2-Puffer (PBS, 2 % FKS) wurden die meisten Thrombozyten entfernt. Nach Aufnahme des Pellets in 1 ml RPMI-Medium (10 % inaktiviertes FKS und 1 % Pen/Strep) erfolgte die Bestimmung der Lebendzellzahl durch Färben der toten Zellen mit 1 % Trypanblau.

### **B.2.5.2 Fraktionierung von PBMCs in Subpopulationen**

Die über Pancoll präparierten PBMCs bestehen vor allem aus T-Zellen, B-Zellen, und Monozyten sowie einer geringen Zahl an Makrophagen, Natürliche Killerzellen und Dendritischen Zellen.

Die Fraktionierung in Subpopulationen erfolgte mit dem MACS CD19 (B-Zellen) bzw. CD14 (Monozyten/Makrophagen) Isolation Kit (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach). Dabei wurden die Zellen stets auf Eis gehalten und alle verwendeten Lösungen gekühlt. Zunächst wurden die PBMCs in 80 µl je  $1 \times 10^7$  Zellen MACS-Puffer (PBS (GIBKO), 0,5% FKS, 2 mM EDTA pH8,0, sterilfiltriert und entgast) aufgenommen und 20 µl je  $1 \times 10^7$  Zellen *MicroBeads* zugegeben, an die Antikörper gegen den entsprechenden Marker gekoppelt waren. Nach einer 15minütigen Inkubation bei 4 °C wurden die Zellen mit 10-20fachem Volumen MACS-Puffer gewaschen (10 min, 300 x g, 4 °C) und in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Subpopulationen mit Hilfe des MACS-Separators (Miltenyi) an eine Säule gebunden, gewaschen (3 x 500 µl MACS-Puffer) und schließlich in 1 ml MACS-Puffer eluiert. Nach Zentrifugieren der Zellen (10 min, 300 x g, 4 °C) wurde das Pellet in 1 ml RPMI, 10 % inaktiviertes FKS und 1 % Pen/Strep aufgenommen und die Lebendzellzahl bestimmt. Die Reinheit der Population wurde im Durchflusszytometer durch Färbung mit FITC-markiertem Antikörper gegen CD20 (B-Zell-Marker) bzw. CD14 gemessen und lag stets über 96 %. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in für adhärenente Zellen geeigneten Zellkulturgefäßen in RPMI-Medium mit 10 % inaktiviertem FKS und 1 % Pen/Strep.

### **B.2.5.3 Durchflusszytometrische Analysen**

#### Extrazelluläre Oberflächenmoleküle

Für die durchflusszytometrische Analyse von Molekülen auf der Zelloberfläche wurden  $1 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen zweimal in je 1 ml FACS-Puffer (PBS, 1% FKS, 0,1 %  $\text{Na}_3\text{N}$ ) in 5 ml Röhrchen (Falcon) gewaschen (300 x g, 4 °C, 5 min). Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 5 µl FcR-block (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) in 100 µl FACS-Puffer für 10 min bei 4 °C um Antikörperbindstellen abzusättigen. Nach 2 weiteren Waschschrritten in je 1 ml FACS-Puffer, wurden die Zellen in 100 µl Antikörperlösung resuspendiert und 30 min auf Eis im Dunkeln markiert. Danach wurden die Zellen zweimal gewaschen und für die Analyse in 300 bis 500 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Einstellung des

Durchflusszytometers erfolgte mit gleichbehandelten Zellen, jedoch ohne Markierung mit Antikörper.

### Intrazelluläre Proteine

Die intrazelluläre Färbung von Proteinen wurde mit dem Intraprep Kit (Invitrogen, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers oder durch Permeabilisieren der Zellen mit Saponin durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit Cytofix/Cytoperm (1 % Saponin und 4 % Paraformaldehyd in PBS) für 20 min bei 4 °C behandelt. Danach erfolgten zwei Waschschriffe mit Perm/Wash (0,1 % Saponin in PBS) (500 x g, 5 min, RT) und die Färbung der Proteine in 100 µl Antikörper-Lösung (1 : 20 in Perm/Wash) für 25 min bei 4 °C im Dunkeln. Anschließend wurden die Zellen zweimal in Perm/Wash gewaschen bevor sie in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen wurden.

Bezeichnung	Quelle	Beschreibung	Verdünnung
<b>Anti-Human CD3</b>	BD, Heidelberg	IgG2a, FITC-gekoppelt, Maus; spezifisch für T-Lymphozyten	1 : 20
<b>Anti-Human CD20</b>	MACS	IgG1, FITC-gekoppelt, Maus; spezifisch für B-Zellen	1 : 20
<b>Anti-Human CD14</b>	MACS	FITC-gekoppelt, Maus; spezifisch für Makrophagen Monozyten, Dendritische Zellen und Langerhans-Zellen	1 : 20
<b>Anti-Human CD66</b>	BD, Heidelberg	IgG1, FITC-gekoppelt, Maus; spezifisch für Granulozyten	1 : 20
<b>Anti-Human CD19</b>	BD, Heidelberg	IgG1, FITC-gekoppelt, Maus; spezifisch für B-Zellen	1 : 20
<b>Anti-p24, RD1-coulter clone KC57</b>	Beckman Coulter	IgG1, PE-gekoppelt, Maus; spezifisch für HIV-1 p24	1 : 20
<b>IgG1</b>	BD, Heidelberg	FITC-gekoppelt, Maus; Isotyp-Kontrolle	1 : 20
<b>IgG2a</b>	BD, Heidelberg	FITC-gekoppelt, Maus; Isotyp-Kontrolle	1 : 20

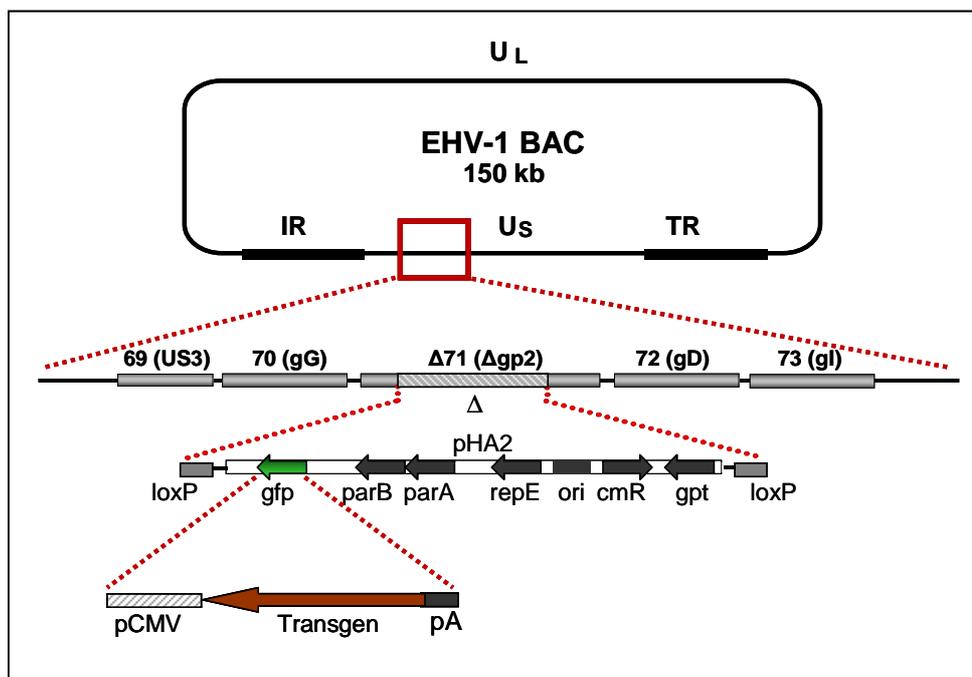
**Tab. B.9) Verwendete Antikörper für durchflusszytometrische Analysen**

## C. Ergebnisse

### C.1 Rekombinante EHV-1 mit unterschiedlichem Attenuierungsgrad können gezielt hergestellt werden

#### C.1.1 Die Herstellung rekombinanter EHV-1 erfolgt über Bacmide mit Hilfe der RED-Rekombination

Für ein virales Vektorsystem ist es von großem Vorteil, wenn neue rekombinante Vektoren relativ einfach hergestellt werden können. Bei EHV-1 ist dies leicht über die zielgerichtete Manipulation des Genoms mit Hilfe von *Bacterial Artificial Chromosomes* (BACs) möglich. Diese enthalten das komplette EHV-1 Genom in zirkulärer Form mit einer Mini-F Plasmid Sequenz (pHA2) anstelle des viralen nicht essentiellen Glykoprotein 2 (gp2) (Abb.C-1).



#### Abb. C-1) Schematische Darstellung eines EHV-1 BAC und der Rekombinationsstelle

Das EH-virale Genom liegt in zirkularisierter Form vor. Der offene Leserahmen US71 wurde ersetzt durch die pHA2 Sequenz (Mini-F Plasmid), die von loxP Sequenzen flankiert ist. Das Mini-F Plasmid enthält die regulatorischen Gene repE, parA und parB, die die DNA-Replikation und die Kopienzahl des Plasmids in der Zelle kontrollieren. Darüber hinaus codiert sie für einen *Origin of Replication* (ori) zur klonalen Vermehrung der DNA in Prokaryonten, ein Gen für die Chloramphenicol-Resistenz (cmR) zur Aufrechterhaltung eines Selektionsdrucks in Prokaryonten und ein Guaninphosphoribosyl-Transferase-Gen (gpt) als eukaryontischen Selektionsmarker. Das gfp-Gen wurde mit Hilfe der RED Rekombination durch das jeweilige Transgen ersetzt.

UL: *Unique Long Region*; US: *Unique Short Region*; TR: *Terminal Repeat Region*; IR: *Internal Repeat Region*; gG: Glykoprotein G; gD: Glykoprotein D; pCMV: Promotor des Cytomegalievirus; pA: *Bovine growth-hormone-polyA-site*; loxP: loxP-site

Für diese Arbeit wurden das hoch attenuierte Bacmid pRacHrv sowie das pathogene pRacL verwendet. Beide enthalten jeweils die Mini-F Sequenz, die u. a. für einen *Origin of Replication* und ein Antibiotika-Resistenz-Gen codiert und so eine selektive Vermehrung in prokaryontischen Zellen ermöglicht. Der Austausch genetischer Informationen erfolgte über RED vermittelte Rekombination von linearen DNA Fragmenten in die BAC-Sequenz in *E. coli* Zellen wie unter B.2.2 beschrieben. Die Wahl der homologen Sequenzen im Endbereich des Konstrukts entscheidet dabei über die Integrationsstelle. Durch die in dieser Arbeit verwendeten Sequenzen im Auf- und Abwärtsbereich des *gfp*-Gens in der Mini-F Plasmid Sequenz fand dort eine Substitution durch das Transgen statt (Abb. C-1).

Über RED vermittelte Rekombination ist es auch möglich, Sequenzen aus dem Bacmid zu eliminieren. Zur Herstellung von UL48-defizienten Bacmiden wurde dafür zunächst die entsprechende Gensequenz in pRacHrv durch eine Kanamycin-Resistenz Kasette ersetzt. Nach der erfolgreichen Selektion von Rekombinanten durch Kanamycin wurde die Kasette mit Hilfe eines weiteren Rekombinationsereignisses wieder rückstandslos aus dem Genom entfernt. In das daraus resultierende Bacmid pRacHrv-gfp- $\Delta$ UL48 wurden, genauso wie in pRacHrv-gfp und pRacL-gfp (Rudolph *et al.*, 2002), mit Hilfe des RED-Rekombinationssystems unterschiedliche Transgene eingefügt und anschließend hochtitrige Virusstocks hergestellt (s.Tab. C-1).

Die Viren EHV und EHV- $\Delta$ UL48 dienten vor allem als Referenzviren sowohl für *in vitro* als auch für *in vivo* Experimente um den Einfluss des Virus *per se* zu beobachten. EHV-1-Vektoren, die das Luciferase-Gen tragen, wurden zur Untersuchung der Sicherheit und Biodistribution im Mausmodell hergestellt. Dabei diente das Luciferase-Enzym nach Zugabe von Substrat als Reporter zum Nachweis von Transgen-Expression *in vitro* und *in vivo* (s. C.2). Des Weiteren wurde basierend auf EVH-L-luc ein rekombinantes Virus generiert, mit dem die Effizienz von HIV-Vakzinekandidaten im Mausmodell getestet werden kann (s. C.5). EHV-gp120 und EHV-gp120- $\Delta$ UL48 wurden als Vakzinekandidaten in Balb/c Mäusen getestet um das Potential von EHV-1-Vektoren zur Induktion HIV-gp120-spezifischer Immunantworten zu untersuchen (s. C.3). Darüber hinaus wurden EHV-1-Vektoren mit dem synthetischen HIV-Gen *gagpolnef* eingesetzt um ihre immunogenen Eigenschaften in *ex vivo* Experimenten mit humanen PBMCs zu analysieren (s. C.4).

BAC Bezeichnung	Virus	Beschreibung	Verwendung
<b>pRacHrv</b>	EHV	Deletion des <i>gfp</i> -Gens in pRacHrv-gfp	Referenzvirus
<b>pRacHrv-<math>\Delta</math>UL48</b>	EHV- $\Delta$ UL48	Deletion des <i>gfp</i> -Gens in pRacHrv-gfp $\Delta$ UL48	Referenzvirus

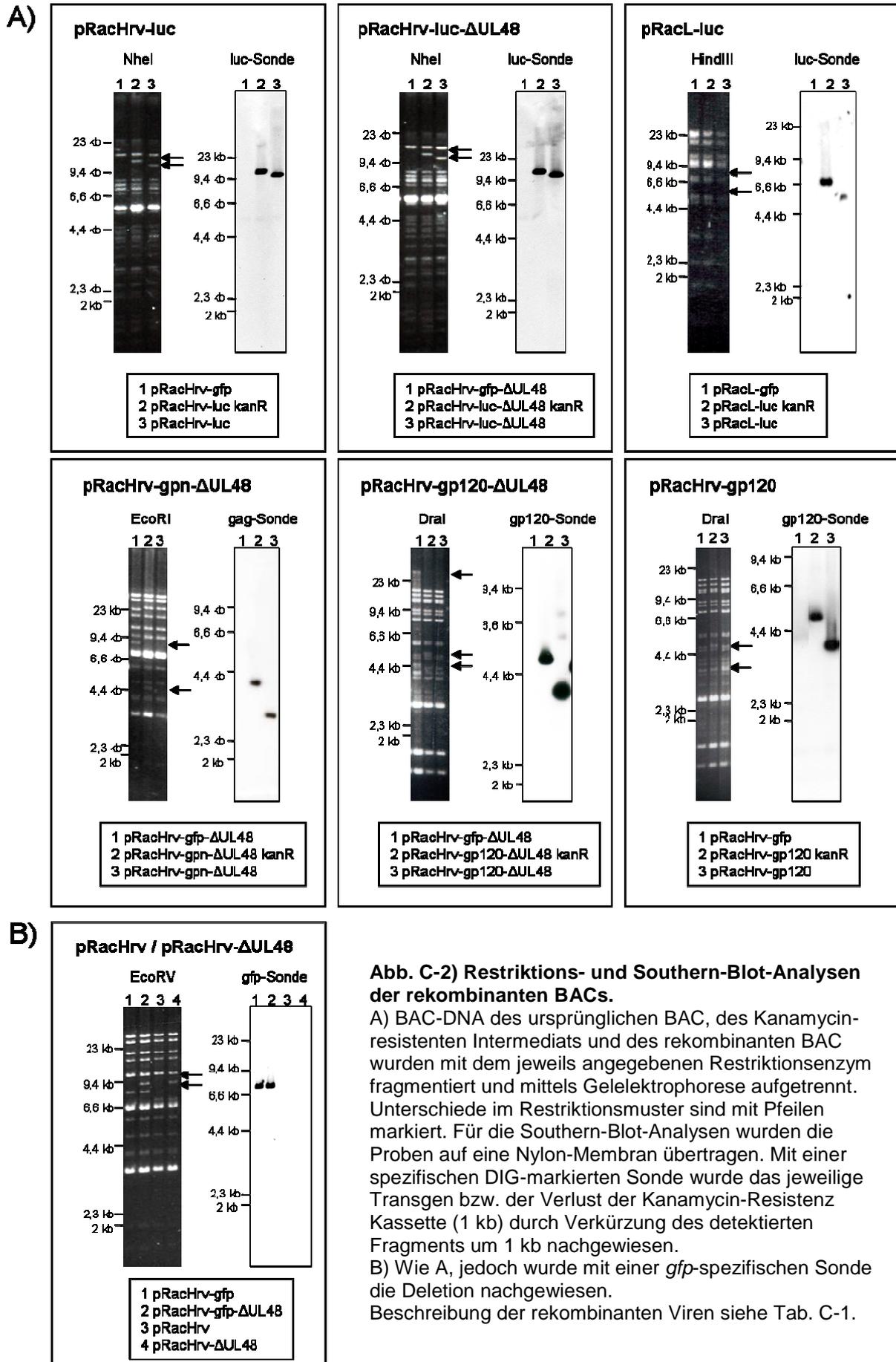
BAC Bezeichnung	Virus	Beschreibung	Verwendung
<b>pRacHrv-luc</b>	EHV-luc	Substitution des <i>gfp</i> durch Sequenz-optimierte <i>firefly</i> Luciferase in pRacHrv-gfp	Reportervirus
<b>pRacHrv-luc-ΔUL48</b>	EHV-luc-ΔUL48	Substitution des <i>gfp</i> durch Sequenz-optimierte <i>firefly</i> Luciferase in pRacHrv-gfp-ΔUL48	Reportervirus
<b>pRacL-luc</b>	EHV-L-luc	Substitution des <i>gfp</i> durch Sequenz-optimierte <i>firefly</i> Luciferase in pRacL-gfp	Reportervirus
<b>pRacHrv-gp120</b>	EHV-gp120	Substitution des <i>gfp</i> durch Sequenz-optimiertes HIV-gp120 (abgeleitet von Isolat CN54) und heterologem ER-Lokalisationssignal <i>tpa</i> in pRacHrv-gfp	HIV-Vakzinekandidat
<b>pRacHrv-gp120-ΔUL48</b>	EHV-gp120-ΔUL48	Substitution des <i>gfp</i> durch Sequenz-optimiertes HIV-gp120 (ursprüngliches Isolat: CN54) und heterologem ER-Lokalisationssignal <i>tpa</i> in pRacHrv-gfp-ΔUL48	HIV-Vakzinekandidat
<b>pRacHrv-gpn-ΔUL48</b>	EHV-gpn-ΔUL48	Substitution des <i>gfp</i> durch Sequenz-optimiertes synthetisches HIV-1-gagpolnef (ursprüngliches Isolat: CN54) in pRacHrv-gfp-ΔUL48	HIV-Vakzinekandidat

**Tab. C-1 Übersicht der hergestellten Konstrukte mit einem Transgen**

Angegeben sind die durch Rekombination in pRacHrv-gfp, pRacHrv-gfp-ΔUL48 oder pRacL-gfp hergestellten Konstrukte sowie die Beschreibung, Bezeichnung und Verwendung der daraus resultierenden Viren.

### **C.1.2 Die erfolgreiche Integration der Transgene wird mit Southern-Blot-Analysen nachgewiesen**

Die erfolgreiche Rekombination der hergestellten BACs wurde mit Hilfe einer Polymerase Ketten Reaktion (PCR) über die Integrationsstelle und einer anschließenden Sequenzierung des Produkts bestätigt (nicht gezeigt). Zudem wurde eine Restriktionsanalyse der BACs mit einer jeweils geeigneten Endonuklease durchgeführt und im Anschluss das Transgen mittels einer Southern-Blot-Analyse unter Verwendung von Digoxigenin (DIG)-markierten Sonden, die Sequenz-spezifisch an die jeweilige Transgen-DNA binden, detektiert (s. Abb. C-2).



Da das jeweilige Restriktionsenzym so gewählt wurde, dass das Transgen und die Kanamycin-Resistenz Kasette (1 kb) auf einem Fragment liegen, konnten durch den Größenunterschied des detektierten DNA-Stücks von 1 kb das intermediäre und das endgültige rekombinante BAC (Kanamycin-sensitiv) unterschieden werden (Abb. C-2A). Im Gegensatz dazu wurde für die hergestellten BACs pRacHrv und pRacHrv- $\Delta$ UL48 mit Hilfe einer *gfp*-Sonde die Deletion des Gens gezeigt (Abb. 2B).

Mit den so verifizierten rekombinanten BAC-DNAs wurden zur Generierung von EHV-1-Virionen eukaryontische Zellen transfiziert.

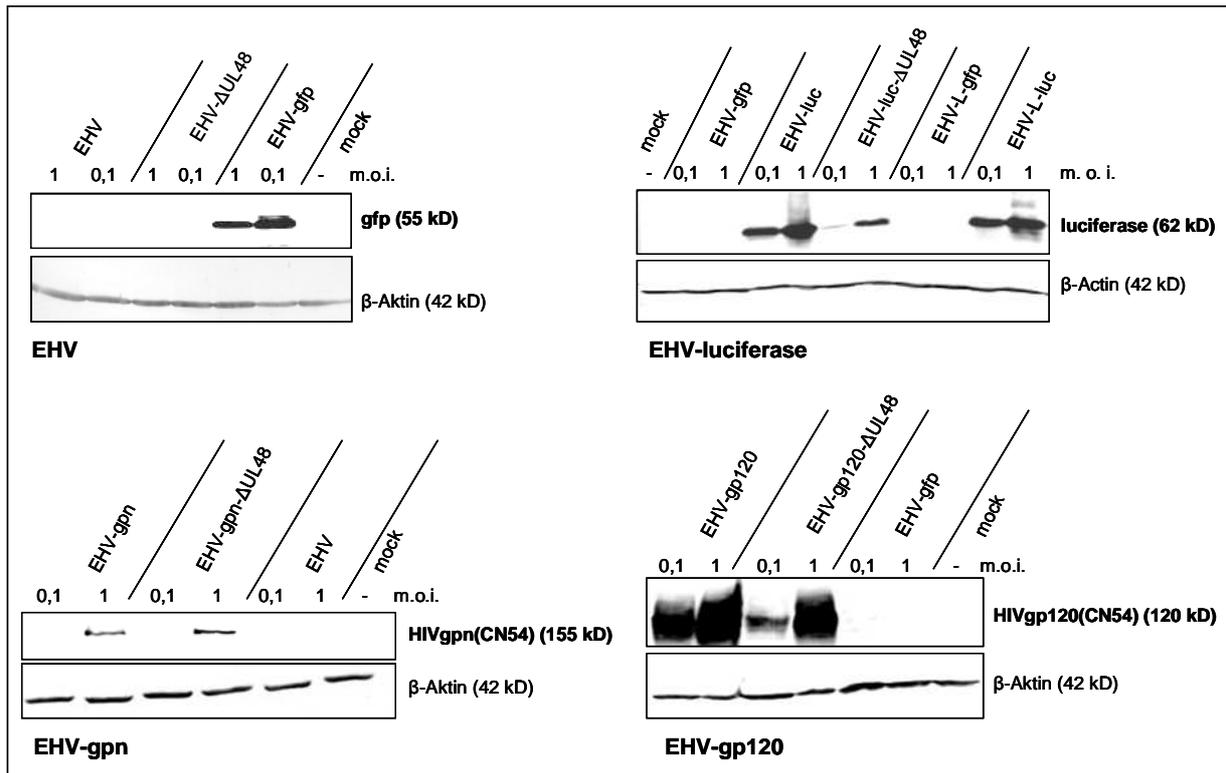
### **C.1.3 Die rekombinanten EHV-1-Vektoren vermitteln die Expression ihres jeweiligen Transgens *in vitro***

Im nächsten Schritt wurde die Expression des entsprechenden Transgens in infizierten Zellen nachgewiesen. Hierfür wurden Western-Blot-Analysen, wie unter B.2.2.2.6.1 beschrieben, durchgeführt. Dazu wurden 16 Stunden nach der Infektion (m.o.i. von 0,1 und 1) Zelllysate von RK13 bzw. RK13-48 hergestellt. Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE und Übertragung auf Nitrozellulose erfolgte die weitere Analyse mit Hilfe spezifischer Antikörper (Abb.C-3).

Es konnte gezeigt werden, dass in den infizierten RK13-48 Zellen das jeweilige Transgen (Luciferase, GPN oder gp120) exprimiert wird. Dabei erscheinen die Signale des gp120 aufgrund der unterschiedlich glykosylierten Varianten relativ diffus. Zudem konnte durch die Deletion des *gfp*-Gens in EHV bzw. EHV- $\Delta$ UL48 infizierten Zellen kein GFP mehr nachgewiesen werden. Die Erhöhung der m.o.i. von 0,1 auf 1 führten jeweils zu einer Erhöhung der Transgen-Menge. Dies ist zum hier gewählten Zeitpunkt (16 h p. i.) zu erwarten, da vorangegangene Experimente in unserer Gruppe bereits gezeigt hatten, dass bei einer Infektion mit einer m.o.i. 0,1 erst nach 48 Stunden nahezu 100 % der Zellen gute Transgen-Expression zeigen, wohingegen mit einer m.o.i. 1 spätestens 24 Stunden p. i. alle Zellen positiv sind. Somit ist die Infektion in den jeweiligen Ansätzen zu diesem Zeitpunkt unterschiedlich weit vorangeschritten.

Die UL48-deletierten Varianten EHV-gp120- $\Delta$ UL48 und EHV-luc- $\Delta$ UL48 vermitteln eine schwächere Transgen-Expression als die entsprechenden UL48-haltigen Viren. Auch dies wurde bereits in vorangegangenen Experimenten unserer Gruppe beobachtet und kann durch die leicht verringerte Replikationsfähigkeit, selbst in transkomplementierenden RK-13-48 Zellen, dieser sehr hoch attenuierten Viren erklärt werden (Hofmann-Sieber, 2010).

Auffallend ist, dass EHV-gpn und EHV-gpn- $\Delta$ UL48 infizierte Zellen erst ab einer m.o.i. von 1 eine Expression des Transgens aufweisen und sich die Stärke dabei für beide Viren nicht unterscheidet. Für die Verifizierung der GPN-Expressionsrate erfolgte deswegen eine weitere Analyse im Durchflusszytometer (s. C.1.5).



**Abb. C-3) Western-Blot-Analysen infizierter RK13-48 Zellen zum Nachweis der Transgen-Expression.**

Unterschiedlich attenuierte Virusstämme mit gleichem Transgen wurden jeweils einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Dazu wurden die Proteine infizierter Zellen (m.o.i. 0,1 und 1) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose übertragen. Anschließend erfolgte die Detektion der Transgene mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen GFP, Luciferase, p24 (Epitop von GPN) oder gegen gp120. Als Negativkontrolle dienten nicht infizierte Zellen (mock). Um eventuelle Kreuzreaktivitäten der Antikörper mit dem Virus zu zeigen, wurden EHV-gfp oder EHV infizierte Zellen verwendet.

### C.1.4 Die HI-viralen Transgene *gpn* und *gag* unterscheiden sich in ihrer Expressionsstärke

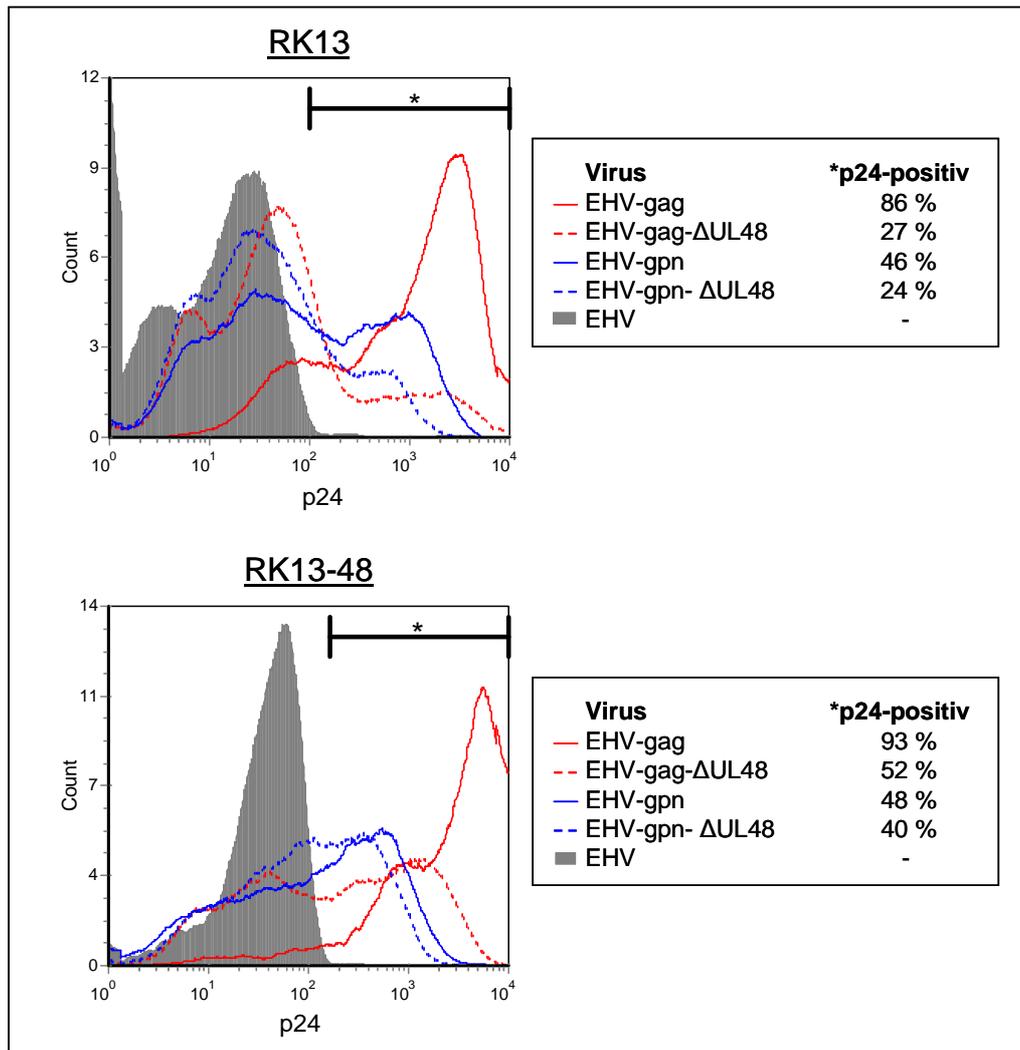
Eine Analyse der Transgen-Expression infizierter Zellen im Durchflusszytometer ist sensitiver als eine Western-Blot-Analyse und ermöglicht sowohl die Darstellung des Anteils an exprimierenden Zellen als auch der relative Expressionsstärke.

Ein Vergleich von EHV-gpn bzw. EHV-gpn- $\Delta$ UL48 mit EHV-gag bzw. EHV-gag- $\Delta$ UL48 infizierten RK13 und RK13-48 Zellen sollte genaueren Aufschluss über den Expressionsunterschied der Transgene geben. EHV-gag und EHV-gag- $\Delta$ UL48 codieren für das HIV-Gag-Protein, das mit dem N-terminalen Bereich des GPN-Polypeptids identisch ist. Daher können beide Transgene mit dem selben Antikörper detektiert werden.

Je  $6 \times 10^5$  Zellen wurden mit einer m.o.i. von 10 infiziert. Nach 12 Stunden wurden die Zellen intrazellulär mit einem PE-gekoppelten Anti-p24-Antikörper markiert und im Durchflusszytometer analysiert (s. Abb. C-4).

Neben einer deutlich schwächeren Expression von GPN gegenüber Gag wiesen EHV-gpn bzw. EHV-gpn- $\Delta$ UL48 zudem eine geringere Infektiosität als EHV-gag bzw. EHV-gag- $\Delta$ UL48 auf. So

waren nach Infektion mit EHV-gag deutlich mehr Zellen (RK13 und RK13-48) p24-positiv (86 % und 93 % pos.) als mit EHV-gpn (46 % und 48 % pos.). Dies galt auch für die entsprechenden UL-48-defizienten Varianten (EHV-gag- $\Delta$ UL48: 27 % und 52 % pos.; EHV-gpn- $\Delta$ UL48: 24 % und 40 % pos.). Wie bereits unter C.1.4 beschrieben, konnte das Defizit der UL48-defizienten Varianten zu den UL-48-haltigen EHV-1 auch in den RK13-48 Zellen nicht vollständig kompensiert werden. Der generell höhere Anteil p24-positiver Zellen in den transkomplementierenden RK13-48 Zellen ergibt sich durch die verbesserte Replikation aufgrund der konstitutiven Verfügbarkeit des eTIF-Proteins.



**Abb. C-4) Vergleich der Transgen-Expression EHV-gag und EHV-gpn infizierter Zellen mit und ohne UL48 mittels durchflusszytometrischer Analyse.**

A) Je  $6 \times 10^5$  RK13 wurden mit den angegebenen Viren (m.o.i. 10) infiziert und nach 12 h mit Hilfe eines PE-markierten Anti-p24-Antikörpers im Durchflusszytometer analysiert. Nicht-infizierte Zellen (mock) wurden gleich behandelt und dienten als Negativkontrolle (graues Histogramm). Dargestellt sind die jeweils putativ lebenden Zellen. . B) Wie A), jedoch wurden RK13-48 Zellen infiziert.

Die verhältnismäßig geringe Effizienz der GPN-Expression (p24 Expression angezeigt auf der x-Achse) hat sich bereits in früheren Experimenten bei der Verwendung von DNA-Konstrukten

gezeigt (Wild *et al.*, 2009a). Die Verwendung dieses HIV-Polyproteins ermöglicht jedoch eine gleichzeitige Verabreichung vieler funktionaler HIV-Epitope mit einem Konstrukt (Bart *et al.*, 2008; McCormack *et al.*, 2008). Trotzdem veranschaulicht dies die Notwendigkeit, die HIV-Immunogene in Bezug auf Expressionsrate und Epitop-Expression weiterzuentwickeln, um ihr Potential zu verbessern.

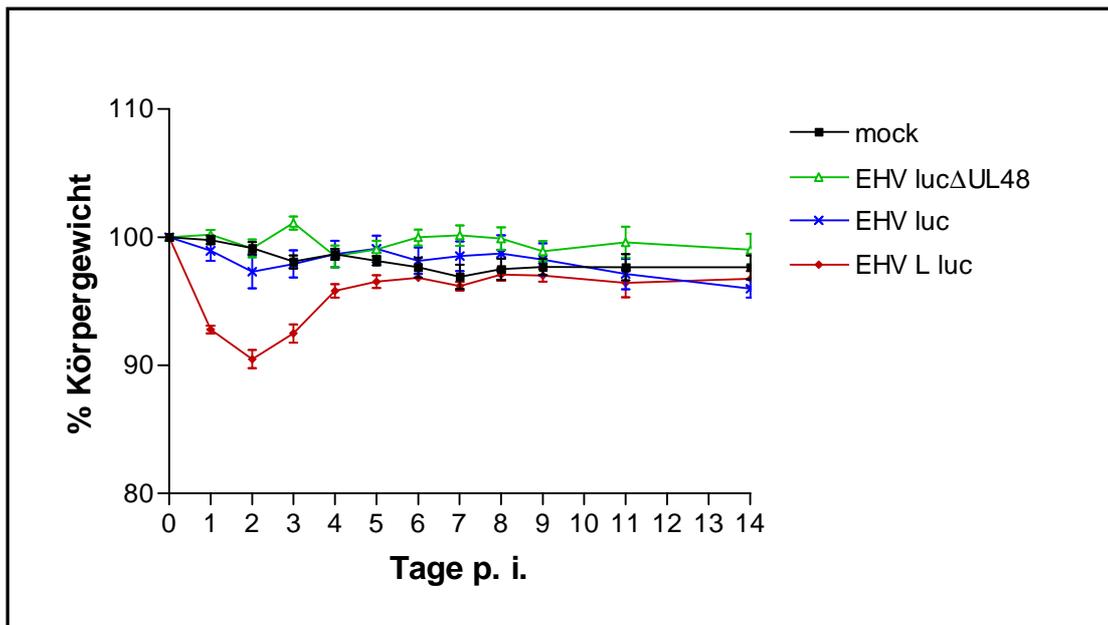
Diese Ergebnisse zeigen, dass es mit Hilfe der RED-Rekombination möglich ist, gezielt rekombinante EHV-1-Vektoren herzustellen. Dadurch können Transgene in Zellen eingebracht werden, die unterschiedliche Funktionen erfüllen. Hier wurden die für HIV-Immunogene codierenden Gene *gpn* bzw. *gp120* eingebracht und Reporterviren hergestellt, die für eine Luciferase codieren. Die rekombinanten EHV-1-Vektoren zeigen in infizierten Zellen eine gute Expression ihrer Transgene, die jedoch auch von der Qualität des Transgens selbst beeinflusst wird.

## **C.2 Die hoch attenuierten EHV-1-Vektoren weisen ein gutes Sicherheitsprofil auf**

Für eine Anwendung der Vektoren in lebenden Organismen ist es wichtig auszuschließen, dass Viren sich unkontrolliert vermehren oder unerwünschte Organe bzw. Zellen wie z. B. Nerven- oder Keimzellen infizieren. So ist es trotz der Apathogenität von EHV-1 für die Verwendung im Menschen essentiell, jedes potentielle Risiko von Gewebeschädigung oder –veränderung zu klären. Zur Untersuchung der Sicherheit des Vektorsystems wurden deshalb die Pathogenität und Biodistribution im Tiermodell untersucht.

### **C.2.1 Die attenuierten EHV-1-Vektoren sind apathogen im Mausmodell**

Obwohl bisher keine EHV-1 Infektionen bei Menschen dokumentiert wurden, erwiesen sich nach einer experimentellen Infektion nicht-attenuierte Stämme in Mäusen durchaus als pathogen (Awan *et al.*, 1990; Field *et al.*, 1992). Anzeichen dafür sind klinische Symptome wie auffällig träges Verhalten, struppiges Fell oder der Verlust von Körpergewicht. Je stärker die Tiere durch das Virus beeinträchtigt werden, desto mehr Körpergewicht verlieren sie. Deshalb wird dieser Parameter als Maß der Pathogenität verwendet (Osterrieder *et al.*, 1995; van Woensel *et al.*, 1995c). Zur Untersuchung der Pathogenität des auf *RacH* basierten EHV-luc und des replikationsdefizienten EHV-luc- $\Delta$ UL48 wurde je sechs Balb/c Mäusen die in Immunisierungsstudien eingesetzte Maximaldosis von  $10^6$  Pfu intranasal appliziert. Zum Vergleich wurde einer Gruppe das für Mäuse pathogene EVH-L-luc (basierend auf dem *RacL*-Stamm) verabreicht. Um tageszeitliche Schwankungen auszuschließen, wurden die Balb/c Mäuse täglich zur selben Zeit über 14 Tage hinweg gewogen (Abb. C-5).



**Abb. C-5) Graphische Darstellung des relativen durchschnittlichen Körpergewichts der EHV-luc-ΔUL48, EHV-luc und EHV-L-luc infizierten Balb/c-Gruppen.**

6 Balb/c Mäuse je Gruppe wurden mit je  $10^6$  Pfu EHV-luc-ΔUL48, EHV-luc oder EHV-L-luc intranasal infiziert. Als Negativ-Kontrolle dienten mit PBS inokulierte Balb/c Mäuse (mock). Das Gewicht am Tag der Infektion wurde gleich 100 % gesetzt und zu den darauffolgenden Messdaten in Relation gesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert jeder Gruppe (Symbol) an jedem Tag.

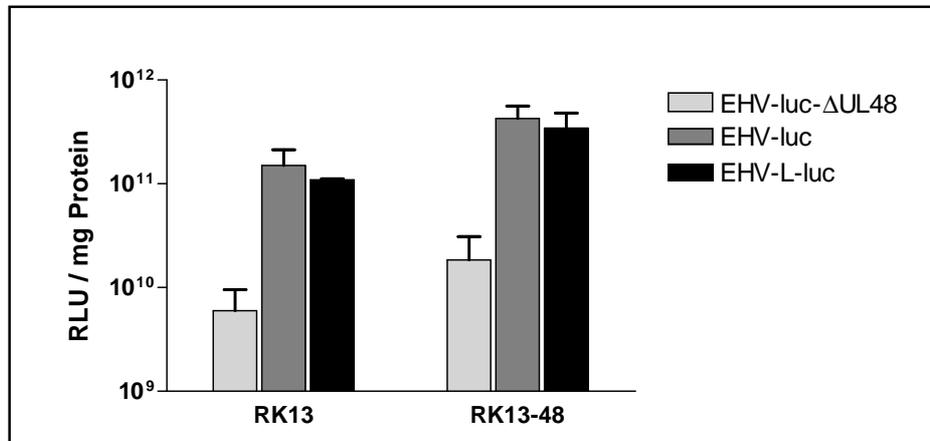
Nach Verabreichung von EHV-L-luc war eine deutliche Gewichtsabnahme festzustellen, deren Maximum von etwa 10 % nach zwei Tagen zu beobachten war. In dieser Zeit wiesen die Tiere zudem struppiges Fell auf und verhielten sich im Allgemeinen etwas träge. Fünf bis sechs Tage p. i. hatten sie sich wieder regeneriert. Die Mäuse, die mit EHV-luc bzw. EHV-luc-ΔUL48 infiziert worden waren, verloren dagegen kein Gewicht und zeigten keinerlei Krankheitssymptome. Rach-basierte Viren haben folglich aufgrund ihrer Attenuierung ihre Pathogenität in Balb/c Mäuse verloren.

## C.2.2 Die Analyse der Biodistribution zeigt die begrenzte Ausbreitung der EHV-1-Vektoren im Organismus

### C.2.2.1 *In vivo Imaging* erlaubt die Verfolgung der Transgen-Expression in der Maus über einen längeren Zeitraum

Ein wichtiger Aspekt zur Einschätzung des Risikopotentials ist die Analyse der Biodistribution. Hierfür wurden rekombinante Vektoren hergestellt, die ein Luciferase-Gen tragen. Das Enzym Luciferase dient der Lichterzeugung und kommt in unterschiedlichsten Organismen vor. Luciferase aus dem Glühwürmchen *Photinus pyralis*, wie sie hier verwendet wurde, oxidiert D-Luciferin unter Verbrauch von ATP. Dabei wird Licht erzeugt, das in der Natur dem Zweck der Paarungsfindung dient.

Das für Säugerzellen codonoptimierte Luciferase-Gen (Promega, Mannheim) wurde über Rekombination in die unterschiedlichen EHV-1-Vektoren eingebracht und die Funktionalität der Luciferase mit Hilfe eines Luciferase-Assays (Promega, Mannheim) überprüft (Abb. C-6).



**Abb. C-6) Luciferase Aktivität von Zelllysaten aus infizierten RK13 bzw. RK13-48 Zellen (m.o.i. 0,5; 16 h p. i.).**

Es wurde die Lichtemission von Zelllysaten nach Zugabe von Substrat für 10 sec gemessen und in Relation zur eingesetzten Proteinmenge gesetzt. Gezeigt ist der Mittelwert aus Doppelansätzen. Der Hintergrund, ermittelt aus EHV bzw. EHV-L infizierten Zellen, wurde jeweils abgezogen.

Sowohl EHV-luc- $\Delta$ UL48, EHV-luc als auch EHV-L-luc infizierte Zellen exprimierten funktionelle Luciferase *in vitro*. Die UL48-deletierte Vektor-Variante zeigte eine verringerte Luciferase-Aktivität aufgrund der beeinträchtigten Replikationsfähigkeit. Die Verwendung der transkomplementierenden Zelllinie RK13-48 steigerte zwar die induzierte Transgen-Menge, konnte den Nachteil jedoch nicht kompensieren (s. auch C.1.4 und C.1.5).

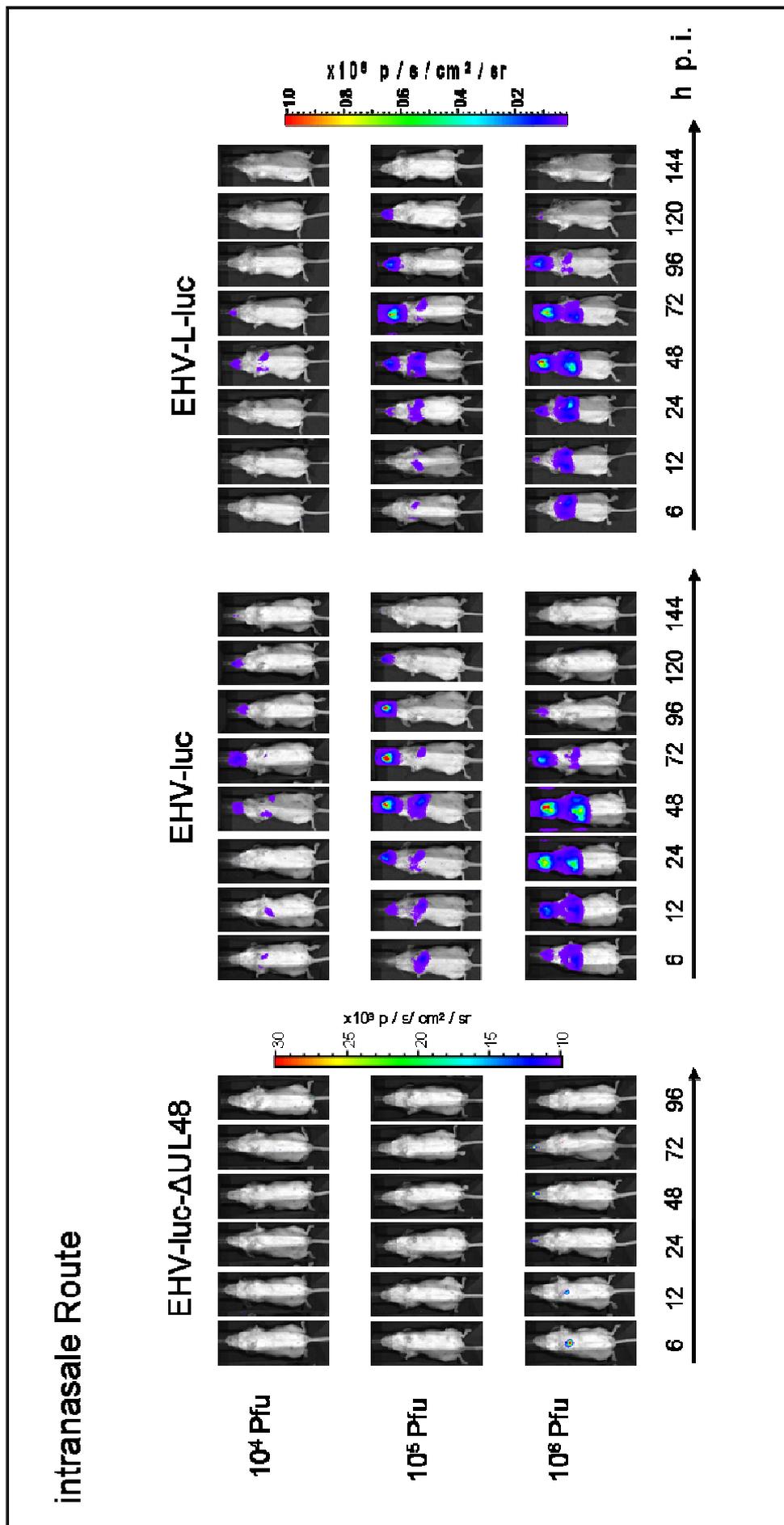
Mit Hilfe der Luciferase codierenden EHV-1-Vektoren war es möglich, die Biodistribution in Mäusen *in vivo* zu verfolgen. Nach Verabreichung gelangen die Viren in die Zellen der Zielgewebe der Maus und ermöglichen dort die konstitutive Expression der Luciferase mit Hilfe des vorgelagerten CMV-Promotors. Appliziert man dem Tier das Substrat Luciferin, so wird in den transduzierten Zellen Licht erzeugt (Mechanismus s. Abb. B-2), welches mit Hilfe einer CCD-Kamera aufgenommen werden kann. Diese hochempfindliche Kamera erkennt Signale einzelner Photonen und erlaubt somit eine Quantifizierung des Lichtflusses. Da es sich dabei um einen nicht-invasiven Vorgang handelt, ermöglicht es diese Methode, die Verbreitung des viralen Vektors im lebenden Tier über einen längeren Zeitraum *in vivo* zu verfolgen. Nach Überlagerung mit einem Lichtbild kann anschließend die Verteilung der Transgen-Expression in der Maus bestimmt werden und somit die Distribution des Vektors.

Für die Biodistributionsanalyse der EHV-1-Vektoren wurden jeweils drei Tiere pro Gruppe intranasal bzw. intramuskulär mit EHV-luc, EHV-luc- $\Delta$ UL48 oder EHV-L-luc infiziert. Die Gruppen erhielten unterschiedliche Mengen ( $10^4$ ,  $10^5$  oder  $10^6$  Pfu) an viralen Vektoren, um

eine Steigerungsfähigkeit der Transgen-Expression bzw. eine eventuelle Dosisabhängigkeit bezüglich der Zielgewebe zu sehen (Abb. C-7 und Abb. C-8).

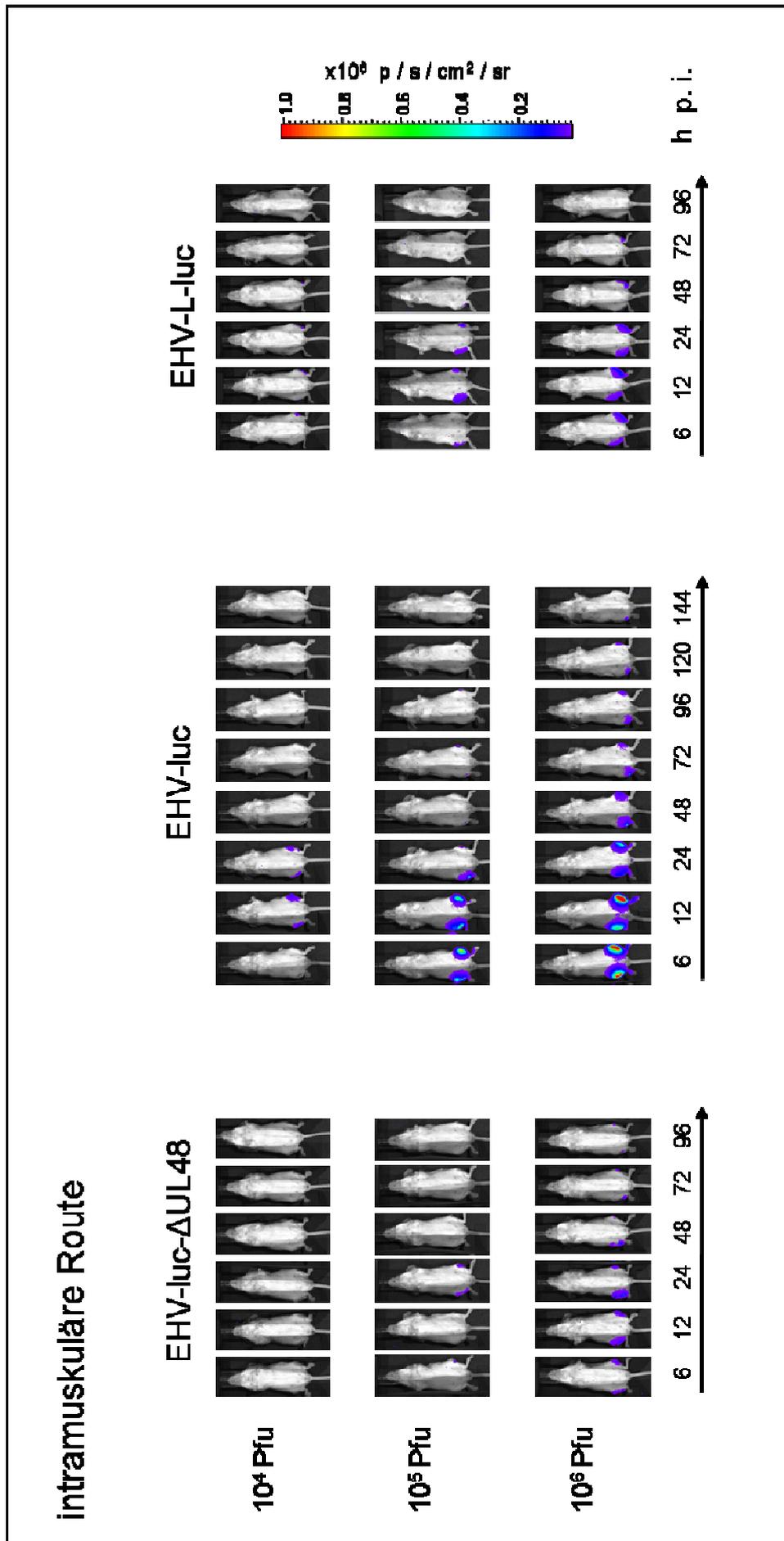
Die Distribution der Viren war abhängig von der Applikationsroute. Intranasal verabreichte EHV-1 (Abb. C-7) waren ausschließlich im Bereich des respiratorischen Trakts nachzuweisen. Zuerst erfolgte die Infektion der Lunge, später (je nach eingesetzter Infektionsdosis) kam es zur Transgen-Expression in der Nase. Dabei zeigten die EHV-luc-Vektoren trotz der starken Attenuierung keine Beeinträchtigung der Transgen-Expression im Vergleich zu EHV-L-luc. Bereits ab sechs Stunden nach der Infektion konnte durch beide Viren für die Dauer von etwa sechs Tage Luciferase-Expression in der Nase und der Lunge induziert werden, wobei die maximale Luciferase-Aktivität etwa nach 48 Stunden erreicht war. Die Erhöhung der Dosis bis zu  $10^6$  Pfu führte jeweils zu einer Steigerung der Transgen-Expression, jedoch nicht zu einer Ausweitung der Vektoren in andere Gewebe.

Die weitere Attenuierung durch die Deletion des UL48 zeigte dagegen großen Einfluss auf die Biodistribution. So konnte in infizierten Balb/c Mäusen erst ab einer Dosis von  $10^6$  Pfu Luciferase-Aktivität beobachtet werden. Sie lag jedoch weit unter dem Niveau der UL48-enthaltenden Viren und war bereits nach drei Tagen nicht mehr nachweisbar. Verabreichte man das Virus intramuskulär, war die Transgen-Expression auf den Muskel, in den injiziert wurde, beschränkt (Abb. C-8). Die maximale Biolumineszenz war in diesem Fall zwölf Stunden nach Infektion nachweisbar. Auch über die intramuskuläre Route war sie für die Vektoren ohne UL48 stark reduziert. Auffallend ist, dass hier das mauspathogene EHV-L eine deutlich geringere Transgen-Expression als das hoch attenuierte EHV-luc verursachte. Das Virus verbleibt also in dem Gewebe, in das es appliziert wurde, wobei sich der Zeitpunkt der maximalen Luciferase-Aktivität unterscheidet (intranasal: 48 h p. i.; intramuskulär: 12 h p. i.). Die beste Transgen-Expression vermittelte für beide Applikationsrouten jeweils EHV-luc. Eine intranasale Verabreichung von EHV-L-luc ergab eine ähnlich gute Transgen-Expression in Bezug auf Dauer und Intensität. Interessanterweise war die Transgen-Expression nach einer intramuskulären Applikation jedoch vergleichsweise viel geringer. Da hauptsächlich das respiratorische Gewebe von Pferden dem natürlichen Tropismus von EHV-1 entspricht, nicht jedoch die Muskelzellen, scheint dieser Phänotyp auch für die Maus plausibel. Die verbesserte Infektion der Muskelzellen durch EHV-luc muss also durch eine (zufällig) günstige Veränderung des EHV-Stamms in Bezug auf die Infektion von Mauszellen während der Attenuierung durch das Passagieren auf den Schweinenierenzellen zustande gekommen sein. Eine weitere Attenuierung durch die Deletion des UL48 führte zu Vektoren, die in ihrer Replikationsfähigkeit jedoch so stark limitiert sind, dass sie sowohl nach einer intramuskulären als auch nach einer intranasalen Verabreichung zu einer sehr reduzierten Transgen-Expression in der Maus führen.



**Abb. C-7) *In vivo* Imaging intranasal immunisierter Balb/c Mäuse**

Dargestellt sind mit Biolumineszenzaufnahmen überlagerte Lichtbilder von jeweils einer repräsentativen Maus pro Gruppe, jeweils immunisiert mit der angegebenen Dosis an EHV-luc- $\Delta$ UL48, EHV-luc oder EHV-L-luc. Die Lumineszenz wurde zu den angegebenen Zeitpunkten fünf min nach intraperitonealer Luciferin Applikation über zehn Minuten hinweg gemessen. Aufgrund der geringen Luciferase-Aktivität wurde für die EHV-luc- $\Delta$ UL48 immunisierten Mäuse ein sensitiverer Maßstab verwendet. Als Negativkontrolle dienten mit PBS inokulierte Mäuse (nicht gezeigt).

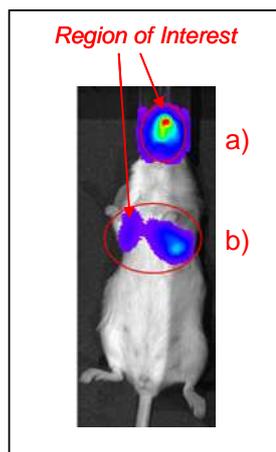


**Abb. C-8) In vivo Imaging intramuskulär immunisierter Balb/c Mäuse**  
 Dargestellt sind mit Biolumineszenzaufnahmen überlagerte Lichtbilder von jeweils einer repräsentativen Maus pro Gruppe, jeweils immunisiert mit der angegebenen Dosis an EHV-luc-ΔUL48, EHV-luc oder EHV-L-luc. Die Lumineszenz wurde zu den angegebenen Zeitpunkten fünf min nach intraperitonealer Luciferin Applikation über zehn Minuten hinweg gemessen. Als Negativkontrolle dienten mit PBS inokulierte Mäuse (nicht gezeigt).

Bei einer Übertragung dieser Ergebnisse auf das humane System würde dies bedeuten, dass die attenuierten EHV-1-Vektoren sowohl für eine Verabreichung von genetischem Material über Inhalation als auch durch eine Injektion in den Muskel einsetzbar wären, abhängig davon welches Zielgewebe transduziert werden soll.

### C.2.2.2 Die Höhe der Transgen-Expression hängt vom Grad der Attenuierung des verwendeten Vektors und der Infektionsroute ab

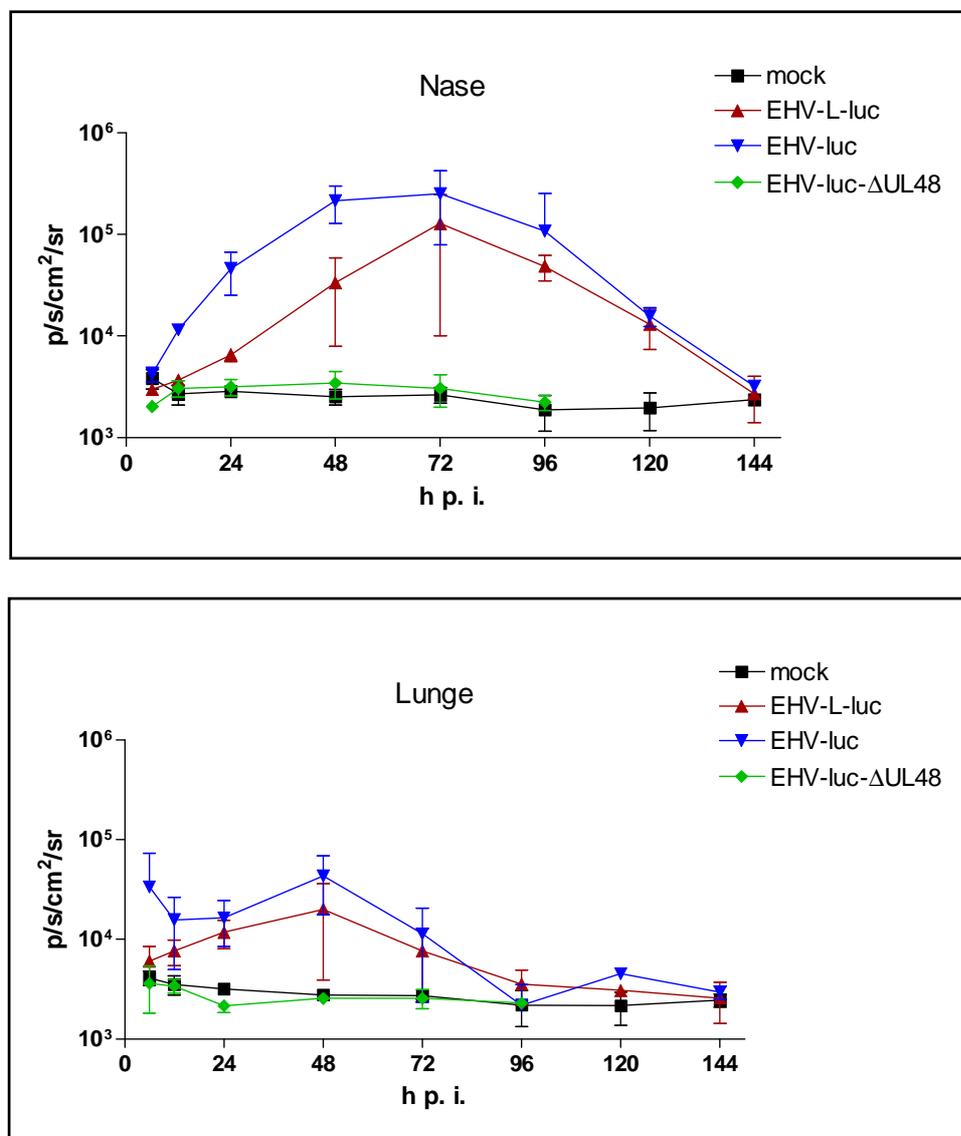
In Immunisierungsstudien im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass das EHV-1-Vektorsystem Potential als HIV-Vakzine hat, da es gute Transgen-spezifische zelluläre und humorale Immunantworten induzieren konnte. Diese waren für die UL48-haltigen und UL48-deletierten Varianten trotz einer zehnfach höher eingesetzten Dosis an EHV-gag- $\Delta$ UL48 in ihrer Stärke jedoch sehr unterschiedlich (Hofmann-Sieber et al., 2010). Die Analyse der EHV-1-Vektoren mit Hilfe der Luciferase im *in vivo Imager* erlaubte Aufschluss über die räumliche Verfügbarkeit an Transgen und damit des Immunogens (C.2.2.1.), gestattete darüber hinaus aber auch eine relative Quantifizierung der Biolumineszenzaktivität mit Hilfe der *Living Image 2.6 Software* (Xenogen, Alameda, USA). Der Vergleich von Balb/c Mäusen, die mit den entsprechenden Dosen der Immunisierungsstudie an EHV-luc ( $10^5$  Pfu) und EHV-luc- $\Delta$ UL48 ( $10^6$  Pfu) intranasal infiziert worden waren, kann also das unterschiedliche immunogene Potential der Vektor-Varianten aufgrund von unterschiedlich verfügbaren Mengen Immunogen aufzeigen. Hierfür wurden *Regions of Interest* im Bereich der Nase und der Lunge erstellt (Abb. C-9), für die jeweils der durchschnittliche Lichtfluss der 10minütigen Messung für jede Maus bestimmt wurde (s. Abb. C-10). Als Kontrollgruppen wurden mit EHV-L-luc und mit PBS behandelte Mäuse verwendet.



**Abb. C-9) Festlegung der jeweiligen *Region of Interest* (ROI) für Nase und Lunge an einem Beispielbild**

Für die angegebenen Flächen innerhalb der ROI a) Nase und b) Lunge wurde der durchschnittliche Photonenfluss mit Hilfe der *Living Image 2.6 Software* bestimmt.

Die Quantifizierung fasst die in Abb. C-8 bereits ersichtlichen Unterschiede in der Transgen-Expression zwischen den mit unterschiedlich attenuierten EHV-1-Varianten infizierten Mäusen zusammen. Dabei lag die durch EHV-luc induzierte Luciferase-Aktivität im Mittel sogar über der durch EHV-L-luc hervorgerufenen. Das Maximum der Lumineszenz war in den Lungen zwei Tage p. i. und in den Nasen drei Tage p. i. erreicht. Insgesamt hielt die Transgen-Expression in den Lungen drei Tage, in den Nasen sechs Tage an. Dagegen unterschied sich die Luciferase-Aktivität der EHV-luc- $\Delta$ UL48 infizierten Mäuse nicht von dem Hintergrundsignal (kosmische Strahlung), welches dem Signal der mit PBS immunisierten Mäusen entspricht. Trotzdem zeigte sich in Immunisierungsstudien, dass UL48-defiziente Viren in der Lage sind, Transgen-spezifische humorale Immunantworten zu induzieren (Hofmann-Sieber et al., 2010) und s. C.3).



**Abb. C-10) Durchschnittlicher Photonenfluss in Nase und Lunge von EHV-luc, EHV-L-luc oder EHV-luc- $\Delta$ UL48 infizierten Mäusen über die Zeit.**

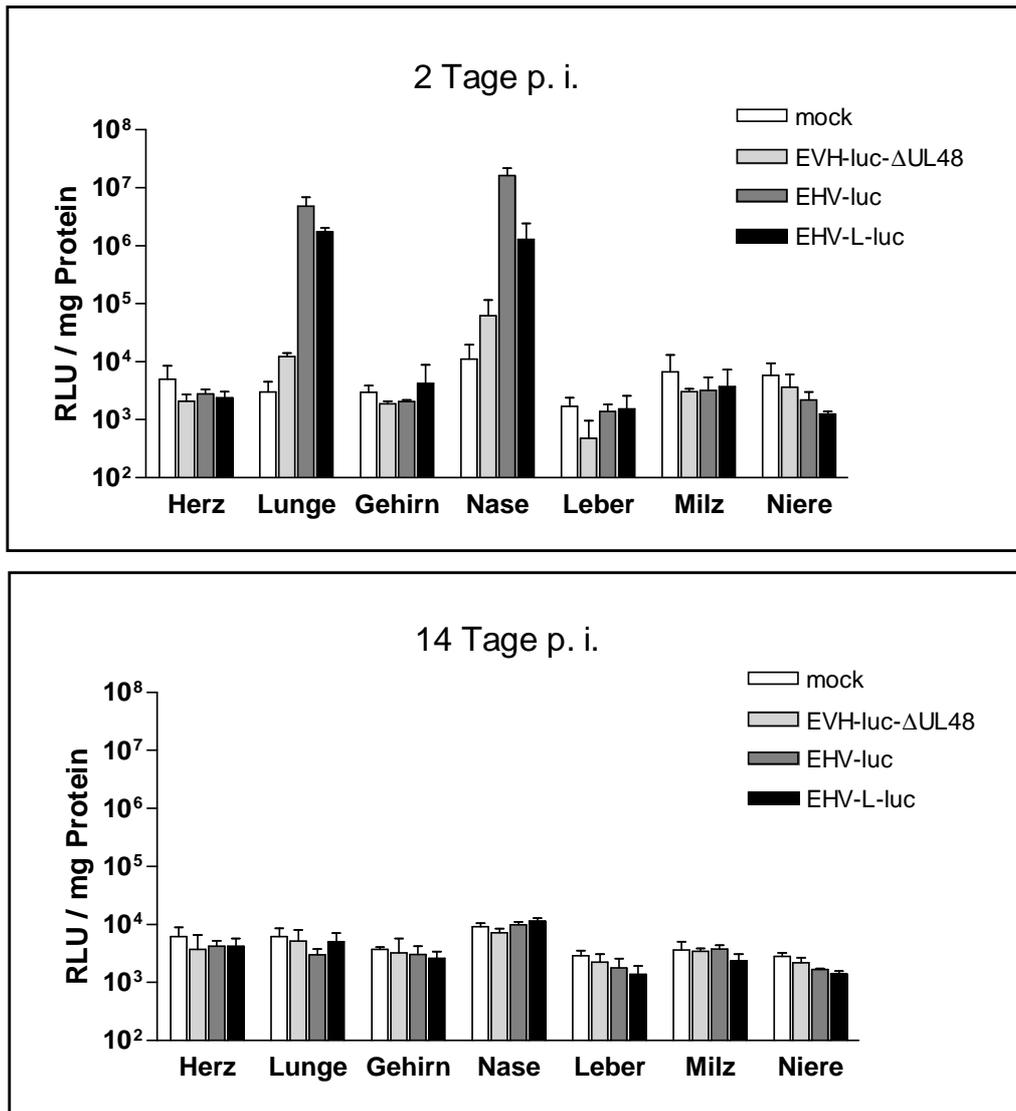
Der Photonenfluss von je 3 Mäusen wurde gleichzeitig 5 Minuten nach Luciferin Applikation über 10 Minuten hinweg gemessen. Angegeben ist jeweils der Mittelwert jeder Gruppe zum angegebenen

Zeitpunkt (Symbol). Als Infektionsdosen wurden für EHV-luc und EHV-L-luc  $10^5$  Pfu und für EHV-luc- $\Delta$ UL48  $10^6$  Pfu verwendet. Als Negativkontrolle dienten mit PBS behandelte Mäuse.

### **C.2.2.3 Die Transgen-Expression in Gewebehomogenaten lässt sich nur im respiratorischen Trakt nachweisen**

*In vivo Imaging* ist eine effektive Methode um die Distribution der EH-viralen Vektoren zu verfolgen. Es erlaubt jedoch ausschließlich zweidimensionale Bilder, wodurch eine exakte Lokalisation der Lumineszenzquelle in der Maus nicht möglich ist. Zudem kommt es durch Streulichteffekte und Absorption beim Durchdringen des Lichts durch Gewebe zum Verlust von Photonen, weshalb schwächere Lichtsignale (z. B. in tiefer gelegenen Geweben oder einzelnen Zellen) mit Hilfe dieser Methode nicht sicher nachgewiesen werden können.

Zur Verifizierung der *in vivo* Biolumineszenz-Daten wurden deshalb je sechs Mäuse mit  $10^6$  Pfu EHV-luc, EHV-luc- $\Delta$ UL48 oder EHV-L-luc bzw. PBS (mock) immunisiert. 48 Stunden bzw. zwei Wochen p. i., also bei maximaler und abgeklungener Transgen-Expression, wurden jeweils drei Mäuse getötet und Gewebe entnommen. Diese wurden homogenisiert und anschließend mit Hilfe eines Luciferase-Assays (Promega, Mannheim) auf Luciferase-Aktivität überprüft. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration der Homogenate nach Bradford (B.2.3.2) wurde die Aktivität der Luciferase pro mg Protein angegeben (Abb. C-11) Zwei Tage p. i. konnte ausschließlich in Homogenaten der Nase und der Lunge Luciferase-Aktivität gezeigt werden. Dabei ergab sich für die EHV-luc infizierten Gewebe die stärkste Transgen-Expression, gefolgt von EHV-L-luc und in wesentlich geringerem Maß von EHV-luc- $\Delta$ UL48. Zwei Wochen nach der Immunisierung konnte in keinem der untersuchten Gewebe mehr Luciferase-Aktivität nachgewiesen werden. Dies bestätigt die durch den *in vivo Imager* gewonnenen Daten sowohl in Hinblick auf die Distribution der viralen Vektoren nach einer intranasalen Verabreichung als auch auf die unterschiedliche Höhe der Transgen-Expression.



**Abb. C-11) Luciferase-Assay von Gewebehomogenaten aus immunisierten Balb/c Mäusen** 2 Tage bzw. 14 Tage nach Infektion (Dosis  $10^6$  Pfu) wurden Herz, Lunge, Gehirn, Nase, Leber, Milz und Nieren entnommen und homogenisiert. Nach Zugabe von Substrat erfolgte die Messung der Lumineszenz für 10 sec in relativen Licht Einheiten (RLU). Diese wurde anschließend zur eingesetzten Proteinmenge in Relation gesetzt. Als Negativkontrolle fungierten Gewebe aus nicht-infizierten Mäusen (mock). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Messwerte von Geweben aus drei Balb/c Mäusen.

#### C.2.2.4 Die Distribution der EH-viralen DNA korreliert mit der Transgen-Expression

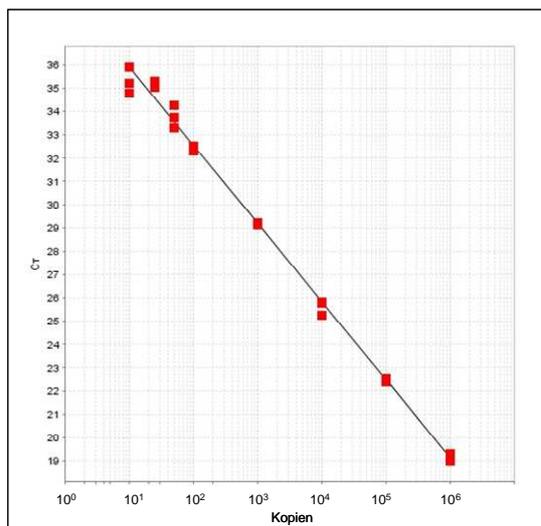
Durch den Nachweis von Lichtemission, erzeugt durch die Luciferase, kann indirekt festgestellt werden, in welchen Geweben Transgene von EHV-1-Vektoren exprimiert werden. Dies lässt jedoch offen, ob und gegebenenfalls wo virale DNA vorhanden ist, deren Luciferase-Gen etwa durch Mutationen oder *Silencing* funktionsunfähig wurde. Deshalb wurden Gewebe aus immunisierten Mäusen mit Hilfe einer quantitativen *Real-Time-Polymerase-Chain-Reaction* (qRT-PCR) direkt auf virale DNA hin untersucht.

Eine der sensitivsten Methoden um DNA in einer Probe nachzuweisen, ist die TaqMan-RT-PCR. Sie beruht auf dem Einsatz spezifischer DNA-Sonden während der PCR, die am 3'- und 5'-Ende jeweils mit einem Fluoreszenzfarbstoff und einem passenden Quencher markiert sind. Die etwa 20 Basenpaar große Sonde ist so konzipiert, dass sie spezifisch an die Sequenz der zu amplifizierenden DNA bindet. Während der Elongationsphase hydrolysiert die Taq-Polymerase aufgrund ihrer 5'-3' Exonukleaseaktivität die gebundene Sonde. Dadurch wird das Fluorophor vom Quencher getrennt und nach Anregung mit Licht der entsprechenden Wellenlänge kann die Höhe des Fluoreszenzsignals als Maß der amplifizierten DNA in Echtzeit gemessen werden. Nach Erstellen einer Standardkurve unter Verwendung von definierten Mengen an Ziel-DNA kann dann eine Quantifizierung der Zielsequenz in einer unbekannt Probe vorgenommen werden.

Für den Nachweis von EHV-1-DNA wurden Oligos und Sonde für das essentielle gpD-Gen und als interne Kontrolle für das GAPDH-Gen von Balb/c Mäusen mit der *Primer Express Software 3.0* (ABI, Foster City, USA) entworfen.

#### **C.2.2.4.1 Zum Nachweis der viralen DNA wurde eine quantitative RT-PCR etabliert**

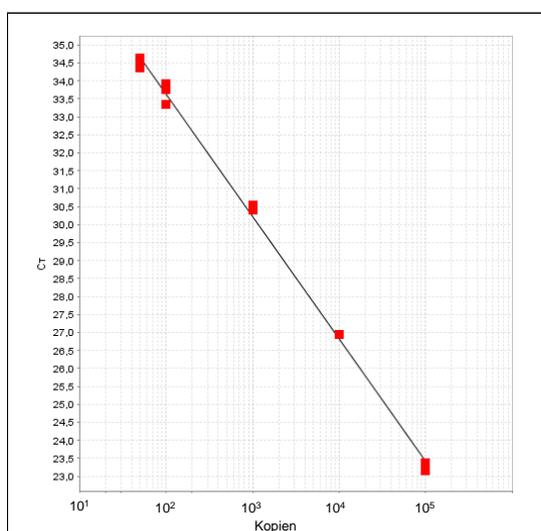
Wichtige Kriterien für eine qRT-PCR sind die Effektivität und die Nachweisgrenze der Reaktion. Die Effektivität wurde durch Erstellen einer Standardkurve ermittelt. Hierfür wurde der Zielsequenzbereich des EHV-gpD-Gens in einen PCR-Klonierungs-Vektor subkloniert. Das resultierende Plasmid pSC-A-gpD (49/50) diente zur Stabilisierung des nur 79 Basenpaar großen DNA-Fragments und erleichterte die Amplifikation der DNA sowie das Erstellen von Verdünnungen. Diese wurden so eingestellt, dass sie eine definierte Kopienzahl der gpD-Sequenz pro  $\mu\text{l}$  aufwiesen. Davon wurde je dreimal  $1 \mu\text{l}$  als Ziel-DNA in eine qRT-PCR eingesetzt, die zusätzlich je 10 ng genomischer DNA aus Balb/c-Gewebe enthielt, um den Einfluss der Proben-DNA auf die Effizienz der Reaktion zu berücksichtigen. Die Standardkurve wurde durch die *StepOne Software 2.0* (ABI, Foster City, USA) erstellt, indem die  $C_T$ -Werte gegen die eingesetzte Kopienzahl logarithmisch aufgetragen wurden (Abb.C-12). Der  $C_T$ -Wert ist definiert als die Zykluszahl, bei der zum ersten Mal in der PCR ein Fluoreszenzsignal gemessen wird, das sich eindeutig vom Hintergrund abhebt und hängt von der eingesetzten Ziel-DNA-Menge ab. Je mehr von dieser eingesetzt wurde, desto früher kann ein eindeutiges Signal gemessen werden und desto kleiner ist dem zufolge der  $C_T$ -Wert. Idealerweise erfolgt pro Zyklus einer PCR eine Verdopplung der Ziel-DNA. In diesem Fall beträgt die Steigung der Standardgeraden 3,32. Um anzugeben inwieweit die gewählten Reaktionsbedingungen vom Idealfall abweichen, gibt man die Effizienz der Reaktion an. Die Effizienz (E) wird über  $E = 10^{(-1/a)}$  berechnet, wobei a für die Steigung der Standardgeraden steht.



**Abb. C-12) Standardgerade der Real-Time-PCR für das gpD-Gen von EHV-1**

Als Ziel-DNA dienten jeweils 10, 25, 50, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> und 10<sup>6</sup> Kopien von pSC-A-gpD (49/50). Jede Verdünnung wurde dreimal in eine PCR eingesetzt unter jeweiliger Zugabe von 10 ng genomischer DNA aus Balb/c-Gewebe und logarithmisch gegen den ermittelten C<sub>T</sub>-Wert aufgetragen (■). Steigung: 3,37; Effizienz: 98 % (R<sup>2</sup>: 0,998 )

Die Nachweisgrenze lag zwischen 25 und 50 Kopien, da höhere Verdünnungen einen C<sub>T</sub>-Wert im Bereich der Negativkontrolle ergaben (nicht gezeigt) und generell C<sub>T</sub>-Werte größer als 35 nicht zuverlässig positiv gewertet werden können. Somit ergab sich für die Standardgerade eine Steigung von -3,37 und damit eine Effizienz von 98 % (Korrelationskoeffizient R<sup>2</sup>: 0,998) (Abb. C-13A). Als Kontrolle für die Nutzbarkeit der isolierten DNA als Ziel-DNA für eine qRT-PCR wurde das genomisch vorliegende GAPDH-Gen verwendet. Die Standardgerade wurde entsprechend erstellt und eine Effizienz von 96,8 % ermittelt (R<sup>2</sup>: 0,997) (Abb. C-13).



**Abb. 13) Standardgerade der Real-Time-PCR für das GAPDH-Gen aus Balb/c.**

Als Ziel-DNA dienten jeweils 25, 50, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> und 10<sup>5</sup> Kopien von pSC-A-GAPDH. Jede Verdünnung wurde dreimal in eine PCR eingesetzt und logarithmisch gegen den dazugehörige C<sub>T</sub>-Wert aufgetragen (■). Steigung: 3,4; Effizienz: 96,8 % (R<sup>2</sup>: 0,997)

#### **C.2.2.4.2 Nach intranasaler Applikation von EHV-1-Vektoren kann virale DNA zunächst in der Lunge und Nase der infizierten Tiere nachgewiesen werden, bevor das Virus wieder eliminiert wird**

Für die Analyse der Distribution von EHV-DNA wurden Balb/c Mäuse mit 10<sup>6</sup> Pfu der unterschiedlich attenuierten Varianten intranasal infiziert. 2 und 14 Tage p. i. wurde den Mäusen

Blut und unterschiedliches Gewebe entnommen und daraus genomische und gegebenenfalls virale DNA gewonnen. 10 ng dieser Ziel-DNA wurden jeweils dreimal in eine qRT-PCR zum Nachweis des EHV-gpD-Gens eingesetzt. Die Amplifikation des Balb/c GAPDH-Gens diente als Kontrolle zum Ausschluss inhibitorischer Faktoren in der Ausgangsprobe.

Eine Wertung der PCR erfolgte, wenn die Positiv-Kontrolle (1000 Kopien pSC-A gpD), die bei jedem PCR-Lauf in zwei Ansätzen eingesetzt wurde, positiv war. Zusätzlich musste jede DNA-Probe eine eindeutige GAPDH-Amplifikation aufweisen.

Für acht von zwölf aufgereinigten DNA-Proben aus Blut war eine DNA Amplifikation im ersten Versuch nicht möglich. Es ist bekannt, dass Bestandteile von Blutproben wie Hämoglobin, IgGs oder zugesetztes Heparin eine PCR-Reaktion inhibieren können (Izraeli et al., 1991; Al Soud & Radstrom, 2001; Al Soud et al., 2000). Deshalb wurden die entsprechenden DNA-Proben einer zweiten Aufreinigung mit dem *QIAamp DNA* Kit unterzogen, um die Rückstände inhibitorischer Faktoren zu entfernen. Aufgrund des teilweise sehr geringen Probenmaterials konnte jedoch nur zwei von drei Mäusen pro Gruppe untersucht werden.

Maus	mock			EHV-luc-ΔUL48			EHV-luc			EHV-L-luc		
	1	2	3	10	11	12	19	20	21	28	29	30
Blut	n	n	n	n	n	n	n	> 35	n	n	n	> 35
Herz	n	> 35	> 35	> 35	n	n	n	n	n	> 35	> 35	n
Lunge	> 35	n	n	34,9	32,8	34	24,98	25,4	26,5	27,22	28	27,5
Gehirn	> 35	n	> 35	> 35	n	n	> 35	n	n	n	n	n
Ganglion trig.	> 35	n	n	n	n	> 35	-	n	n	n	> 35	n
Nase	n	n	> 35	33,58	33,1	34,5	30,09	31,8	29,9	31,82	29,9	30,1
Leber	n	> 35	> 35	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Milz	> 35	> 35	n	> 35	n	n	> 35	n	n	n	n	n
Nieren	> 35	> 35	> 35	> 35	n	n	n	n	n	n	n	n
Ovarien	n	> 35	> 35	n	n	n	n	n	> 35	n	n	n
Lymphknoten	n	> 35	> 35	n	n	n	n	> 35	> 35	n	n	n

**Tab. C-2) C<sub>T</sub>-Werte der qRT-PCR-Analyse zum Nachweis von gpD in Gewebe infizierter Balb/c Mäuse 2 Tage p. i..**

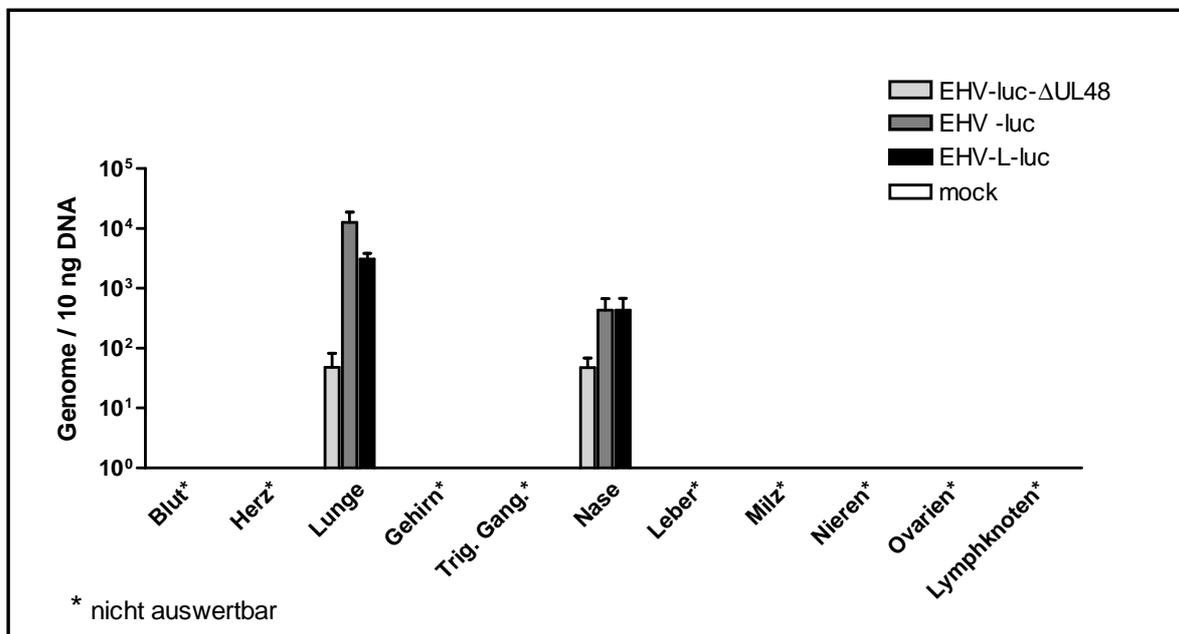
Angegeben sind die mittleren C<sub>T</sub>-Werte aus je 3 PCR-Reaktionen. Dafür wurden jeweils 10 ng DNA (isoliert aus den angegebenen Geweben) eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten Gewebe aus PBS immunisierten Mäusen (mock). C<sub>T</sub>-Werte über 35 gelten als unspezifisch und wurden als negativ gewertet. n = nicht detektierbar; grau hinterlegt = positive PCR-Reaktion; Ganglion trig. = Ganglion trigeminale

Wie die Analyse der Transgen-Expression in Mausgeweben erbrachte auch der Nachweis viraler DNA ausschließlich im Gewebe der Nase und der Lunge ein positives Ergebnis (vgl. Abb. C-12).

Bereits zwei Wochen nach einer Infektion mit EHV-luc- $\Delta$ UL48, EHV-luc oder EHV-L-luc konnte keine virale DNA mehr detektiert werden, was auf eine vollständige Eliminierung der Viren aus dem Organismus schließen lässt.

#### C.2.2.4.3 Die Quantifizierung der viralen DNA zeigt eine deutlich schwächere Replikation des EHV- $\Delta$ UL48 Virus verglichen mit EHV oder EHV-L

Anhand der erstellten Standardkurve (s. C.2.2.4.1) wurde die EH-virale DNA in den positiv getesteten Geweben (Nase und Lunge) quantifiziert. Dabei wurde die Anzahl der gpD-Gene in der eingesetzten DNA berechnet. Da das gpD-Gen ein essentielles Gen für EHV-1 ist und in einfacher Kopie im viralen Genom vorliegt, wurde eine Gen-Kopie einem Virus-Genom gleichgesetzt (Abb. C-14).



**Abb. C-14) EHV-1-Genome je 10 ng DNA aus Geweben immunisierter Balb/c Mäuse 2 Tage p. i.** Mit Hilfe der Geradengleichung der Standardgeraden (s. Abb. C-13A) wurde die gpD-Kopienzahl pro 10 ng eingesetzter DNA aus den durchschnittlichen  $C_T$ -Werten (Tab. C-2) von Lunge und Nase berechnet. Die ermittelte Kopienzahl wurde der Anzahl an EHV-Genomen gleichgesetzt und der Mittelwert von 3 Organen je Gruppe von 3 immunisierten Balb/c Mäusen (EHV-luc- $\Delta$ UL48, EHV-luc, EHV-L-luc) dargestellt.

Es zeigte sich, dass durchschnittlich etwa 260-fach weniger EHV-luc- $\Delta$ UL48 ( $5 \times 10^1$  Genome/10 ng DNA) in der Lunge vorhanden war als EHV-luc ( $1,3 \times 10^4$  Genome/10 ng DNA) und ca. 60-fach weniger als EHV-L-luc ( $3,1 \times 10^3$  Genome/10 ng DNA). In der Nase war der Unterschied deutlich geringer. Dort wurde neunmal weniger EHV-luc- $\Delta$ UL48 ( $5 \times 10^1$  Genome/10 ng DNA) detektiert als EHV-luc und EHV-L-luc (je  $4,4 \times 10^2$  Genome/10 ng DNA).

Die verhältnismäßig geringe Zahl an EHV-luc- $\Delta$ UL48 in der Lunge kann mit Hilfe der *in vivo* Imager Bilder erklärt werden. Wie diese Daten zeigen, erfolgt nach einer intranasalen Verabreichung zuerst eine Infektion der Lunge und erst später kommt es zur Transgen-

Expression in der Nase (Abb. 9A). Bei der hier eingesetzten Dosis von  $10^6$  Pfu ist die Transgen-Expression von EHV-luc und EHV-L-luc sowohl in der Lunge als auch in der Nase nach 48 h maximal, wohingegen zu diesem Zeitpunkt aufgrund der eingeschränkten Replikationsfähigkeit der UL48-defizienten Variante EHV-luc- $\Delta$ UL48 nur noch in der Nase nachgewiesen werden kann. In der Lunge hingegen liegt die Viruskonzentration bereits unterhalb der Detektionsgrenze des *in vivo* Imagers. Dieses Ergebnis veranschaulicht zudem die Abhängigkeit der Detektion der Biolumineszenz von der Lage der Gewebe. So sind  $5 \times 10^1$  Genome pro 10 ng DNA ausreichend, um mit dem *in vivo* Imer ein Signal im Riechkolben der Maus aufzunehmen, nicht jedoch für die tiefer im Gewebe sitzende Lunge. Dass es sich dabei nicht um einen Effekt durch eine beeinträchtigte Luciferase-Expression handelt, zeigt der positive Luciferase-Assay der Gewebehomogenate (Abb. C-11).

Die Untersuchung von entsprechenden Gewebeproben, die aus Balb/c Mäusen 14 Tage nach einer Infektion gewonnen wurden, waren alle negativ in Bezug auf EHV-DNA und weisen auf ein vollständiges Entfernen des Virus aus dem Organismus hin (nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die EHV-1-Vektoren nach intranasaler und intramuskulärer Verabreichung im Mausmodell mit dem applizierten Gewebe assoziiert bleiben. Nach intranasaler Gabe von bis zu  $10^6$  Pfu verbleiben die EHV-1-Vektoren unabhängig vom Grad ihrer Attenuierung in Lunge und Nase und sind nach zwei Wochen nicht mehr nachweisbar. Dabei kommt EHV-luc- $\Delta$ UL48 in einer weitaus niedrigeren Genomkonzentration in der Lunge bzw. Nase vor als EHV-luc und EHV-L-luc, einhergehend mit einer geringeren Verfügbarkeit an exprimierten Transgen.

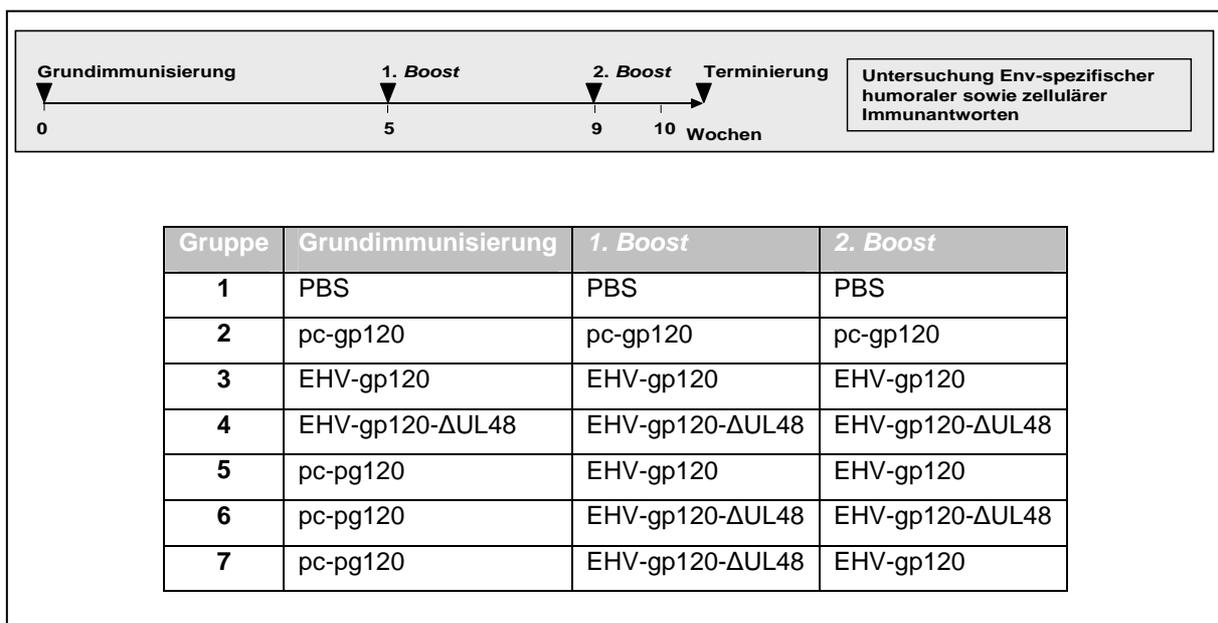
Darüber hinaus zeigen die attenuierten EHV-1 Vektoren im Mausmodell keine Hinweise auf Pathogenität oder unkontrollierte Vermehrung und besitzen somit ein sehr gutes Sicherheitsprofil.

### ***C.3 Hoch attenuierte rekombinante EHV-1-Vektoren vermitteln Env-spezifische zelluläre und humorale Immunantworten im Mausmodell***

Erste Immunisierungsstudien in der Maus zeigten, dass der Einsatz von EHV-1 als Vakzine vielversprechend ist. Dabei wurden Vektoren mit und ohne UL48 in Hinsicht auf die einzusetzende Dosis, Immunisierungsrouten und *Prime/Boost* Strategie getestet und verglichen. Es stellte sich heraus, dass EHV-1-Vektoren bei Verwendung heterologer Immunisierungsstrategien, bestehend aus einer subkutanen DNA Grundimmunisierung und zwei nasalen EHV-1-*Booster*-Immunisierungen, gute Transgen-spezifische zelluläre, humorale und sogar humoral mukosale Immunantworten induzieren können. Dies konnte sowohl für UL48-haltige EHV als auch für UL48-deletierte EHV gezeigt werden, wobei für letztere Varianten eine

zehnfach höhere Dosis ( $10^6$  Pfu) eingesetzt werden musste, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Als Immunogen für diese Studien wurde dabei das Reporterkonstrukt HIV-gag (IIIb) verwendet (Hofmann-Sieber et al., 2010).

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurde eine Immunisierungsstudie in Balb/c Mäusen mit EHV-1-Vektoren durchgeführt, die als Transgen das bereits in klinische Studien eingesetzte HIV-gp120-Gen trugen. Dieses codiert für das HIV-Hüllprotein und ist damit vor allem als Antigen zur Induktion humoraler Immunantworten interessant. Das Immunisierungsschema bestand, wie bei der Studie mit HIV-gag (IIIb), aus einer Grundimmunisierung, gefolgt von zwei *Booster*-Immunisierungen. Hierfür erhielten Balb/c Mäuse  $57 \mu\text{g}$  DNA (pc-gp120) subkutan und nach fünf und neun Wochen  $10^5$  Pfu EHV-gp120 oder  $10^6$  Pfu EHV-gp120- $\Delta$ UL48 intranasal. Als Positivkontrolle wurden Mäuse dreimal subkutan mit DNA immunisiert, die Negativkontrolle bestand aus nicht immunisierten Mäusen. Zudem wurde je eine Gruppe mit UL48-haltigem bzw. -deletiertem EHV-gp120 dreimal intranasal immunisiert (Übersicht Abb. C-15).



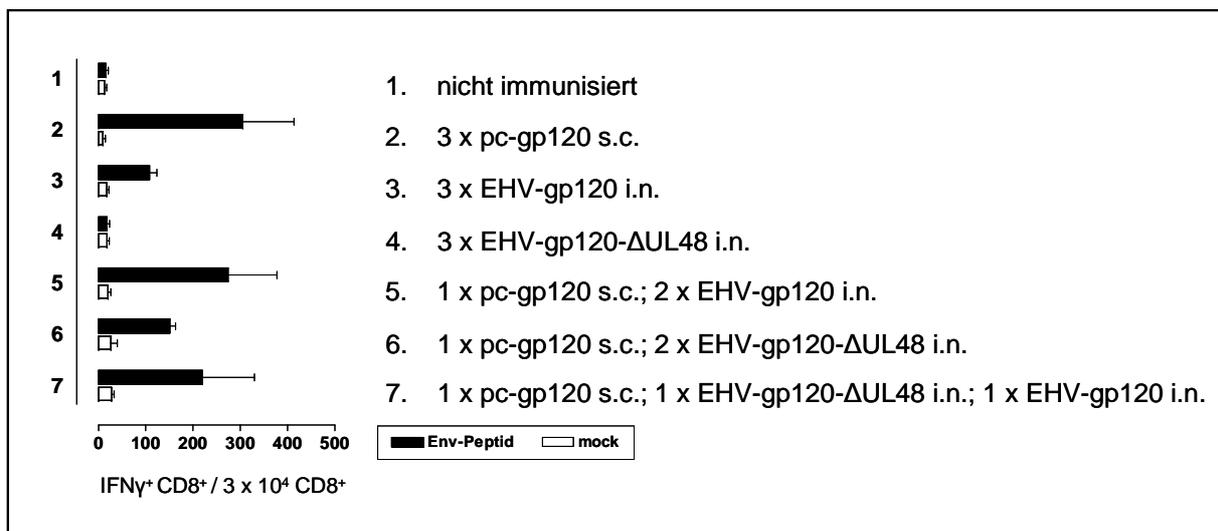
**Abb. C-15) Übersicht über das Immunisierungsschema.**

Je 6 Balb/c Mäuse pro Gruppe erhielten nach einer Grundimmunisierung im Abstand von 5 und 9 Wochen *Booster*-Immunisierungen mit den in der Tabelle angegebenen Immunogenen. Die Immunisierungsdosis betrug je  $57 \mu\text{g}$  pc-gp120,  $10^5$  Pfu EHV-gp120 und  $10^6$  Pfu EHV-gp120- $\Delta$ UL48. 10 Tage nach der letzten Applikation wurden die induzierten humoralen und zellulären Immunantworten untersucht.

**C.3.1 Eine heterologe Impfstrategie verbessert die durch EHV-1-Vektoren induzierten Env-spezifischen T-Zellantworten**

Zehn Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Milzen der Versuchstiere entnommen, jeweils zwei Milzen vereint und Env-spezifische zelluläre Immunantworten

mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt (s. Abb. C-16). Dafür wurden Splenozyten mit dem Env-spezifischen Peptid C13L inkubiert und anschließend mit spezifischen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD8 und CD4 sowie gegen intrazelluläres IFN- $\gamma$  markiert. CD8<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>-Zellen wurden als Maß für aktive Env-spezifische, zytotoxische T-Zellen und somit für spezifische, zelluläre Immunantworten gewertet. Mit Medium behandelte Splenozyten dienten als interne Negativkontrolle. Die mit Plasmid-DNA (pc-gp120) immunisierten Mäuse fungierten als Positivkontrolle (Gruppe 2) und nicht immunisierte Tiere als Negativkontrolle bezüglich der Induktion Env-spezifischer Immunantworten (Gruppe 1).



**Abb. C-16) Induktion Env-spezifischer zellulärer Immunantworten nach dreifacher Immunisierung mit rekombinanten EHV-1-Vektoren und Plasmid-DNA**

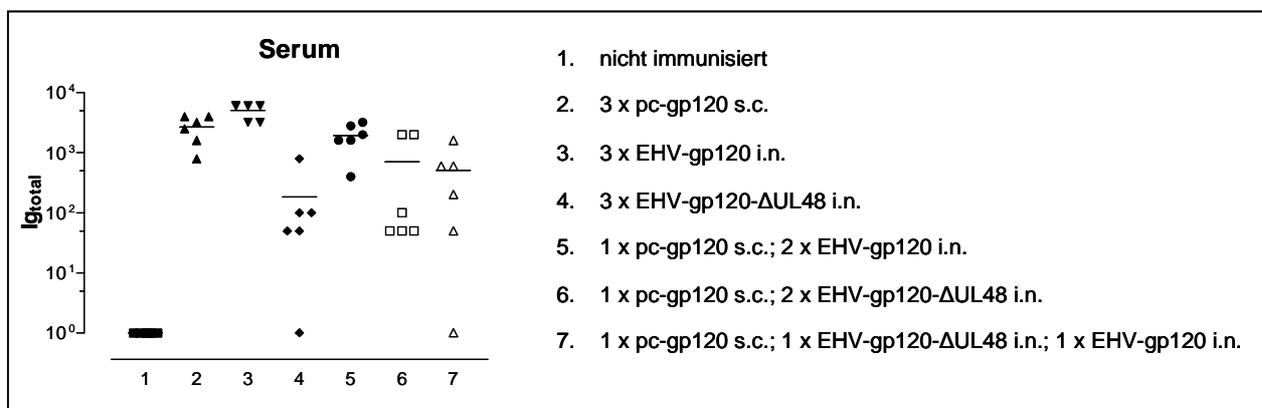
Die Immunisierungsdosis betrug je 57  $\mu$ g pc-gp120, 10<sup>5</sup> Pfu EHV-gp120 und 10<sup>6</sup> Pfu EHV-gp120- $\Delta$ UL48. 10 Tage nach der 2. *Booster*-Immunisierung wurden Splenozyten mit dem Env-spezifischen C13L Peptid oder mit Medium für 6 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurde die Anzahl CD8<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>-Zellen pro 3 x 10<sup>4</sup> CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>-Zellen mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. Mäuse, denen pc-gp120 dreimal subkutan appliziert worden war, dienten als Positivkontrolle (Gruppe 2). Mäuse, die nicht immunisiert worden waren, fungierten als Negativkontrolle (Gruppe 1).

Verglichen mit einer dreifachen DNA-Immunisierung (Gruppe 2) induzierte eine dreifache EHV-gp120-Immunisierung nur geringe Env-spezifische zelluläre Immunantwort (Gruppe 3). Dagegen kann durch eine Kombination aus einer DNA-Grundimmunisierung und zweifachem *Boost* mit EHV-gp120 ein vergleichbares Ergebnis erzielt werden (Gruppe 5). EHV-gp120- $\Delta$ UL48 hingegen induzierte ausschließlich in Kombination mit einer DNA Grundimmunisierung zelluläre Immunantworten (Gruppe 4 und Gruppe 6). Dabei konnte auch durch eine zehnfach höhere Immunisierungsdosis an EHV-gp120- $\Delta$ UL48 nicht die Stärke der durch EHV-gp120 induzierten Immunantworten erreicht werden. Die Ursache liegt höchstwahrscheinlich in ihrer eingeschränkten Replikation und der damit verbundenen verringerten Verfügbarkeit an Transgen, wie die Aufnahmen im *in vivo* Imager belegen

(s. C.2.2). Eine Kombination aus einem EHV-gp120 und EHV-syngag- $\Delta$ UL48 *Boost* brachte darüber hinaus keine Steigerung der reaktiven T-Zellen (Gruppe 7).

### C.3.2 EHV-gp120 und EHV-gp120- $\Delta$ UL48 induzieren Env-spezifische, systemisch humorale Immunantworten

Die humoralen Immunantworten die durch EHV-gp120 und EHV-gp120- $\Delta$ UL48 induziert werden konnten, wurden durch die Bestimmung der Gesamtimmunglobulin ( $Ig_{total}$ ) -Titer im Serum immunisierter Mäuse mit Hilfe eines *Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay* (ELISA) ermittelt (s. Abb. C-17).



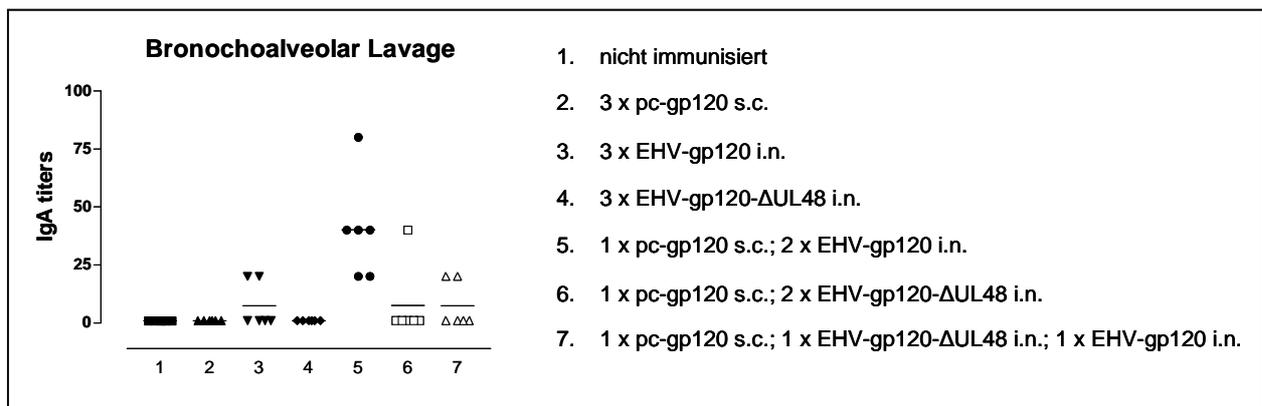
**Abb. C-17) Induktion Env-spezifischer humoraler Immunantworten ( $Ig_{total}$ ) nach dreifacher Immunisierung mit rekombinanten EHV-1-Vektoren und Plasmid-DNA.**

Die Immunisierungsdosis betrug je  $57 \mu\text{g}$  pc-gp120,  $10^5$  Pfu EHV-gp120 und  $10^6$  Pfu EHV-gp120- $\Delta$ UL48. 10 Tage nach dem 2. *Boost* wurde von Serum immunisierter BALB/c Mäuse (je 6 Mäuse pro Gruppe) der Env-spezifische  $Ig_{total}$ -Titer mittels Endpunktverdünnung im ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Antikörpertiter der Einzelmäuse (Symbol) und der jeweilige Mittelwert der Gruppe (Linie). Mäuse, denen pc-gp120 dreimal subkutan appliziert worden war, dienten als Positivkontrolle (Gruppe 2). Mäuse, die nicht immunisiert worden waren, fungierten als Negativkontrolle (Gruppe 1).

Durch eine dreifache Applikation von EHV-gp120 wurden die höchsten  $Ig_{total}$  Titer induziert (Gruppe 3), die sogar über einer heterologen Immunisierung mit DNA (pc-gp120) und EHV-gp120 lagen (Gruppe 5). Die durch die UL48-deletierte Variante induzierte humorale Immunantwort blieb dagegen deutlich niedriger (Gruppe 4), konnte jedoch durch die Grundimmunisierung mit DNA (Gruppe 6) noch verbessert werden. Darüber hinaus brachte die Kombination aus EHV-gp120 und EHV-gp120- $\Delta$ UL48 nach einer DNA Immunisierung (Gruppe 7) keinen Vorteil zu einer zweifachen Immunisierung mit einer der Vektor-Varianten (Gruppe 5 und 6).

### C.3.3 Eine heterologe Impfstrategie mit einer DNA-Grundimmunisierung und zweimaliger EHV-gp120-Booster-Immunsierung induziert mukosale humorale Immunantworten

Besonderes Interesse bei der Entwicklung eines HIV-Impfstoffes besteht an der Induktion von mukosalen Immunantworten, um das HI-Virus bereits an der Eintrittspforte neutralisieren zu können. Hier wurden bronchoalveolare Lavagen von immunisierten Mäusen auf mukosale Transgen-spezifische IgA-Titer hin untersucht (s. Abb. C-18).



**Abb. C-18) Induktion Env-spezifischer mukosaler Immunantworten (IgA) nach dreifacher Immunisierung mit rekombinantem EHV und Plasmid-DNA.**

Die Immunisierungsdosis betrug je 57 µg pc-gp120, 10<sup>5</sup> Pfu EHV-gp120 und 10<sup>6</sup> Pfu EHV-gp120-ΔUL48. 10 Tage nach dem 2. *Boost* wurde aus bronchoalveolären Lavagen von BALB/c Mäusen (je 6 Mäuse pro Gruppe) der Env-spezifische IgA-Titer mittels Endpunktverdünnung im ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Antikörpertiter der Einzelmäuse (Symbol) und der jeweilige Mittelwert der Gruppe (Linie). Mäuse, denen pc-gp120 dreimal subkutan appliziert worden war, dienten als Positivkontrolle (Gruppe 2). Mäuse, die nicht immunisiert worden waren, fungierten als Negativkontrolle (Gruppe 1).

Es zeigte sich, dass durch eine Immunisierung mit dem DNA-Konstrukt keine messbaren IgA-Titer in der Schleimhaut der Lunge induziert werden konnten (Gruppe 2). Dagegen rief eine dreifache intranasale Applikation von EHV-gp120 in zwei von sechs Balb/c Mäusen einen niedrigen Titer hervor. Wurden die Tiere jedoch mit pc-gp120-DNA grundimmunisiert und erhielten anschließend als *Booster*-Immunsierungen EHV-gp120, ließen sich in allen Tieren IgA-Titer induzieren. Die UL48 deletierte Variante hingegen erzielte nach dreifacher Verabreichungen keine (Gruppe 4) und nach heterologem *Prime/Boost* ausschließlich in einer Maus (Gruppe 6) eine Reaktion. Eine Kombination aus 1. *Boost* mit EHV-gp120-ΔUL48 und einem weiteren mit EHV-gp120 (Gruppe 7) nach einer pc-gp120 Immunisierung bringt auch für die Induktion mukosaler humoraler Immunantworten keine Verbesserung (s. Abb. C-18), wie auch für die Induktion eines Ig<sub>total</sub>-Titers gezeigt wurde (s. C.3.2.).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass EHV-gp120 in der Lage ist, Env-spezifische zelluläre und humorale Immunantworten zu induzieren. Dabei erzielte eine heterologe Impfstrategie mit einer Grundimmunisierung mit pcDNA-gp120 und anschließenden *Booster*-Immunsierungen mit EHV-gp120 die besten zellulären und humoralen mukosalen Immunantworten. Den höchsten  $Ig_{total}$ -Titer induzierte dagegen eine dreimalige Applikation von EHV-gp120. Die Resultate durch EHV-gp120- $\Delta$ UL48 konnten durch das heterologe *Prime/Boost* Schema jeweils verbessert werden, erreichten jedoch trotz Verwendung einer zehnfach höheren Immunisierungsdosis nicht die Werte der durch EHV-gp120 induzierten Immunantworten.

#### **C.4 EH-virale Vektoren können humane antigenpräsentierende Zellen transduzieren**

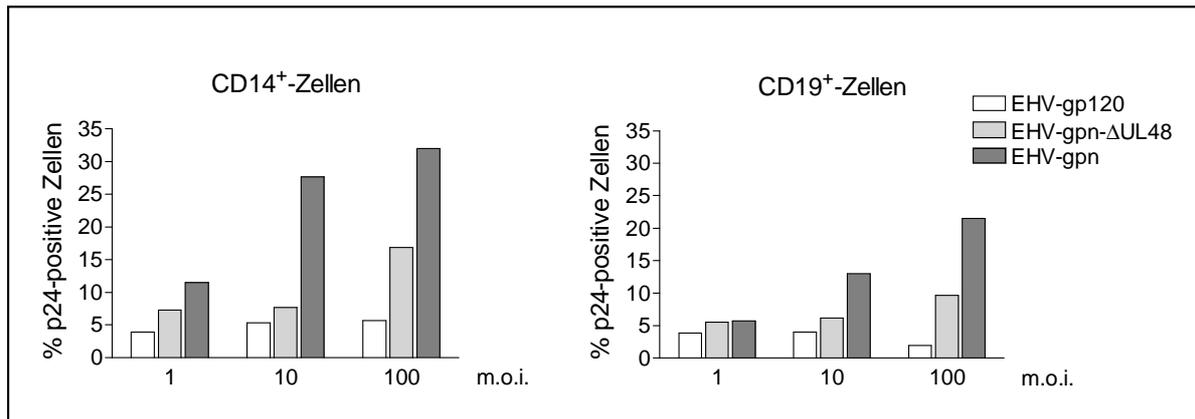
Die CTL-Antworten spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle einer HIV-Infektion. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass EHV-1-Vektoren unter Verwendung einer heterologen *Prime/Boost*-Strategie mit DNA-Plasmiden neben humoralen Immunantworten auch gute Antigen-spezifische zelluläre Immunantworten hervorrufen können. Zur Aktivierung von T-Zellen ist die Prozessierung und anschließende Präsentation von Epitopen über MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche antigenpräsentierender Zellen notwendig. CTL erkennen mit Hilfe ihres T-Zell-Rezeptors spezifische Peptid-MHC-I-Komplexe, wodurch die Ausschüttung von immunmodulatorischen Cytokinen und Effektormolekülen eingeleitet wird. Die wichtigsten professionellen antigenpräsentierenden Zellen sind die Dendritischen Zellen. In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass sowohl murine als auch humane *in vitro* generierte Dendritische Zellen erfolgreich durch EHV-1-Vektoren transduziert werden können. Dies ist ein gutes Indiz dafür, dass die viralen Vektoren auch in Menschen T-Zell-Antworten hervorrufen können.

##### **C.4.1 EHV-1-Vektoren transduzieren humane CD14<sup>+</sup>- und CD19<sup>+</sup>-Zellen**

Um zu zeigen, dass EHV-1-Vektoren neben Dendritischen Zellen weitere antigenpräsentierende Zellen transduzieren können, wurden Makrophagen und Monozyten sowie B-Zellen aus den PBMCs eines männlichen Spenders isoliert (s. B.2.5.2). Dazu erfolgte eine Aufreinigung mit Hilfe von magnetischen Kügelchen, an die Antikörper gegen spezifische Oberflächenantigene (CD14 bzw. CD19) gekoppelt waren. Anschließend wurden die Monozyten/Makrophagen-Population (CD14<sup>+</sup>) und die B-Zellen-Population (CD19<sup>+</sup>) mit unterschiedlichen Dosen (m.o.i. 1, 10 und 100) an EHV-gpn bzw. EHV-gpn- $\Delta$ UL48 transduziert. Nach 12 Stunden erfolgte eine intrazelluläre Färbung mit einem

p24-spezifischen Antikörper zum Nachweis des GPN-Antigens im Durchflusszytometer (s. Abb. C-19).

Sowohl die Monozyten/Makrophagen-Population (CD14<sup>+</sup>) als auch die B-Zell-Population (CD19<sup>+</sup>) wurde mit den EHV-gpn und EHV-gpn- $\Delta$ UL48 Vektoren transduziert. Auch hier zeigte sich, dass durch die Deletion von  $\Delta$ UL48 in deutlich weniger Zellen Transgen-Expression nachgewiesen werden kann (vgl. z. B. C-1.5).



**Abb. C-19) Transduktion von humanen CD14<sup>+</sup>- und CD19<sup>+</sup>-Zellen mit EHV-gpn oder EHV-gpn- $\Delta$ UL48 (m.o.i. 1, 10 und 100).**

Je  $3 \times 10^5$  Zellen pro Ansatz wurden mit EHV-gpn oder EHV-gpn- $\Delta$ UL48 infiziert. Der Nachweis des HIV-Antigens GPN erfolgte mittels intrazellulärer Färbung mit einem PE-gekoppelten p24-Antikörper 12 h p. i. mit einer durchflusszytometrischen Analyse. Als Kontrolle zum Nachweis von Kreuzreaktivität dienten EHV-gp120 infizierte Zellen.

Dabei weisen die EHV-1-Vektoren sogar bei einer m.o.i. von 100 eine relativ geringe Transduktionsrate auf (CD14<sup>+</sup>-Zellen: 30 % und 15 % bzw. CD19<sup>+</sup>-Zellen: 20 % und 10 % an EHV-gpn und EHV-gpn- $\Delta$ UL48 infizierten p24-positiven Zellen). Zur Induktion von zellulären Immunantworten reicht jedoch bereits eine geringe Zahl an antigenpräsentierenden Zellen aus. Darüber hinaus deutet dies darauf hin, dass die EHV-1-Vektoren auch im Menschen ein gutes Sicherheitsprofil besitzen.

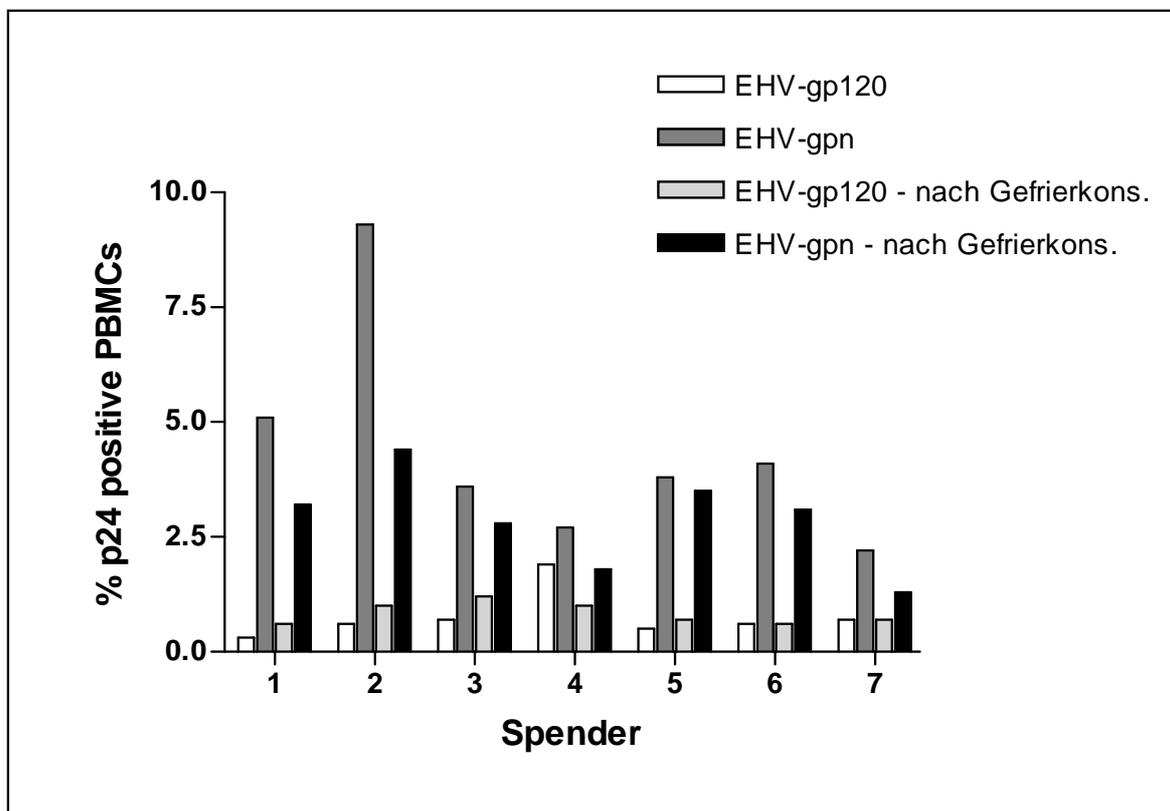
EHV-1-Vektoren transduzieren folglich eine große Bandbreite an humanen antigenpräsentierenden Zellen wie Dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen und B-Zellen *in vitro*. Für einen Vakzinekandidaten sind dies ideale Eigenschaften Antigen-spezifische T-Zell-Antworten zu induzieren.

#### **C.4.2 EHV-1-Vektoren rufen in humanen PBMCs auch nach Gefrierkonservierung Transgen-Expression hervor**

Für die Untersuchung von humanen T-Zell-Antworten werden PBMCs aus Blut gewonnen und analysiert. In klinischen Studien beispielsweise ist der Ort der Probenentnahme und der Probenanalyse oft zeitlich und räumlich voneinander getrennt. Die Gefrierkonservierung von

Zellen ermöglicht es, die Proben zu verschicken und zu lagern, und bewerkstelligt so eine zeitgleiche Analyse. Es ist bereits bekannt, dass CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen ihre Funktionalität durch das Einfrieren nicht verlieren und nach dem Auftauen mittels ELISpots analysiert werden können (Kreher *et al.*, 2003).

Hier wurde untersucht, ob die Gefrierkonservierung einen Einfluss auf die Antigen-Expression in PBMCs hat, die mit rekombinanten EHV-1-Vektoren transduziert wurden. Wäre trotz der Gefrierkonservierung weiterhin eine gute Expression möglich, könnten für ELISpot-Analysen infizierte, autologe PBMCs zur Stimulierung von T-Zellen eingesetzt werden. Deshalb wurde ein Teil der aus Vollblut isolierten PBMCs von jeweils sieben verschiedenen Blutspendern direkt mit EHV-1-Vektoren inkubiert (m.o.i. 10) und ein Teil nach Lagerung bei -80 °C für eine Woche. Der Nachweis der Transgen-Expression erfolgte mit Hilfe eines Anti-p24-Antikörpers 12 Stunden p. i. im Durchflusszytometer.



**Abb. C-20) Anteil Transgen-positiver Zellen in EHV-gpn transduzierten humanen PBMCs (m.o.i. 10) bestimmt mittels durchflusszytometrischer Analyse.**

$5 \times 10^5$  Zellen wurden mit einer m.o.i. von 10 mit EHV-gp120 oder EHV-gpn infiziert. 12 h nach Transduktion wurden die Zellen intrazellulär mit einem PE-gekoppelten p24-Antikörper markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Es wurden PBMCs direkt nach einer Isolierung mit gefrierkonservierten PBMCs derselben Blutspende von sieben unterschiedlichen Personen verglichen. Die EHV-gp120 infizierten Zellen wurden als Negativkontrolle verwendet.

Es konnte gezeigt werden, dass abhängig vom Spender durchschnittlich 4,4 % (min. 2,2 % Spender 7; max. 9,3 % Spender 2) der PBMCs p24-positiv waren. Auftaute PBMCs wurden nach der Isolierung aus heparanisiertem Vollblut für eine Woche bei -80 °C gelagert.

Dadurch verringerte sich die Zahl an p24-positiven Zellen im Schnitt um 1,5 % (min. 0,3 % Spender 5; max. 4,9 % Spender 2) (s. Abb. C-20). Damit reduziert die Gefrierkonservierung die Zahl an Zellen, die Antigene für die T-Zell-Stimulation prozessieren können, nur geringfügig und sollte für eine Reaktivierung ausreichend sein.

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass EHV-1-Vektoren *in vitro* und *ex vivo* humane antigenpräsentierende Zellen transduzieren und damit spezifische T-Zellen reaktivieren können. Damit können sie zum einen für *ex vivo* Analysen von T-Zellantworten im ELISpot eingesetzt werden, zum anderen weist das darauf hin, dass die EHV-1-Vektoren auch im humanen System vielversprechende Vakzinekandidaten darstellen.

## **C.5 EH-virale Vektoren können zum Nachweis der Effizienz von Vakzine im Mausmodell eingesetzt werden**

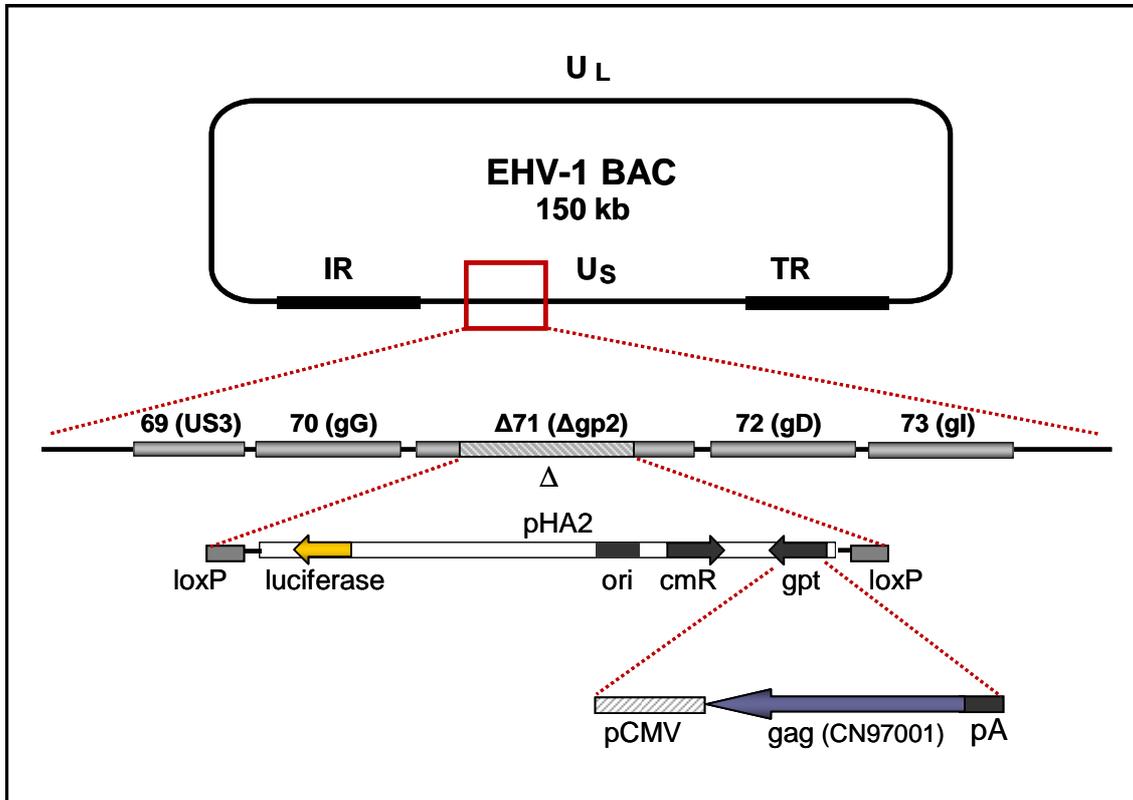
### **C.5.1 EHV-L-luc-gag erfüllt die Voraussetzungen für ein HIV-Challenge-Virus**

Der Schutz vor einer Infektion mit einem Erreger beweist wohl am effektivsten die Wirksamkeit einer Vakzine. Neue Impfstoffkandidaten werden dazu zunächst in präklinischen Studien im Kleintiermodell untersucht. Dabei werden die Tiere erst mit dem entsprechenden Impfstoffkandidaten immunisiert und anschließend mit dem Erreger infiziert. Dieser *Challenge* des Immunsystems kann aber mit HIV-1 in den meisten gängigen Tiermodellen nicht durchgeführt werden. Der Grund dafür ist das sehr enge Wirtsspektrum von HIV-1, so dass es nur für Menschen und einige Primaten wie den Schweinsaffen (*Macaca leonina*) oder Schimpansen (*Pan troglodytes*) infektiös ist (Kuang *et al.*, 2009; Nath *et al.*, 2000).

Einen neuen Ansatz um auch HIV-*Challenge*-Versuche z.B. in Kleintiermodellen durchführen zu können, bietet der Einsatz chimärer Viren, die für das Versuchstier infektiös sind und zudem genetisches Material von HIV-1 tragen. So sollten geimpfte Mäuse aufgrund der gegen HIV-1 Epitope gebildeten Immunantworten einen gewissen Schutz vor dem pathogenen *Challenge*-Virus erlangt haben. Die Reduktion der pathogenen Eigenschaften im geimpften Tier stellt dann ein Maß für die Wirksamkeit des HIV-Impfstoffes dar.

Um ein solches chimäres *Challenge*-Virus herzustellen, wurde hier das pathogene EHV-L-luc als parentales Virus verwendet. EHV-L-luc verursacht bei Mäusen nach einer intranasalen Verabreichung einen starken Gewichtsverlust innerhalb von zwei Tagen und führt zu weiteren klinischen Zeichen wie struppigem Fell und tragem Verhalten, die bis zu fünf Tage nach der Infektion anhalten (siehe C.2.5.1). Das Luciferase-Gen dient hier als Reporter für die Viruslast nach einem *Challenge*. Bei einem vorhandenen Schutz sollten sowohl die

klinischen Zeichen als auch die Biolumineszenz aufgrund der reduzierten Viruslast weniger stark ausgeprägt sein oder sogar vollständig fehlen. Als HIV-Antigen wurde hier das RNA- und codonoptimierte *gag* (97CN001) verwendet.



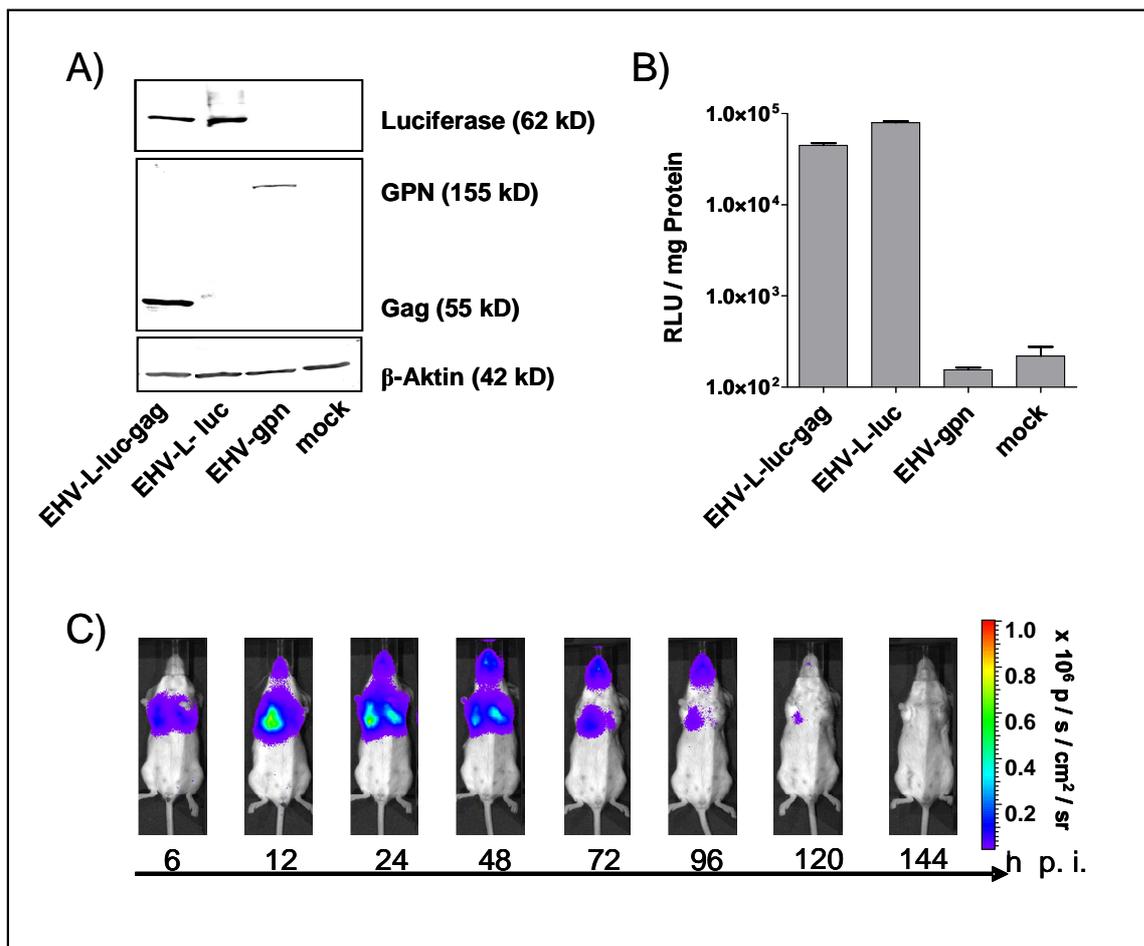
**Abb. C-21) Schematische Darstellung der Herstellung von EHV-L-luc-gag.**

In das BAC des EHV-L-luc wurde mit Hilfe des RED-Rekombinationsystems das Gen für das HIV-Immunogen Gag (97CN001) anstelle des *gpt*-Gens in die pHA2-Sequenz eingefügt.

Ori = *Origin of Replication*, cmR = Chloramphenicol-Resistenz, UL: *Unique Long Region*; US: *Unique Short Region*; TR: *Terminal Repeat Region*; IR: *Internal Repeat Region*; gG: Glykoprotein G; gD: Glykoprotein D; pCMV: Promotor des Cytomegalievirus; pA: *Bovine-growth-hormone-polyA-site*; loxP: loxP-site

Das Einbringen des *gag*-Gens in das EHV-Bacmid erfolgte mit Hilfe einer weiteren homologen Rekombination unter Austausch des *gpt*-Gens, analog zum Einbringen der Luciferase in die pHA2-Sequenz (Abb. C-21). Hierfür wurden lediglich die homologen Sequenzen an die entsprechende Rekombinationsstellen angepasst (genaue Beschreibung siehe B.2.2.1.3).

Eine Western-Blot-Analyse zeigte, dass 16 Stunden nach einer Infektion von RK13 Zellen mit einer m.o.i. von 0,5 beide Transgene gut exprimiert werden. Die Luciferase-Expression ist dabei vergleichbar mit der von Zellen, die mit dem parentalen EHV-L-luc infiziert worden waren. EHV-gpn infizierte Zellen dienten als Positivkontrolle für den p24-Antikörper, der zum Nachweis von Gag eingesetzt wurde (Abb. C-22A). Darüber hinaus bestätigte ein Luciferase-Assay mit den Lysaten der infizierten Zellen die Funktionalität des Enzyms *in vitro* (Abb. C-22B).



### Abb. 22) Charakterisierung von EHV-L-luc-gag.

A) Nachweis der Transgen-Expression mittels Western-Blot-Analyse von Zelllysaten von EHV-L-luc-gag infizierten RK13 Zellen (m.o.i. 0,5; 16 h p. i.). Mit Hilfe spezifischer Antikörper wurde die Expression von Gag (97CN001) und Luciferase nachgewiesen. Als Negativkontrolle dienten nicht infizierte Zellen (mock). EHV-gpn infizierte Zellen dienten als Positivkontrolle für den Anti-p24-Antikörper und zum Ausschluss von Kreuzreaktivität des Anti-Luciferase-Antikörpers. EHV-L-luc diente als Positivkontrolle für den Anti-Luciferase-Antikörper und zum Ausschluss von Kreuzreaktivität des Anti-p24-Antikörpers. B) Nachweis der Luciferase-Aktivität von Zelllysaten infizierter RK13-Zellen (m.o.i. 0,5; 16 h p. i.). Nach Zugabe von Substrat (Luciferin) erfolgte die Messung der Lumineszenz für 10 sec in Relativen Licht Einheiten (RLU). Diese wurden anschließend zur eingesetzten Proteinmenge in Relation gesetzt. Als Negativkontrolle wurden nicht infizierte Zellen (mock) bzw., zum Ausschluss von unspezifischer Aktivität durch EHV, EHV-gpn infizierte RK13 Zellen verwendet. Als Positivkontrolle dienten EHV-L-luc infizierte Zellen. C) *In vivo* Imaging von EHV-L-luc-gag in weiblichen Balb/c Mäusen. Dargestellt ist eine von drei mit  $1 \times 10^6$  Pfu EHV-L-luc-gag immunisierten Mäusen. Die Aufnahme erfolgte mit einer CCD-Kamera zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Immunisierung für jeweils 10 min. Dargestellt ist der durchschnittliche Lichtfluss.

Die Aufnahmen mit dem *in vivo* Imager (Abb. C-22C) zeigten zudem, dass das Einfügen eines zusätzlichen Transgens in das EHV-1-Genom keinen Einfluss auf die Biodistribution des Virus hat (vgl. Abb. C-7A). So änderten sich weder die Verteilung, die Dauer noch die Intensität der Biolumineszenz. Darüber hinaus konnten der gleiche Krankheitsverlauf einhergehend mit Gewichtsverlust und die anschließende Regeneration nach etwa fünf Tagen beobachtet werden wie bei EHV-L-luc infizierten Mäusen.

Bei einer Infektion vakzinierter Mäuse mit EHV-L-luc-gag, in denen bereits Gag-spezifische Immunantworten induziert wurden, sollte der Krankheitsverlauf dagegen deutlich abgeschwächt sein oder sogar verhindert werden. Dies kann wiederum durch die Detektion der Luciferase-Aktivität in den Mäusen mit Hilfe des *in vivo Imagers* und durch die Veränderungen des relativen Körpergewichts verfolgt werden. Darüber hinaus kann die Titerbestimmung von rückgewonnenem *Challenge*-Virus aus der Lunge Aufschluss über das Ausmaß der Virusreplikation von EHV-L-luc-gag geben.

### **C.5.2 NYVAC-gag immunisierte Mäuse zeigen einen Schutz vor einem EHV-L-luc-gag-Challenge in Abhängigkeit von der Immunisierungsroute**

#### **C.5.2.1 NYVAC-gag induziert systemische und mukosale Gag-spezifische reaktive zytotoxische T-Zellen in Balb/c Mäusen**

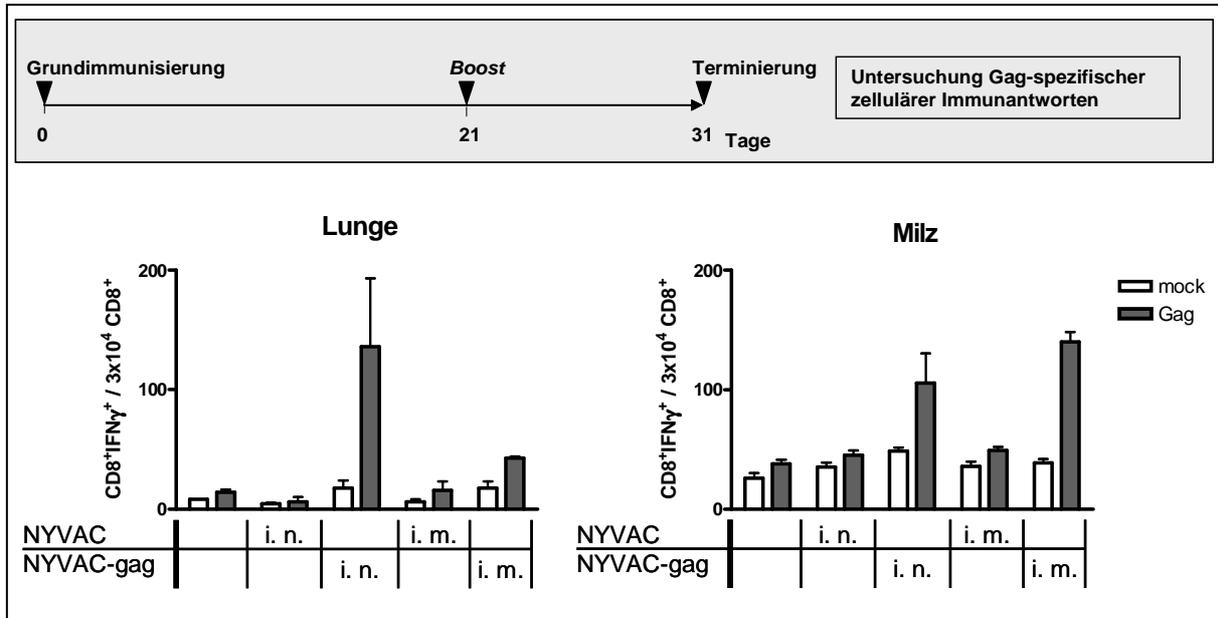
Nach Infektion einer Zelle mit dem *Challenge*-Virus EHV-L-luc-gag kommt es zur Produktion des HI-viralen Gag-Proteins, das dann prozessiert und dem Immunsystem über MHC-I Komplexe präsentiert werden kann. Diese Komplexe werden von spezifischen zytotoxischen T-Zellen erkannt, die wiederum die Apoptose der infizierten Zelle einleiten. Konnte durch eine Vakzine bereits ein effektiver Immunschutz gegen Gag aufgebaut werden, sollten infizierte Zellen rasch erkannt und abgeräumt werden, bevor neue Viren entstehen können.

Für rekombinante NYVACs haben präklinischen Studien bereits gezeigt, dass sie nach einer intramuskulären Verabreichung spezifische systemische T-Zellen in Balb/c Mäusen induzieren (Wild *et al.*, 2009a). Hier konnte nachgewiesen werden, dass NYVAC auch mukosale zytotoxische T-Zellen induzieren kann, von denen angenommen wird, dass sie die HIV-Replikation begrenzen können und damit auch die Möglichkeit einer weiteren Übertragung verringern (Shacklett *et al.*, 2009).

Für die Immunisierung wurde das in unserer Gruppe hergestellte rekombinante NYVAC-gag verwendet. Bei der *gag*-Sequenz handelt es sich um ein codon- und RNA-optimiertes Gen, das von dem HIV-1 C-Clade Isolat 97CN001 abgeleitet ist und mit der *gag*-Sequenz des *Challenge* Virus identisch ist. Das Gag-Protein enthält viele konservierte CTL-Epitope und ist dem zufolge gut zur Induktion zellulärer Immunantworten geeignet.

Für die Immunisierung von weiblichen Balb/c Mäusen wurden hochtitrige, aufgereinigte NYVAC-Virusstocks hergestellt und intranasal oder intramuskulär verabreicht. Um nachzuweisen, dass die NYVAC-Vektoren sowohl systemische als auch mukosale Transgen-spezifische CTL induzieren können, erfolgten zwei homologe Immunisierungen (Grundimmunisierung und *Boost*) im Abstand von drei Wochen. Zehn Tage nach dem *Boost* wurden den Mäusen die Lunge und die Milz entnommen, die Lymphozyten aufgereinigt und

jeweils die Zahl der Gag-spezifischen reaktiven T-Zellen bestimmt. Hierfür erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen das CD8-Oberflächenantigen und IFN- $\gamma$ . Als Negativkontrolle dienten jeweils nicht immunisierte Mäuse. Um eventuelle Kreuzreaktivitäten der Antikörper mit dem viralen Vektor zu zeigen, erhielt je eine Gruppe den NYVAC-Vektor ohne ein Transgen (Abb. C-23).



#### Abb. C-23) Induktion Gag-spezifischer zellulärer Immunantworten nach zweifacher Immunisierung mit NYVAC-gag

Je 3 weibliche Balb/c Mäuse wurden zweimal im Abstand von 3 Wochen intranasal ( $5 \times 10^7$  Pfu) oder intramuskulär ( $10^8$  Pfu) mit NYVAC-gag oder NYVAC immunisiert. 10 Tage nach der *Booster*-Immunisierung wurden Splenozyten bzw. Lymphozyten der Lunge isoliert und mit dem Gag-spezifischen A9I Peptid oder mit Medium behandelt. Im Anschluss wurde die Anzahl CD8<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>-Zellen pro  $3 \times 10^4$  CD8<sup>+</sup>-Zellen mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. Mäuse, die nicht immunisiert worden waren, fungierten als Negativkontrolle. Mäuse, die mit NYVAC ohne Transgen behandelt worden waren, dienten zum Nachweis von Kreuzreaktivitäten durch den Vektor.

Sowohl über die intranasale als auch die intramuskuläre Immunisierungsrouten war es gleichermaßen möglich, systemische zelluläre Immunantworten zu induzieren (nachgewiesen in der Milz). Auch in der Lunge konnten spezifische reaktive T-Zellen nachgewiesen werden, deren Anzahl nach einer intranasalen Immunisierung jedoch wesentlich höher war als nach einer intramuskulären Immunisierung. Demnach würde man nach einem intranasalen *Challenge* für intranasal mit NYVAC-gag immunisierte Mäuse einen besseren Schutz durch zelluläre Immunantworten erwarten als für intramuskulär immunisierte Mäuse.

### **C.5.2.2 Intranasal immunisierte Balb/c Mäuse zeigen einen Schutz vor einer EHV-L-luc-gag Infektion**

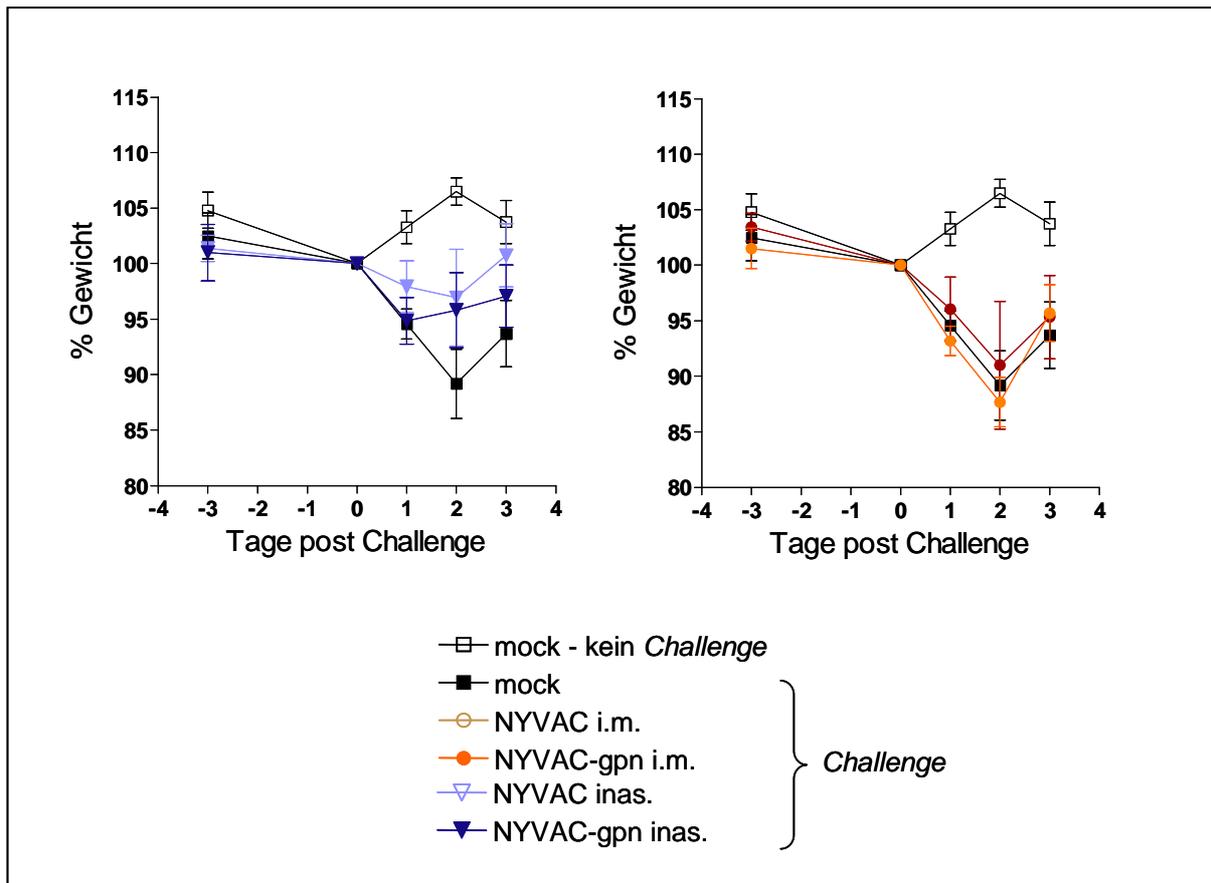
Der *Challenge* von intranasal bzw. intramuskulär mit NYVAC-gag immunisierten Balb/c Mäusen mit EHV-L-luc-gag sollte zeigen, ob die induzierten Gag-spezifischen T-Zellen einen Schutz vor Erkrankung einhergehend mit einer Reduktion der Biolumineszenz aufweisen. Dazu wurden Balb/c Mäuse zweimal im Abstand von drei Wochen mit NYVAC-gag bzw. zur Kontrolle mit NYVAC-Vektoren ohne ein Transgen intranasal oder intramuskulär immunisiert. Zwölf Tage nach der zweiten Immunisierung erfolgte der intranasale *Challenge* der Versuchstiere mit EHV-L-luc-gag mit jeweils  $5 \times 10^6$  Pfu. Als Positivkontrolle für den *Challenge* wurden nicht immunisierte Mäuse verwendet (mock), als Negativkontrolle dienten Mäuse, die weder NYVAC noch EHV-L-luc-gag erhielten (mock – kein *Challenge*).

Der Gewichtsverlust der Balb/c Mäuse (Abb. C-24) und die Höhe der Biolumineszenzaktivität am zweiten Tag nach dem *Challenge* (Abb. C-25A) zeigten die Auswirkungen des *Challenge*. Darüber hinaus wurden die Virustiter in den Lungen der Mäuse bestimmt, um den Einfluss der Immunisierung auf die Replikation von EHV-L-luc-gag zu ermitteln (Abb. C-25B).

#### **C.5.2.2.1 Intranasal mit NYVAC immunisierte Mäuse zeigen einen Transgen-unabhängigen Schutz vor einer Gewichtsabnahme**

Der *Challenge* nicht-immunisierter Balb/c Mäuse (mock) verursachte den für eine EHV-L Infektion üblichen Verlauf, der zwei Tage nach der Infektion im Mittel einen Gewichtsunterschied zu nicht-behandelten Balb/c Mäusen (mock – kein *Challenge*) von 15 % zur Folge hatte (Abb. C-24; vgl. Abb. C-5). Im Vergleich dazu zeigten Balb/c Mäuse, die NYVAC intranasal erhalten hatten, einen gewissen Schutz gegen das *Challenge*-Virus mit nur 10 % Gewichtsunterschied. Die intramuskulär immunisierten Balb/c Mäuse dagegen hatten keinerlei Vorteil durch die Immunisierung (Abb. C-24).

Der Verlauf der Gewichtsveränderung zeigte, dass die intranasale Verabreichung von NYVAC-Vektoren bereits Transgen-unabhängig ein antivirales Milieu in der Lunge schafft, das die Infektion und/oder die Replikation des *Challenge*-Virus negativ beeinflusst. Die intramuskuläre Immunisierung mit NYVAC-gag bietet jedoch (trotz der induzierten systemischen Gag-spezifischen T-Zellen (s. C.4.2.1)) keinen Schutz vor dem *Challenge*.



**Abb. C-24) Graphische Darstellung der Veränderungen des relativen durchschnittlichen Körpergewichts immunisierter Balb/c Mäuse durch einen EHV-L-luc-gag Challenge (Dosis je  $5 \times 10^6$  Pfu).**

Je 6 weibliche Balb/c Mäuse wurden zweimal im Abstand von 3 Wochen intranasal ( $5 \times 10^7$  Pfu) oder intramuskulär ( $10^8$  Pfu) mit NYVAC-gag oder NYVAC immunisiert. 10 Tage nach der 2. Immunisierung erfolgte der Challenge mit  $5 \times 10^6$  Pfu EHV-L-luc-gag. Das Gewicht am Tag des Challenge (Tag 0) wurde jeweils gleich 100 % gesetzt und die Messdaten wurden damit in Relation gesetzt. Als Kontrollgruppen dienten mit PBS immunisierte Balb/c Mäuse die kein EHV-L-luc-gag erhielten (mock - kein Challenge) bzw. als Positivkontrolle für den Challenge nicht immunisierte Mäuse (mock). Es ist jeweils der Mittelwert jeder Gruppe (Symbol) an jedem Tag mit Standardabweichung abgebildet. Zur besseren Übersicht wurden die intranasal und die intramuskulär immunisierten Mäuse jeweils in einem separaten Diagramm dargestellt; die identischen Kontrollgruppen sind in beiden Diagrammen aufgeführt.

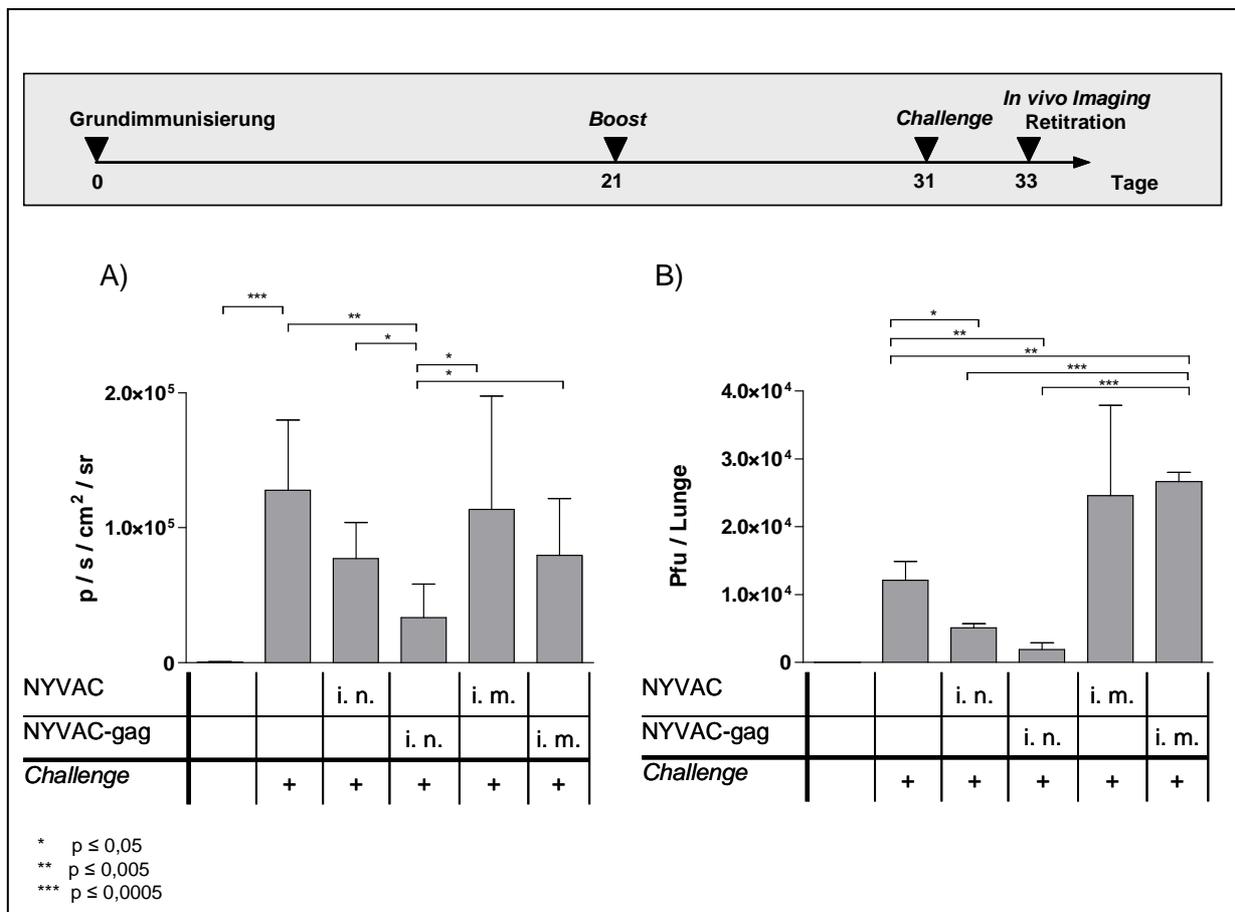
#### **C.5.2.2.2 Intranasal mit NYVAC-gag immunisierte Mäuse zeigen eine Gag-spezifische Verringerung, intramuskulär mit NYVAC immunisierte Mäuse eine Vektor-bedingte Erhöhung der EHV-L-luc-gag Replikation nach einem Challenge**

Neben der Überwachung des Körpergewichts der Balb/c Mäuse wurde am zweiten Tag nach dem Challenge das Ausmaß der Infektion mit Hilfe der Biolumineszenzaktivität (Abb. C-25A), sowie die Replikation von EHV-L-luc-gag durch die jeweilige Bestimmung des Virustiters in der Lunge der Maus ermittelt (Abb. C-25B).

Die Analyse mit Hilfe des *in vivo* Imagers zwei Tage nach dem Challenge, also zum Zeitpunkt des maximalen Gewichtsverlustes, zeigte, dass die Immunisierung mit NYVAC-gag

über die intranasale Route im Vergleich zu nicht-immunisierten Balb/c Mäusen (mock - *Challenge*) zu einer signifikanten Reduktion der Biolumineszenz führt. Da sich eine intranasale Immunisierung mit NYVAC nicht-signifikant auf die Biolumineszenzaktivität gegenüber nicht-immunisierten Mäusen auswirkte, muss der Effekt in NYVAC-gag immunisierten Mäusen durch das Gag-Antigen verursacht worden sein.

Balb/c Mäuse, die NYVAC-gag bzw. NYVAC intramuskulär erhalten hatten, unterschieden sich dagegen nicht signifikant von der Kontrollgruppe (mock - *Challenge*) (Abb. C-25A). Die intramuskuläre Immunisierung hatte demnach keinen Einfluss auf Biolumineszenzaktivität.



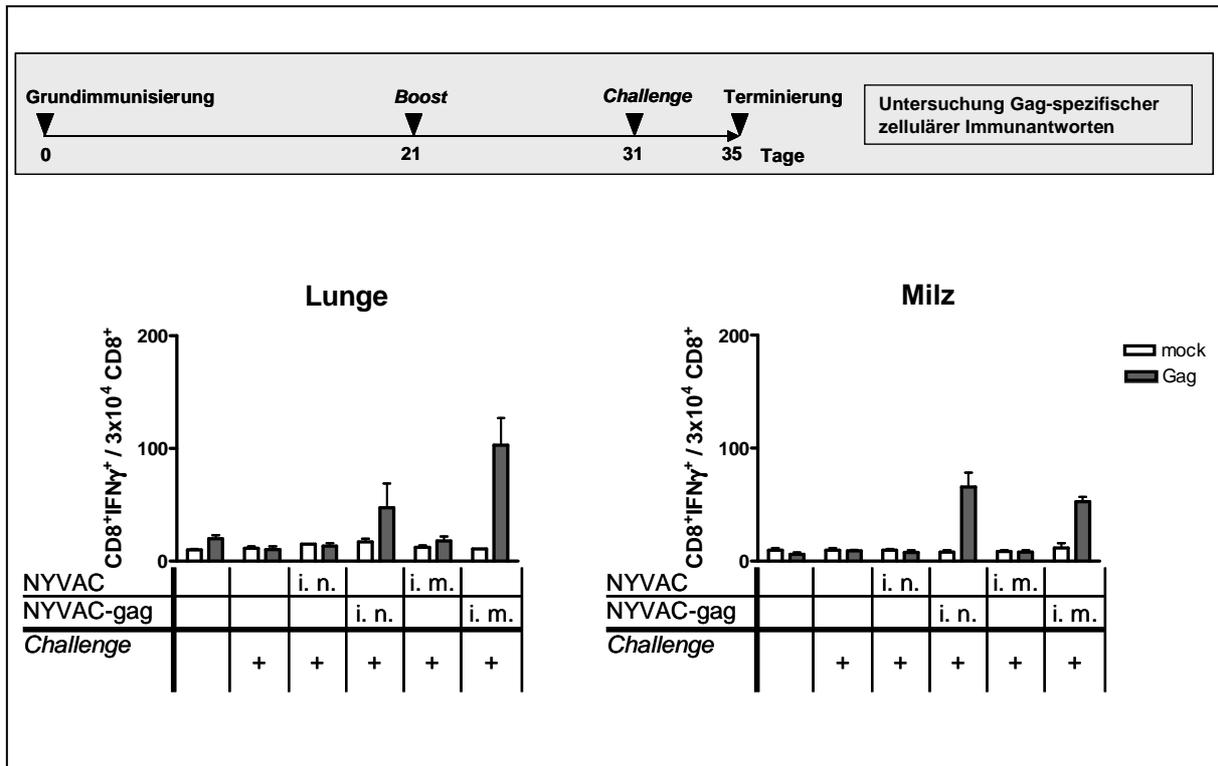
**Abb. C-25) Biolumineszenzaktivität und Retitration von EHV-L-luc-gag aus Lungen von intranasal bzw. intramuskulär mit NYVAC-gag immunisierten Mäusen nach einem Challenge mit NYVAC-gag**

Je 9 weibliche Balb/c Mäuse wurden zweimal im Abstand von 3 Wochen intranasal ( $5 \times 10^7$  Pfu) oder intramuskulär ( $10^8$  Pfu) mit NYVAC-gag oder NYVAC immunisiert. 10 Tage nach der *Booster*-Immunisierung erfolgte der *Challenge* mit  $5 \times 10^6$  Pfu EHV-L-luc-gag. Als Kontrollgruppen dienten nicht immunisierte Balb/c Mäuse mit oder ohne *Challenge*. A) 2 Tage nach dem *Challenge* wurde der Photonenfluss von je 6 weiblichen Balb/c Mäusen 5 Minuten nach Luciferin Applikation über 10 min hinweg im *in vivo Imager* gemessen. Angegeben ist jeweils der Mittelwert jeder Gruppe mit Standardabweichung. B) 36 h nach dem *Challenge* wurden von je 3 Mäusen pro Gruppe die Lungen entnommen und der Titer von EHV-L-luc-gag mittels Plaques-Assay ermittelt. Angegeben sind die mittleren Titer jeder Gruppe in Pfu / Lunge mit Standardabweichung.

Neben der Analyse von infizierten Zellen gab die Retitration von infektiösem EHV-L-luc-gag aus der Lunge der behandelten Balb/c Mäuse Aufschluss über das Replikationsvermögen der Viren. Dazu wurde 36 Stunden nach dem *Challenge* von je drei Mäusen pro Gruppe die Lunge entnommen und mit daraus hergestellten Homogenaten ein Plaque-Assay auf RK13 Zellen durchgeführt. Die ermittelten Titer zeigten eine signifikante Reduktion der Virusreplikation durch die intranasale Immunisierung, die bereits durch NYVAC *per se* erreicht wurde. Im Mittel konnte aus Lungen von Mäusen, die NYVAC-gag intranasal erhielten ( $2,8 \times 10^3$  Pfu / Lunge), zwar etwa die Hälfte an Virus isoliert werden wie aus Lungen von Mäusen, die nur NYVAC intranasal bekamen ( $5,1 \times 10^3$  Pfu / Lunge), jedoch war dieser Unterschied mit einem zweiseitigen Student T-Test nicht signifikant. Im Gegensatz dazu wirkte sich eine Immunisierung mit NYVAC bzw. NYVAC-gag über die intramuskuläre Route sogar negativ auf die Mäuse aus, da dies zu einer Erhöhung des EHV-L-luc-gag Titers (NYVAC i.m.  $2,5 \times 10^4$  Pfu / Lunge; NYVAC-gag i.m.  $2,7 \times 10^4$  Pfu / Lunge) in der Lunge im Vergleich zur nicht immunisierten Kontrollgruppe führte ( $1,2 \times 10^4$  Pfu / Lunge) (Abb. C-25B). In Korrelation zu einem Schutz vor einem infektionsbedingten Gewichtsverlust durch EHV-L-luc-gag zeigt sich hier, dass die intranasale Verabreichung von NYVAC-Vektoren Transgen-unabhängig ein antivirales Umfeld in der Lunge schafft, so dass die Replikation des *Challenge*-Virus negativ beeinflusst wird, wohingegen eine intramuskuläre Immunisierung sogar einen positiven Effekt auf die EHV-L-luc-gag Replikation in der Lunge hat. Darüber hinaus konnte jedoch auch ein Gag-spezifischer Effekt nachgewiesen werden, der zu einer signifikanten Reduktion infizierter Zellen in intranasal mit NYVAC-gag immunisierten Mäusen führt.

### **C.5.2.3 Der *Challenge* intramuskulär mit NYVAC-gag immunisierter Balb/c Mäuse erhöht die Gag-spezifischen zellulären Immunantworten in der Lunge**

Die zellulären Immunantworten in den Lungen NYVAC-gag immunisierter Balb/c Mäuse unterschieden sich vor einem *Challenge* je nach verwendeter Immunisierungsrouten deutlich in ihrer Höhe. So war die Zellzahl an Gag-spezifischen CD8<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>-Zellen in intranasal immunisierten Mäusen wesentlich größer als in Lungen intramuskulär immunisierter Balb/c Mäuse (s. C.4.2.1). Zur Untersuchung, welchen Einfluss das *Challenge*-Virus EHV-L-luc-gag auf die Anwesenheit von Gag-spezifischen zytotoxischen T-Zellen in der Lunge bzw. in der Milz (systemisch) hat, wurde die Zahl an CD8<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>-Zellen in beiden Organen vier Tage nach dem *Challenge* bestimmt (s. Abb. C-26).



**Abb. C-26) Systemische und mukosale Gag-spezifische zelluläre Immunantworten in NYVAC-gag immunisierten Mäusen nach Challenge**

Je 6 weibliche Balb/c Mäuse wurden zweimal im Abstand von 3 Wochen intranasal ( $5 \times 10^7$  Pfu) oder intramuskulär ( $10^8$  Pfu) mit NYVAC-gag oder NYVAC immunisiert. 10 Tage nach der *Booster*-Immunisierung erfolgte ein *Challenge* der Balb/c Mäuse mit  $5 \times 10^6$  Pfu EHV-L-luc-gag. 4 Tage später wurden Splenozyten bzw. Lymphozyten der Lunge isoliert und mit dem Gag-spezifischen A9I Peptid oder ohne Peptid (Medium) behandelt. Im Anschluss wurde die Anzahl CD8<sup>+</sup>/IFN-γ<sup>+</sup> Zellen pro  $3 \times 10^4$  CD8<sup>+</sup>-Zellen mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. Mäuse, die nicht immunisiert worden waren, fungierten als Negativkontrolle. Mäuse, die mit NYVAC ohne Transgen behandelt worden waren dienten zum Ausschluss von Kreuzreaktivität durch den Vektor.

Die Analyse der reaktiven T-Zellen vier Tage nach dem *Challenge* zeigte, dass in intranasal mit NYVAC-gag immunisierten Mäusen reaktive zytotoxische T-Zellen sowohl in der Lunge als auch in der Milz (wie bereits vor dem *Challenge*) gleichermaßen vorhanden sind. In intramuskulär mit NYVAC-gag immunisierten Mäusen hingegen sind auch weiterhin reaktive zytotoxische T-Zellen in der Milz nachweisbar, jedoch hat sich die CD8<sup>+</sup>/IFN-γ<sup>+</sup>-Zellzahl in der Lunge stark erhöht. Dieser Effekt könnte auf dem Einwandern von Gag-spezifischen T-Zellen in die Lunge beruhen oder aber auf eine Proliferation der bereits vor dem *Challenge* vorhandenen Gag-spezifischen T-Zellen in der Lunge hindeuten.

Intranasal immunisierte Mäuse, die bereits vor dem *Challenge* Gag-spezifische, zytotoxische T-Zellen in der Lunge aufwiesen, zeigten einen gewissen Schutz vor einem *Challenge* mit EHV-L-luc-gag, intramuskulär immunisierte Mäuse jedoch nicht. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass die zeitliche Verzögerung, bis in intramuskulär immunisierten Mäusen

vermehrt Gag-spezifische zytotoxische T-Zellen in der Lunge auftreten, ausschlaggebend ist, dass die Virusreplikation in diesen Mäusen nicht unterbunden werden konnte.

Darüber hinaus muss die Rolle der NYVAC-Vektoren bei der Modulation allgemeiner Immunantworten berücksichtigt werden, die nach einer intranasalen Applikation für verschlechterte Bedingungen hinsichtlich einer EHV-L-luc-gag Replikation in der Lunge sorgt, nach einer intramuskulären Applikation hingegen sogar verbesserte Bedingungen schafft.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine Immunisierung von Balb/c Mäusen mit NYVAC-gag Gag-spezifische zytotoxische T-Zellen in der Milz und der Lunge induziert. Dabei sind die Zellzahlen reaktiver T-Zellen in den Lungen von intranasal immunisierten Mäusen deutlich höher als die intramuskulär immunisierter Balb/c Mäuse. So weisen intranasal immunisierte Mäuse einen Gag-spezifischen Schutz vor einem EHV-L-luc-gag *Challenge* auf, intramuskulär immunisierte jedoch nicht. Darüber hinaus zeigte die intranasale Immunisierung mit NYVAC *per se* einen protektiven Effekt, der den Gewichtsverlust, die Biolumineszenzaktivität und die Replikation von EHV-L-luc-gag nach einem *Challenge* reduzierte. Intramuskulär immunisierte Mäuse hingegen verbessern sogar die Bedingungen für eine EHV-L-luc-gag Replikation in der Lunge, obwohl gezeigt werden konnte, dass sich nach einem *Challenge* in diesen Mäusen die Zellzahl an Gag-spezifischen zytotoxischen T-Zellen in der Lunge erhöht.

Daraus lässt sich schließen, dass die Immunisierungsrouten einen starken Effekt auf die immunogenen Eigenschaften der NYVAC-Vektoren hat.

## D. Diskussion

### D.1 Herstellung rekombinanter EHV-1-Vektoren

#### D.1.1 Die BAC-Technologie ermöglicht die effiziente Herstellung von rekombinanten EHV-1-Vektoren

Vor über 30 Jahren wurden erste Untersuchungen zur Funktion einzelner viraler Gene mit Hilfe von randomisiert eingefügten Punktmutationen in das Virusgenom vorgenommen. Dafür wurden chemische Substanzen verwendet um z. B. temperatursensitive Herpesviren zu generieren. Die Erfolgsrate dieser Methode war jedoch sehr gering und die Identifizierung des betroffenen Gens schwierig. Zudem war es sehr aufwendig Doppel- oder sogar Mehrfachmutationen auszuschließen (Yamanishi & Rapp, 1977).

Einen wesentlichen Fortschritt brachte das Klonieren von Plasmiden aus Virusgenomen in *E. coli*. So konnten Genome gezielt verändert, amplifiziert und charakterisiert werden, wie z. B. die adenoviraler Vektoren (Chartier *et al.*, 1996). Jedoch erwiesen sich Plasmide, die größer als 35 kb waren, in *E. coli* als instabil. Herpesviren, die eine Genomgröße von 120 kb bis 230 kb besitzen, wurden deshalb mittels homologer Rekombination direkt in Säugerzellen genetisch verändert (Spaete & Mocarski, 1987; Mocarski *et al.*, 1980). Der Nachteil dabei ist jedoch, dass die rekombinanten Herpesviren anschließend von den Wildtyp-Viren getrennt werden müssen. Dabei handelte es sich um einen sehr langwierigen Selektionsprozess, da rekombinante Viren meist wesentlich langsamer replizieren als Wildtyp-Viren.

Eine erste Möglichkeit, Herpesviren mit Hilfe molekularbiologischer Methoden zu verändern, war die Klonierung des Genoms als Satz von mehreren überlappenden Fragmenten in Cosmide. Diese wurden anschließend linearisiert und in permissive Zellen kotransfiziert, in denen mit Hilfe von homologer Rekombination ein komplettes Virusgenom wiederhergestellt wurde (van Zijl *et al.*, 1988). Dies erforderte jedoch mehrere Rekombinationsereignisse in einer Zelle, wodurch sehr häufig unerwünschte Mutationen auftraten.

Eine sehr effiziente Lösung bietet dagegen die Herstellung rekombinanter Viren mittels BAC-Technologie, wie sie auch in dieser Arbeit verwendet wurde. EHV-1 Bacmide bestehen aus dem zirkularisierten Virusgenom, in das mittels homologer Rekombination eine Mini-F Plasmid Sequenz eingefügt wurde (Adler *et al.*, 2003). Dies ermöglicht die stabile und klonale Vermehrung des kompletten EHV-1 Genoms in *E. coli* Zellen. In rekombinationskompetenten Stämmen können darüber hinaus Sequenzen der Bacmide beliebig ausgetauscht bzw. deletiert werden. Erst nach der genauen Verifizierung der genetischen Veränderung werden eukaryontische Zellen mit den rekombinanten Bacmiden transfiziert. Dort wird dann die Replikation der Viren initiiert. In permissiven Zellen, wie den

RK13 Zellen, erfolgt eine relativ schnelle Vermehrung der EHV-1, so dass nach einer Saccharosedichte-zentrifugation hochtitrigen Virusstocks mit bis zu  $10^9$  Pfu / ml gewonnen werden können.

### **D.1.2 Das EHV-1-Vektorsystem bietet die Möglichkeit abgestuft attenuierte Vektoren mit unterschiedlichen Transgenen herzustellen**

In dieser Arbeit wurden drei unterschiedlich attenuierte EHV-1 Varianten für den heterologen Gentransfer verwendet: (1) der pathogene Stamm RaCL, (2) der Impfstamm RaCH und (3) dessen Derivat mit einer UL48-Deletion. UL48 codiert für das eTIF-Protein, das als Tegumentprotein und Transaktivator des *immediate early* Promotors eine wichtige Rolle bei der Virusreplikation spielt (von Einem *et al.*, 2006). Diese Viren sind dadurch in ihrer Replikation stark eingeschränkt und weisen somit ein sehr gutes Sicherheitsprofil für ein Vektorsystem auf.

Die auf RaCH und RaCH- $\Delta$ UL48 basierten Vektoren zeigten mit einem HIV-*gag*-Reporter gen bereits gute immunogene Eigenschaften im Mausmodell. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Vektoren mit HIV-*gp120* hergestellt, das vor allem als Target für humorale Immunantworten interessant ist (s. D-3).

Darüber hinaus wurden EHV-1-Vektoren mit einem Gen für das synthetische HIV-GPN-Polyprotein generiert. Trotz der schlechteren Expressionsrate im Vergleich zu HIV-Gag und der benachteiligten Replikation von Viren, die das *gpn*-Gen tragen (s. C.1.5), besitzt das GPN-Protein den Vorteil, für eine Vielzahl an HIV-Epitopen zu codieren. Damit ist es ein interessantes Immunogen und wurde auch bereits in Kombination mit *gp120* in NYVAC-Vektoren in präklinischen und klinischen Studien eingesetzt (Wild *et al.*, 2009a; Didierlaurent *et al.*, 2004; Gomez *et al.*, 2007d; Gomez *et al.*, 2007e; Esteban, 2009; Bart *et al.*, 2008; McCormack *et al.*, 2008).

Außerdem wurde in alle drei unterschiedlich attenuierten Vektor-Varianten das Gen für eine *firefly* Luciferase eingesetzt. Dieses Reporter gen ermöglichte die Untersuchung der Transgen-Expression in der lebenden Maus (D-2 und D-5). Darüber hinaus wurde in EHV-L-luc zusätzlich ein Gen für das HIV-*gag* mittels homologer Rekombination in den *gpt*-Lokus des Mini-F Plasmids eingefügt. Dieses Virus konnte damit als chimäres HIV-*Challenge*-Virus in Balb/c Mäusen sowohl die Expression eines Reporters (Luciferase) als auch eines Immunogens (HIV-*gag*) vermitteln (s. C.5.1). Die Transduktion zweier Transgene mit Hilfe eines Vektors bietet eine Vielzahl an weiteren denkbaren Anwendungsmöglichkeiten, wie zum Beispiel eine Vakzine, die sowohl das Gen für ein Antigen als auch ein zusätzliches Adjuvans enthält. Damit wäre sichergestellt, dass beides in einer Zelle vorhanden ist und damit eine ideale synergistische Wirkung hat.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass rekombinante EHV-1-Vektoren mit Hilfe der BAC-Technologie mit relativ geringem Zeitaufwand herstellbar sind. Darüber hinaus ist es möglich, gereinigte hochtitrige Arbeitsstocks der in Zellkultur sehr stabilen Viren effizient zu produzieren. Diese sind dann für den heterologen Gentransfer für unterschiedlichste Anwendungen einsetzbar.

## **D.2 Sicherheit der EHV-1-Vektoren**

Ein maßgeblicher Aspekt für die Verwendung eines viralen Vektorsystems ist seine Sicherheit. Es muss gewährleistet sein, dass die verwendeten Viren zwar Zellen transduzieren, aber keine unkontrollierte Vermehrung stattfindet. Zudem spielen das Zielgewebe und die Stabilität des Vektors bzw. die Dauer der Transgen-Expression eine große Rolle. Für den Einsatz als Vakzine sind antigenpräsentierende Zellen primäres Ziel, um eine möglichst gute und breitgefächerte Immunantwort zu induzieren. Für einen gentherapeutischen Ansatz hingegen möchte man ganz unterschiedliche Gewebe erreichen und eine möglichst lang andauernde Transgen-Expression erzielen. In dieser Arbeit wurden zwei wichtige Aspekte der Sicherheit, die Pathogenität und die Biodistribution von EHV-1-Vektoren im Mausmodell untersucht.

### **D.2.1 Die attenuierten EHV-1-Vektoren weisen keine pathogenen Eigenschaften auf**

Die Pathogenität bezeichnet das Potential eines Erregers, in einer bestimmten Wirtsspezies Krankheiten zu erzeugen. Oft ist ein Virus nur in einer Wirtsspezies pathogen. Der natürliche Wirt von EHV-1 ist das Pferd, wo es hauptsächlich respiratorische Erkrankungen hervorruft, aber auch Aborte verursachen kann (O'Callaghan & Osterrieder, 1999). Viel seltener kommt es zu Beeinträchtigungen des zentralen Nervensystems (Kohn & Fenner, 1987).

Durch gezielte oder zufällige Mutationen von Virulenzfaktoren können Viren attenuiert werden. Eine Methode zur Herstellung solcher Viren ist das Passagieren in Zellkulturlinien. Auf diese Weise wurde der EHV-1 Impfstamm RacH erzeugt, aber auch andere aphotogene, Vektoren wie das pockenvirale MVA (Earl *et al.*, 2009). RacH wird derzeit zur Impfung von Pferden eingesetzt, die im halbjährlichen Turnus aufgrund der nur sehr kurzzeitig vorhandenen Immunität durchgeführt werden. Bei einer Verwendung EH-viraler Vektoren als Vakzine im Menschen könnte das bedeuten, dass eine eventuell erzeugte Vektorimmunität auch hier nur für kurze Zeit existiert und damit einer weiteren Immunisierung nicht im Wege steht.

In dieser Arbeit wurden die UL48-haltigen und -deletierten viralen Vektoren, die auf RacH basieren, in Bezug auf ihre Pathogenität im Mausmodell untersucht. Je stärker die Mäuse durch das Virus beeinträchtigt werden, desto mehr Körpergewicht verlieren sie. Deshalb wird der Gewichtsverlust als Maß für die Pathogenität gewertet. Mäuse, die mit einem pathogenen EHV-1 Stamm infiziert werden, verlieren innerhalb von zwei Tagen etwa zehn Prozent ihres ursprünglichen Körpergewichts von etwa 20 g je Maus. In dieser Phase besitzen die Tiere ein stumpf und struppig erscheinendes Fell und verhalten sich deutlich träge (Osterrieder *et al.*, 1995; van Woensel *et al.*, 1995b). Danach regenerieren sich Tiere innerhalb von fünf bis sechs Tagen wieder, wobei sie ihr Ausgangsgewicht wiedererlangen.

Die hier untersuchten Balb/c Mäuse erhielten die in Immunisierungsstudien maximal eingesetzte intranasale Dosis von  $1 \times 10^6$  Pfu an EHV-luc, EHV-luc- $\Delta$ UL48 und zum Vergleich an pathogenem Stamm EHV-L-luc. Die EHV-L-luc infizierten Balb/c Mäuse zeigten den typischen Krankheitsverlauf einer experimentellen Infektion. Bei den EHV-luc oder EHV-luc- $\Delta$ UL48 infizierten Mäusen waren keinerlei klinische Symptome zu beobachten. Sie unterschieden sich äußerlich nicht von unbehandelte Tieren.

So besitzen sowohl EHV-luc als auch EHV-luc- $\Delta$ UL48 bei einer Dosis von  $10^6$  Pfu keine pathogenen Eigenschaften in Balb/c Mäusen.

In Menschen erwiesen sich bisher auch nicht-attenuierte EHV-1 als apathogen. Dennoch sind für eine humane Anwendung attenuierte Vektoren zu bevorzugen, um jegliches Sicherheitsrisiko auszuschließen. Es wurde bereits gezeigt, dass EHV-1 basierend auf dem RacH-Stamm in humanen Zellen *in vitro* eine stark verminderte Replikationsfähigkeit aufweist und UL48-defiziente Viren sogar keinerlei Nachkommenviren mehr produzieren können. Immunisierungsstudien mit EHV-1-Vektoren in Mäusen zeigten jedoch, dass eine geringe Replikationsfähigkeit für die immunogenen Eigenschaften positiv sein kann und sich eine zu starke Attenuierung deshalb nachteilig auf die induzierten Immunantworten auswirkt. Deshalb müssen die hohen Sicherheitsansprüche an ein Vektorsystem mit dessen Nutzen eingehend abgewogen werden.

### **D.2.2 Biodistribution von EHV-1-Vektoren**

Die Biodistribution gibt Aufschluss über die Ausbreitung und Zielorgane des Vektors und zeigt auf, welche Gewebe von eventuell toxischen Effekten betroffen sein können. Zudem ist es für gentherapeutische Ansätze von äußerst großer Bedeutung, welche Zielgewebe schließlich das gewünschte Transgen exprimieren und für eine Vakzine, welcher Arm des Immunsystems schließlich angesprochen wird.

### **D.2.2.1 Die Distribution der EHV-1-Vektoren hängt von der Applikationsroute ab**

Die gängigste Methode für eine Vakzinierung stellt die Injektion in den Muskel dar. Es hat sich jedoch gezeigt, dass die Immunisierungsrouten einen großen Einfluss auf die induzierten Immunantworten haben kann (Johansson et al., 2001; Hervouet et al., 2010). Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb die Biodistribution von EHV-1 für die intramuskuläre und darüber hinaus die intranasale Route im Mausmodell untersucht. Für beide Routen konnte bereits gezeigt werden, dass EHV-1 gute zelluläre und humorale Immunantworten im Mausmodell induzieren kann. Bei einer intranasalen Applikation waren überdies auch Transgen-spezifische, mukosale Immunantworten in Form von Gag-spezifischen sekretorischen IgA in Bronchoalveolaren Lavagen nachweisbar.

Die Analyse der Biodistribution erfolgte mit viralen Vektoren, die für eine *firefly* Luciferase codieren. Damit konnte die Biolumineszenz der infizierten Mäuse mit Hilfe einer CCD-Kamera über mehrere Tage hinweg *in vivo* bestimmt und so Aufschluss über die Kinetik und Distribution der Vektoren erhalten werden. Da die Halbwertszeit der Luciferase *in vivo* fünf bis sieben Minuten beträgt, ist die Menge an Transgen, die für die Biolumineszenzaktivität ausschlaggebend ist, auch die, die unmittelbar zum Zeitpunkt der Messung exprimiert worden war (Shinoda et al., 2006).

Für die Analyse der Biodistribution wurden Balb/c Mäusen EHV-luc, EHV-luc- $\Delta$ UL48 sowie, zum Vergleich, pathogenes EHV-L-luc in unterschiedlich hohen Dosen ( $10^4$  bis  $10^6$  Pfu) intranasal bzw. intramuskulär verabreicht. Bereits sechs Stunden nach der Infektion konnte Luciferase-Aktivität beobachtet werden, die vier bis fünf Tage anhielt. Das Maximum wurde nach 48 Stunden erreicht. Dabei zeigte sich, dass bei einer intranasalen Applikation die Vektoren in der Nase und Lunge verbleiben, bei einer intramuskulären Verabreichung im injizierten Muskel.

Da für eine HIV-1 Vakzine die Präsentation der Antigene an Immunzellen eines mukosalen Gewebes von größerer Bedeutung ist als eines Muskels, wurden weitergehende Untersuchungen mit intranasal immunisierten Mäusen durchgeführt. Sowohl im Mausmodell als auch im Menschen konnte gezeigt werden, dass nasale Immunisierungen eine mukosale Immunantwort in der vaginalen und der oralen Mukosa hervorrufen können (Yuki et al., 2007; Bergquist et al., 1997; Johansson et al., 2001).

### **D.2.2.2 Die attenuierten, UL48-haltigen EHV-1-Vektoren weisen die meisten Genom-Äquivalente und damit die stärkste Transgen-Expression auf**

Die Aufnahmen mit einer CCD-Kamera erlauben nur zweidimensionale Analysen und schließen den Verlust von schwächeren Signalen aus tiefer gelegenen Schichten durch

Streulichteffekte und Absorption durch das umliegende Gewebe oder von diffusen Signalen (z. B. einer Population von Blutzellen) nicht aus. Zur Verifizierung der *in vivo Imaging* Daten wurden deshalb zum Zeitpunkt der maximalen Luciferase Aktivität, also zwei Tage nach einer intranasalen Verabreichung, Organe (Lunge, Herz, Gehirn, Nase, Milz, Leber, Nieren) entnommen, homogenisiert und mit Hilfe eines Luciferase-Assays *ex vivo* auf Luciferase Aktivität hin untersucht. Zudem wurde aus diesen und weiteren Geweben, die für einen zusätzlichen Luciferase-Assay nicht genügend zu untersuchendes Material lieferten, (Ovarien, Lymphknoten, Blut und Ganglion trigeminale (Ort der Latenz in Pferden (Slater *et al.*, 1994))) DNA isoliert. Anschließend wurde mit Hilfe einer quantitativen *Real Time* PCR (qRT-PCR), die derzeit meist angewandte Methode für die Analyse der Biodistribution von viralen Vektoren (Gonin & Gaillard, 2004), die Anzahl an EHV-Genomäquivalenten bestimmt. Sowohl die *Live Imaging* Daten, als auch der Luciferase-Assay und die Bestimmung von viraler DNA in den Mäusegeweben mit Hilfe einer qRT-PCR zeigten, dass EH-virale Vektoren nach intranasaler Applikation ausschließlich in der Nase und Lunge verbleiben. EHV-luc weist dabei 260 mal mehr Genom-Äquivalente in der Lunge und 9 mal mehr in der Nase auf als die UL48-deletierte Variante. Interessanterweise ist EHV-luc tendenziell sogar in höherer Kopienzahl in Nase und Lunge vorhanden als das pathogene EHV-L-luc, ohne in den Versuchstieren klinische Symptome auszulösen (s. Tab. D-1).

Vektor	Genome / 10 ng DNA der Lunge	Genome / 10 ng DNA der Nase
<b>EHV-luc-ΔUL48</b>	$5 \times 10^1$	$5 \times 10^1$
<b>EHV-luc</b>	$1,3 \times 10^4$	$4,4 \times 10^2$
<b>EHV-L-luc</b>	$3,1 \times 10^3$	$4,4 \times 10^2$

**Tab. D-1) Anzahl der Genomäquivalente an EHV-luc-ΔUL48, EHV-luc und EHV-L-luc in Lungen und Nasen infizierter weiblicher Balb/c Mäuse**

Mittels qRT-PCR wurde die Anzahl an Vektorgenomen je 10 ng eingesetzter Gesamt-DNA bestimmt. Angegeben ist jeweils der Mittelwert von drei Tieren zum Zeitpunkt maximaler Transgen-Expression, also 2 Tage nach der Infektion.

Dies muss eine Folge der Veränderungen des Virus während der Attenuierung durch Passagieren in Schweinenierenzellen sein. Es ist bekannt, dass RaCH dabei durch eine Gen-Deletion den Hauptvirulenzfaktor IR6 verloren hat. Dabei handelt es sich um ein Protein, das an dem Behüllungsprozess der Nukleocapside an der inneren Kernmembran beteiligt ist, wobei die genauen Wechselwirkungen von IR6 jedoch noch nicht geklärt sind (Osterrieder *et al.*, 1998; Osterrieder *et al.*, 1996b). Darüber hinaus könnten während des Passagierens Veränderungen der viralen Oberflächenproteine aufgetreten sein, die die Infektion von Mauszellen begünstigen. Denkbar wäre auch ein Verlust immunodominanter Epitope, die vom Immunsystem der Maus erkannt werden, wodurch eine verringerte Vektorimmunität gegen RaCH-Viren die Folge wäre. Dagegen führen die pathogenen

Eigenschaften des Racl-Stamms zu einer Aktivierung des Immunsystems und dadurch zu einer stärkeren Abwehr gegen Racl.

Die Untersuchung von Balb/c Mäusen zwei Wochen nach einer Infektion ergab keinerlei Spuren von Transgen oder viraler DNA und damit keinerlei Anzeichen für eine Latenz der EHV-1-Vektoren.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl EHV-luc als auch EHV-luc- $\Delta$ UL48 bei einer Dosis von  $10^6$  Pfu keine pathogenen Eigenschaften in Balb/c Mäusen aufweisen. Dabei bleiben die Vektoren auf das Gewebe, in das sie verabreicht wurden, beschränkt. Eine Infektion mit EHV-luc stellt tendenziell sogar mehr Transgen zur Verfügung als mit nicht-attenuierten Racl basierten Vektoren. Dagegen führt eine weitere Attenuierung durch die Deletion von UL48 zu Vektoren, die nur noch sehr eingeschränkt Transgen-Expression vermitteln können.

Vor dem Hintergrund, dass die Vektoren wie in *in vitro* Experimenten gezeigt nicht mehr (EHV-luc- $\Delta$ UL48) oder nur in sehr geringem Maß (EHV-luc) in humanen Zellen replizieren, besitzen EHV-1-Vektorsystem also ein sehr gutes Sicherheitsprofil.

### **D.2.2.3 Bei EHV-1-Vektoren genügen vergleichsweise kleine Mengen für eine gute Transgen-Expression über mehrere Tage**

Auch für das Ad5-, NYVAC- und MVA-Vektorsystem wurden rekombinante Vektoren mit einer *firefly* Luciferase hergestellt. Diese wurden ebenfalls für die Untersuchung der jeweiligen Biodistribution im Tiermodell genutzt und dazu Aufnahmen der Lichtemission mit einer CCD-Kamera erstellt (Wu et al., 2001; Gomez et al., 2007c; Wood et al., 1999). Zusätzlich wurden Ad5-Vektoren mit Hilfe einer qRT-PCR nachgewiesen (Johnson et al., 2006b).

Dabei konnten die Ad5-Vektoren nach intranasaler Verabreichung von  $5 \times 10^7$  oder  $10^8$  Pfu ebenfalls in der Lunge und der Nase detektiert werden, darüber hinaus aber auch in der Leber und in Lymphknoten von Balb/c Mäusen. Die maximale Transgen-Expression findet drei Tage nach Inokulierung statt und kann in der Lunge auch noch nach 12 Tagen in geringem Maß festgestellt werden. (Damjanovic *et al.*, 2008; Oualikene *et al.*, 1994). Über die intramuskuläre Route war Virus in den untersuchten Organen ausschließlich in den nahe des injizierten Muskel gelegenen Lymphknoten nachweisbar. Nach 31 Tagen konnten im Mausmodell keine Ad5-Vektoren mehr nachgewiesen werden (Oualikene *et al.*, 1994). Darüber hinaus wurde die Transgen-Expression solcher Ad5-Vektoren nach Applikation über verschiedene Routen in Mäusen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass durch intravenöse oder intraperitoneale Verabreichung von  $1 \times 10^8$  Pfu andere Organe wie Niere, Milz oder Prostata erreicht werden, die 14 Tage nach der Injektion immer noch hohe Luciferase-Aktivität aufweisen (Johnson et al., 2006a).

Untersuchungen zu pockenviralen rekombinanten Vektoren wie MVA und NYVAC, bei denen jeweils  $10^7$  Pfu verabreicht wurden, zeigten ebenfalls eine große Abhängigkeit der Biodistribution und der Transgen-Expression von der Applikationsroute. Dabei ergab eine intramuskuläre Injektion die höchste Transgen-Expression, gefolgt von einer intraperitonealen. Die streng intrakutane, intrarektale oder intranasale Applikation lieferte kaum oder gar keine Transgen-Expression. Dabei konnte für die intramuskuläre Route mit fünf Tagen die längste Lumineszenz-Aktivität nachgewiesen werden (Gomez et al., 2007b). Eine weitere Studie, in der mukosale Immunisierungen mit jeweils  $5 \times 10^7$  Pfu rekombinanten MVA-Vektoren über verschiedene Routen verglichen wurden, zeigte ausschließlich nach einer intranasalen Verabreichung eine Transgen-Expression in der Lunge sowie lokalen Lymphknoten und nasal assoziierten Lymphgeweben für nur zwei Tage. Nach einer intrarektalen oder intravaginalen Immunisierung blieben dagegen alle untersuchten Organe negativ (Ramirez et al., 2003).

Da die hier verwendeten Infektionsdosen der pockenviralen und Ad5-Vektoren wesentlich höher sind als die, die zur Untersuchung der EHV-1-Vektoren eingesetzt wurden, ist ein direkter Vergleich der Biodistribution nicht möglich. Dennoch zeigt eine Gegenüberstellung der Ergebnisse nach einer intranasalen Verabreichung die Vorzüge der EHV-1-Vektoren. So weisen diese schon bei einer relativ geringen Dosis eine Transgen-Expression über sechs Tage in der Lunge auf ohne sich dabei auf andere lebenswichtige Organe wie die Leber auszubreiten. Damit werden unerwünschte inflammatorische Prozesse und damit verbundene Gewebeschädigungen vermieden.

Des Weiteren wäre auch für EHV-1 die Untersuchung weiterer Applikationsrouten interessant, wie z. B. die intrarektale oder intravaginale, inwiefern diese zur Induktion von Antigen-Expression in mukosalen Geweben eingesetzt werden können.

Darüber hinaus wäre für eine Verwendung von EHV-1-Vektoren für gentherapeutische Zwecke die Untersuchung systemischer Routen aufschlussreich, ob weitere Organe durch die EHV-1-Vektoren erreicht werden könnten.

### **D.3 Immunogene Eigenschaften von EHV-1-Vektoren**

Virale Vektorsysteme werden bereits seit einigen Jahren für den Einsatz als Vakzine evaluiert. Das Ziel einer Vakzinierung ist es, eine lang anhaltende Immunantwort mit einem protektiven Schutz vor einer Infektion mit einem bestimmten Erreger zu induzieren. Wichtige Kriterien zur Bewertung einer Vakzine sind deshalb die Art, Stärke und Dauer der induzierten Antigen-spezifischen Immunantworten.

Für eine HIV-Vakzine ist die Induktion einer schützenden mukosalen Immunität von besonderem Interesse, um das Virus bereits an seinen häufigsten Eintrittspforten, den Schleimhäuten des Genital- und Rektalbereichs, abzufangen. Alle bisher gewonnenen Daten

weisen darauf hin, dass sich die Korrelate einer schützenden Immunantwort aus einer qualitativ sowie quantitativ guten humoralen und zellulären Immunantwort zusammensetzen (Harrer *et al.*, 1996) (Shacklett *et al.*, 2009; Veazey *et al.*, 2003) (Pantaleo & Koup, 2004).

In Immunisierungsstudien mit dem HIV-*syngag* als Reporterkonstrukt konnte im Mausmodell bereits gezeigt werden, dass EHV-1-Vektoren unter Verwendung eines heterologen *Prime/Boost* Schemas (subkutaner pc-*syngag Priming* und zweifacher nasaler *Boost* mit EHV-*syngag*) i) eine sehr gute Transgen-spezifische systemische CTL-Antwort auslösen, ii) gute Gag-spezifische sekretorischer IgA-Titer induzieren und iii) die Bildung großer Mengen von Th1-polarisierten Gag-spezifischen Antikörpern vermitteln und dementsprechend besonders den zellulären Arm der adaptiven Immunabwehr stimulieren. Somit ist das EH-virale Vektorsystem vielversprechend für den Einsatz als HIV-Vakzine.

### **D.3.1 Die EHV-gp120-Vektoren induzieren gute zelluläre und humorale Immunantworten**

In dieser Arbeit wurde basierend auf den Daten der Immunisierungsstudien mit EHV-*syngag*-Vektoren die Induktion von HIV-gp120-spezifischen humoralen und mukosalen Immunantworten durch das rekombinante EHV-gp120 untersucht. Gp120 ist ein glykosyliertes Hüllprotein von HIV und sitzt somit auf der Oberfläche des Viruspartikels, wo es für Antikörper zugänglich ist. Aufgrund der starken Variabilität der natürlich vorkommenden HIV-Hülle kann dies jedoch nur ein Modell für eine HIV-Vakzine bieten, mit dem Ziel vor allem spezifische Antikörper zu induzieren.

Für die Immunisierungsstudien im Mausmodell wurden Balb/c Mäuse jeweils mit  $10^5$  Pfu EVH-gp120 oder mit  $10^6$  Pfu EVH-gp120- $\Delta$ UL48 immunisiert. Wie die Biodistributionsanalyse gezeigt hatte, erzielten die  $\Delta$ UL48-defizienten Vektoren trotz einer zehnfach höheren Infektionsdosis wesentlich geringere Mengen an Transgen-Expression als  $\Delta$ UL48-haltige Vektoren. Damit ergab sich auch eine verminderte Fähigkeit gp120-spezifische Immunantworten zu induzieren. Darüber hinaus verringert der Replikationsdefekt der EVH-gp120- $\Delta$ UL48-Vektoren wahrscheinlich auch den adjuvierenden Effekt, der durch die Infektion selbst entsteht. Damit beweisen diese Vektoren jedoch auch ein sehr hohes Sicherheitspotential und machen sie aufgrund der geringen immunogenen Eigenschaften für einen gentherapeutischen Einsatz interessant.

Die Applikation der EH-viralen Vektoren erfolgte intranasal, da damit, abgesehen von der intraperitonealen Route, im Vergleich zu einer intramuskulären, subkutanen oder intravenösen Applikation die besten Gag-spezifischen Immunantworten erreicht werden konnten. Das Immunisierungsschema folgte einer heterologen *Prime/Boost* Strategie mit einer DNA-Grundimmunisierung und zwei intranasalen *Booster*-Immunisierungen mit rekombinantem EHV-1. Dadurch konnte mit EHV-*syngag* nicht nur eine systemische sondern

auch eine Transgen-spezifische, mukosale Immunantwort induziert werden (Hofmann-Sieber et al., 2010). Auch mit EHV-gp120 und EHV-gp120- $\Delta$ UL48 konnten so gute Transgen-spezifische systemische zelluläre und humorale Immunantworten induziert werden. Besonders die induzierten IgA-Titer in bronchoalveolaren Lavagen der immunisierten Mäuse zeigen das Potential des EHV-1-Vektorsystems, als HIV-Impfstoffkandidat spezifische Antikörper in der Mukosa hervorzurufen.

Auch für andere Vektorsysteme wie das der MVA-, NYVAC- oder Ad5-Vektoren hat sich die Immunisierung nach einem DNA-*Prime* als die derzeit beste Strategie erwiesen (Puaux & Michel, 2003; McCormack et al., 2008; Wild et al., 2009a). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von Adjuvantien die Immunantworten erheblich verbessern kann. So erhöhte die Kombination von MVA-Vektoren mit dem Cholera Toxin B (CTB) sowohl die zellulären als auch mukosalen Immunantworten im Mausmodell deutlich (Gherardi et al., 2004).

Deshalb sollte untersucht werden, ob die bereits guten zellulären und humoralen Immunantworten, die mit dem EHV-1-Vektorsystem durch eine heterologe *Prime/Boost* Strategie induziert werden, durch die Verwendung von Adjuvantien wie CpG-Oligonukleotide oder CTB noch verbessert werden können. Insbesondere CTB erwies sich als sehr vielversprechend für die Verstärkung von mukosalen Immunantworten (Hervouet et al., 2010). Darüber hinaus konnte man zeigen, dass eine intranasale Verabreichung von CTB an Menschen sehr gute humane mukosale Immunantworten im Genitaltrakt hervorruft, die sogar besser waren als nach einer intravaginalen Immunisierung (Johansson et al., 2001).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass EHV-gp120 gute Env-spezifische humorale und zelluläre Immunantworten induzierte, die in ihrer Qualität und Höhe mit der durch EHV-syngag hervorgerufenen Gag-spezifischen Immunantworten vergleichbar waren. Dabei ist eine heterologe Impfstrategie mit einem DNA-*Prime* und zweifachem EHV-*Boost* vor allem für die Induktion mukosaler humoraler Immunantworten zu favorisieren. Die UL48-haltigen Vektoren bewiesen dabei stets bessere immunogene Eigenschaften als die UL48-defizienten Varianten, trotz der Verwendung einer zehnfach geringeren Immunisierungsdosis. Damit zeigen sich rekombinante, auf RacH basierende EHV-1-Vektoren als vielversprechende HIV-Impfstoffkandidaten, wohingegen die UL48-defizienten Vektoren eher für einen gentherapeutischen Gebrauch nützlich sein könnten.

### **D.3.2 Die EHV-1-Vektoren können humane antigenpräsentierende Zellen transduzieren und damit HIV-spezifische humane T-Zellen stimulieren**

Einen Hinweis darauf, dass EHV-1 Vektoren auch T-Zell-Antworten im Menschen induzieren, lieferten Daten unserer Gruppe, die zeigten, dass *in vitro* generierte Dendritische Zellen durch EHV-1-Vektoren transduziert und aktiviert werden können. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass rekombinante EHV-1 auch in anderen humanen antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen, Monozyten oder B-Zellen Antigen-Expression vermitteln können. Damit können Antigene prozessiert und auf MHC-I-Molekülen zur Aktivierung von T-Zellen präsentiert werden. Zum einen sind die EHV-1-Vektoren damit vielversprechend als Vakzine zur T-Zell-Aktivierung, zum anderen könnten sie damit als kostengünstige Alternative zu rekombinanten Peptiden für *ex vivo* T-Zell-Analysen eingesetzt werden.

Für die Entwicklung einer Vakzine ist es wichtig, die Antigen-spezifischen Immunantworten im Menschen effizient messen zu können. Dazu wurden unterschiedliche Methoden zum quantitativen Nachweis von Zellen, die Immunglobuline, Cytokine oder andere Effektormoleküle produzieren, entwickelt. Zwei gängige Methoden zur Bestimmung von T-Zell-Antworten sind der *enzyme linked immunospot* Assay (ELISpot) und die Durchflusszytometrie. Beide ermöglichen den Nachweis von zellulären Immunantworten als Reaktion auf eine Stimulation mit einem spezifischen Antigen. Beim ELISpot werden dabei sekretierte Moleküle über immobilisierte Antikörper nachgewiesen. Für die Durchflusszytometrie werden die Zellen mit Stoffen wie Brefeldin A behandelt, die die Sekretion von Proteinen aus einer Zelle blockieren. Damit können z. B. Cytokine wie IFN- $\gamma$  mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten Antikörpern intrazellulär detektiert werden (Sun *et al.*, 2003).

Derzeit werden die Antigene für die T-Zell-Assays in Form von Peptiden bereitgestellt. Um ein komplettes Proteom zu analysieren, werden Sets aus Peptiden mit mindestens zehn überlappenden Aminosäuren verwendet. So wird gewährleistet, dass jedes bis zu elf Aminosäuren lange Epitop auf MHC-Molekülen präsentiert werden kann. Für HIV-1 werden dafür beispielsweise 410 überlappende 18 Aminosäuren lange Peptide eingesetzt (Streeck *et al.*, 2009).

Als kostengünstigere Alternative könnten EHV-1-Vektoren die Antigene unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors für *ex vivo* Analysen in humane, antigenpräsentierende Zellen einbringen. Dabei ist auch von Vorteil, dass die EHV-1-Vektoren ebenfalls gefrierkonservierte PBMCs transduzieren. Damit können T-Zell-Assays auch zeitlich unabhängig von der Probenentnahme mit transduzierten, autologen Zellen für die Antigenpräsentation durchgeführt werden.

Im Rahmen einer Kooperation wurden von der Arbeitsgruppe von Professor Pantaleo (Universität Lausanne, Schweiz) ELISpots mit EHV-1-Vektoren durchgeführt und dabei mit Peptiden als Antigene verglichen (unveröffentlichte Daten). Hierzu wurden immortalisierte B-Lymphozyten mit EHV-gpn bzw. mit EHV als Negativkontrolle (m.o.i. 10) transduziert oder mit Gag-spezifischen Peptiden für 12 Stunden inkubiert. Diese wurden mit HLA-identischen PBMCs von drei HIV-positiven Probanden für 14 Stunden kokultiviert und anschließend IL-2 und IFN- $\gamma$  produzierende CD8<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen. Dabei konnten bei allen Spendern CD8<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>-Zellen und CD8<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-2<sup>+</sup>-Zellen detektiert werden, deren Anzahl sowohl nach Stimulation mit EHV-gpn als auch Peptiden vergleichbar war.

Damit könnten EHV-1-Vektoren eine kostengünstigere Alternative zu Peptiden für *ex vivo* T-Zell-Analysen darstellen.

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass EHV-1-Vektoren *in vitro* antigenpräsentierende Zellen transduzieren und damit spezifische T-Zellen reaktivieren können. Damit können sie zum einen für *ex vivo* Analysen von T-Zellantworten im ELISpot eingesetzt werden, zum anderen weist das darauf hin, dass die EHV-1-Vektoren auch im humanen System vielversprechende Vakzinekandidaten darstellen.

#### ***D.4 EHV-L-luc-gag als Challenge-Modell in Balb/c Mäusen zur Ermittlung des Potentials von NYVAC-gag als HIV-Vakzine***

##### **D.4.1 Die EHV-L-luc-gag-Vektoren können als Challenge gag-spezifischer, zellulärer Immunantworten im Mausmodell genutzt werden**

Eines der größten Hindernisse bei der Entwicklung einer HIV-Vakzine ist das Fehlen eines geeigneten Kleintiermodells zur Überprüfung der Effektivität von Impfstoffkandidaten. Grund dafür ist das enge Wirtsspektrum von HIV-1, das sich auf Menschen und Schimpansen beschränkt. Ein *Challenge*-Modell in Kleintieren würde unter anderem den Einsatz größerer Tierzahlen und damit signifikante Ergebnisse ermöglichen als es derzeit mit den ethnisch schwer vertretbaren Versuchen mit Primaten der Fall ist. Damit würde die Aufklärung der schützenden Korrelate vor einer Infektion wesentlich erleichtert werden und somit auch die Entwicklung einer effizienten Vakzine.

Ein Ansatz eine Infektion mit HIV-1 in Mäusen zu ermöglichen, ist die Generierung von Mäusen, die mit einem humanen Immunsystem ausgestattet wurden. Jedoch sind in diesen Modellen derzeit noch keine Langzeitstudien möglich, da das humane Immunsystem nicht stabil erhalten bleiben kann. Darüber hinaus werden meist nicht alle Typen an humanen

Immunzellen gebildet und damit fehlt die komplexe Wechselwirkung der unterschiedlichen Zellen (Boberg *et al.*, 2008; Borkow, 2005).

Eine andere Möglichkeit ein *Challenge*-System für HIV im Mausmodell zu etablieren, ist der Einsatz von chimären Viren, die in Mäusen replizieren können. Damit ist das Modell unabhängig von genetisch veränderten Mäusen und lässt die Beobachtung der Interaktionen von HIV-1 mit einem intakten Immunsystems zu. Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass das Immunsystem von *Outbred*-Mäusen die Immunreaktion realistischer nachbildet als das von Inzucht-Stämmen (Im & Hanke, 2007).

Als chimäre Viren wurden bereits attenuierte Vakzinia Viren verwendet, in deren Genom Gene von HIV sowie ein Luciferase-Gen als Reporter integriert wurden. Diese Viren sind zu einer Replikation in unterschiedlichen Organen der Maus wie z. B. im Uterus oder den Ovarien fähig. Dabei werden sowohl die HIV-Immungene als auch die Luciferase exprimiert. Induzierte ein HIV-Impfstoffkandidat in diesen Mäusen zuvor eine spezifische Immunantwort, so zeigt eine Reduktion der *Challenge*-Virus-Replikation sowie der Luciferase-Aktivität in den entsprechenden Geweben die Effektivität des potentiellen Impfstoffes. Ein wesentlicher Nachteil der rekombinanten Vakzinia-Viren ist jedoch, dass sie aufgrund ihres Zelltropismus nicht die gleichen Zielzellen wie HIV besitzen, insbesondere auch keine Zellen der Mukosa infizieren und damit nicht der mukosale Schutz einer Vakzine getestet werden kann (Huang *et al.*, 2009; Belyakov *et al.*, 1998; Shinoda *et al.*, 2006). Dieser wäre aber zur Vermeidung einer HIV Infektion besonders wichtig, da die CD4<sup>+</sup>-Zellen der Mukosa das erste Ziel des Virus darstellen (Veazey *et al.*, 1998; Mehandru *et al.*, 2004). HIV-1, das mit dem Hüllprotein gp80 des murinen Leukämievirus (MLV) pseudotypisiert wurde, infiziert dagegen murine Zellen wie Lymphozyten und Makrophagen, was dem Zelltropismus von HIV-1 im Menschen entspricht. Darüber hinaus kommt es auch in der Maus zu einem früh einsetzenden Befall von Neuronen und inflammatorischen sowie antiviralen Immunantworten im Gehirn. Trotzdem sind die pseudotypisierten MLV aber nur wenig virulent und lösen keine Zeichen einer Krankheit aus. Da diese Viren darüber hinaus kein Reporter gen besitzen, wurde die Auswirkung des *Challenge* auf das Immunsystem über die Ermittlung systemischer, reaktiver CD8<sup>+</sup>-Zellen im Blut bzw. der Milz und über Bestimmung der Kopienzahl an pseudotypisierten HIV-1 in Splenozyten und peritonealen Makrophagen ermittelt (Potash *et al.*, 2005; Roshorn *et al.*, 2009). Diese Daten sind zum einen experimentell aufwendig zu ermitteln und lassen zum anderen wiederum keine Aussage über mukosale Immunantworten zu.

Trotzdem bieten chimäre Viren eine relativ günstige Methode zum Auslesen von T-Zell-Antworten. Die humoralen Antworten spielen bei der Abwehr der viralen *Challenge*-Infektion nur eine untergeordnete Rolle, da die Immungene erst nach Infektion einer Zelle exprimiert und damit hauptsächlich über die Präsentation der prozessierten

Proteine über MHC-I-Komplexe für das Immunsystem zugänglich werden. Dabei werden spezifische CD8<sup>+</sup>-Zellen durch die Wechselwirkung ihrer T-Zell-Rezeptoren mit den Peptid-MHC-I-Komplexen aktiviert. In diesem Zusammenhang zeigen spezifische Antikörper lediglich bei Komplement-vermittelten Immunreaktionen oder bei der Antikörper-vermittelten Cytotoxizität eine geringe Auswirkung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein EHV-1-Vektor als *Challenge*-Virus eingesetzt, der auf dem pathogenen RaCL Stamm basiert. Dieses Virus wurde bereits als *Challenge*-Virus zur Testung von EHV-1 Vakzine für Pferde im Mausmodell verwendet (Osterrieder *et al.*, 1995). Damit der Vektor auch als HIV-*Challenge*-Virus eingesetzt werden konnte, wurde das HIV-*gag*-Gen (97CN001) zusätzlich zu einem *Luciferase*-Gen in das Genom des Vektors eingefügt. Es wurde gezeigt, dass beide Transgene in infizierten RK13-Zellen gut exprimiert werden und sich das Virus in Bezug auf die Biodistribution und die Pathogenität im Mausmodell nach einer intranasalen Verabreichung zum parentalen EHV-L-luc nicht unterscheidet. Aufgrund der Lokalisation der Vektoren in der Lunge, sollte ein Schutz vor dem *Challenge*-Virus hauptsächlich durch dort vorhandene mukosale CTL-Antworten gegeben sein.

#### **D.4.2 Die NYVAC-Vektoren beeinflussen das Immunsystem abhängig von der jeweiligen Applikationsroute**

Um reaktive Gag-spezifische CTL in Mäusen zu induzieren, wurde NYVAC-gag als Vakzinekandidat verwendet. Das hier verwendete Immunogen Gag (97CN001) enthält viele konservierte Epitope, die von CTL erkannt werden können und ist dem zufolge zur Induktion zellulärer Immunantworten gut geeignet. Das Gag-Protein ist bei einer HIV-Replikation am *Budding*-Prozess der Viruspartikel beteiligt. Die Expression ohne den Kontext einer HIV-Replikation hat zur Folge, dass Gag-Proteine durch Anlagerung an der Cytoplasmamembran-Innenseite infizierter Zellen das Abschnüren von Lipid-Protein-Vesikeln bewirken. Diese virusähnlichen Partikel (VLPs) können durch professionelle antigenpräsentierende Zellen aufgenommen werden, im Zellinneren abgebaut und die Peptide wiederum über MHC-I Moleküle an CD8<sup>+</sup>-Zellen präsentiert werden (sogenanntes *cross priming*) (Bozzacco *et al.*, 2010; Tsunetsugu-Yokota *et al.*, 2003). Damit können die zellulären Immunantworten gegen Gag verstärkt angesprochen werden.

Aufgrund von Biodistributionsstudien von NYVAC in Mäusen ist bekannt, dass der Vektor nach einer intranasalen Verabreichung in Lungen und Nasen und nach einer intramuskulären Verabreichung im injizierten Muskel sowie den assoziierten Lymphknoten nachweisbar ist (Gomez *et al.*, 2007a). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass über beide Routen durch NYVAC-gag Transgen-spezifische CD8<sup>+</sup>/INF $\gamma$ <sup>+</sup>-Zellen in der Lunge und

auch in der Milz induziert werden, wobei die Zahl der Gag-spezifischen CD8<sup>+</sup>/INF $\gamma$ <sup>+</sup>-Zellen in der Lunge nach einer intramuskulären Immunisierung nur sehr gering war. Deshalb waren intramuskulär mit NYVAC-gag-immunisierte Mäuse höchstwahrscheinlich nicht vor einem intranasalen *Challenge* mit EHV-L-luc-gag geschützt. So zeigten sie im Vergleich zu nicht-immunisierten oder zu NYVAC-immunisierten Mäusen keinen Unterschied im Krankheitsverlauf oder der Biolumineszenzaktivität. Bei einer Retitration von EHV-L-luc-gag aus Lungen von Mäusen, die mit NYVAC-gag bzw. NYVAC intramuskulär immunisiert worden waren, konnte zwei Tage nach dem *Challenge* sogar mehr Virus isoliert werden als aus Lungen nicht-immunisierter Mäuse. Eine intramuskuläre Immunisierung mit rekombinanten NYVAC führte also sogar zu Bedingungen, die eine HIV-Infektion erleichtern. Da diese Ergebnisse Transgen-unabhängig waren, muss die Ursache durch den viralen Vektor selbst hervorgerufen worden sein. Dabei könnten eventuell *immune escape* Mechanismen der pockenviralen Vektoren eine Rolle spielen, die ein förderliches Milieu für eine weitere virale Infektion schaffen.

Eine intranasale Immunisierung mit NYVAC-Vektoren hingegen führte zu einer Reduktion des Gewichtsverlusts sowie der EHV-L-luc-gag-Virustiter in der Lunge zwei Tage nach dem *Challenge*. Darüber hinaus wurde die Biolumineszenzaktivität durch die intranasale NYVAC-gag Immunisierung im Vergleich zu nicht-immunisierten und mit NYVAC-immunisierten Balb/c Mäuse signifikant verringert. Dies zeigt den großen Einfluss der Immunisierungsrouten auf die Effektivität eines Impfstoffes. Auch für die klinische „STEP“ Studie, in der Probanden rekombinante Ad5-Vektoren injiziert wurden, wird angenommen, dass die HIV-Vakzinekandidaten die Ansteckungsgefahr mit HIV-1 sogar erhöhten als verringerten (Buchbinder *et al.*, 2008). Es besteht noch immer Klärungsbedarf, worin die Ursachen für das Versagen des Impfstoffkandidaten liegen (siehe auch A.1.3.4.2).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass rekombinante pathogene EHV-1-Vektoren interessante Kandidaten zur Evaluation von HIV-Vakzinekandidaten im Mausmodell darstellen. Dabei stellte sich bei der Untersuchung der schützenden Effekte durch rekombinante NYVAC-Vektoren die Wichtigkeit der Immunisierungsrouten heraus. So zeigte sich kein oder sogar ein negativer Effekt nach einer intramuskulären Immunisierung, wohingegen eine intranasale Immunisierung einen gewissen Schutz vor einem EHV-L-luc-gag-*Challenge* aufweist. Dieser Schutz ist jedoch nicht nur durch das Immunogen gegeben, sondern wird vor allem durch den viralen Vektor selbst hervorgerufen.

## **D.5 Ausblick**

### **D.5.1 Weitere Analysen und Verbesserung der immunogenen Eigenschaften von EHV-1-Vektoren**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das EHV-1-Vektorsystem gute Env-spezifische zelluläre und humorale Immunantworten induzieren kann. Dabei wäre insbesondere die Qualität der humoralen Immunantworten interessant, die durch Neutralisations-Assays bestimmt werden kann. Dazu ist jedoch relativ viel Probenmaterial notwendig, das nach Bestimmung der Ig-Titer durch die hier angesetzte Größe der Experimente nicht ausreichend war. Darüber hinaus sollten weitere Immunisierungsstudien dazu genutzt werden Transgen-spezifische mukosale T-Zellen zu detektieren.

Auch wenn die EHV-1-Vektoren bereits gute immunogene Eigenschaften besitzen, sollten Wege gesucht werden, diese noch zu verbessern. Eine Möglichkeit könnte zum Beispiel die Deletion von Genen aus dem Genom von EHV-1 sein, die an *Immune Escape* Mechanismen beteiligt sind. Darüber hinaus könnten heterologe *Prime/Boost* Strategien in Kombination mit anderen Vektorsystemen getestet oder Adjuvantien zur Verstärkung von Immunantworten eingesetzt werden. Vor allem die mukosalen Immunantworten ließen sich so wahrscheinlich noch zusätzlich positiv beeinflussen. Hierfür wäre insbesondere ein EHV-1-Vektor interessant, der neben dem HIV-Immunogen auch für ein Adjuvans wie zum Beispiel CTB codiert. Darüber hinaus sollten in die rekombinanten EHV-1-Vektoren die verbesserten HIV-Immunogene eingesetzt werden, die derzeit entwickelt werden um gezielt wirksame Immunantworten hervorzurufen.

### **D.5.2 Biodistributionstudien für weitere Applikationsrouten der EHV-1 Vektoren und Verifizierung durch histologische Untersuchungen**

Mit Hilfe von EHV-1-Vektoren, die ein Luciferase-Gen tragen, konnte die Biodistribution für die intranasale und intramuskuläre Immunisierungsrouten im Mausmodell gezeigt werden. Damit wurden die Ziel-Organen des Vektorsystems ermittelt. Für eine genaue Lokalisation und um mögliche zelltoxische Effekte festzustellen sollten histologische Untersuchungen dieser Gewebe vorgenommen werden. Darüber hinaus sollten Biodistributionsanalysen für weitere Immunisierungsrouten durchgeführt werden. Für eine HIV-Vakzine wären insbesondere die intrarektale oder intravaginale Route von Bedeutung, für eine gentherapeutische Anwendung sollte die Route abhängig vom gewünschten Zielgewebe gewählt werden.

### **D.5.3 EHV-1-Vektoren für den heterologen Gentransfer in der Gentherapie**

Für eine gentherapeutische Anwendung sind Vektoren interessant, die möglichst keine immunogenen Eigenschaften besitzen und so hauptsächlich die Expression des Transgens vermitteln. Damit wären UL48-defiziente Viren interessante Kandidaten und sollten für den Gentransfer in der Gentherapie evaluiert werden. Eine wesentlich besser geeignete Variante wären allerdings EHV-1-Vektoren, deren *Immediate-early* Gen deletiert ist. Da dieses Gen für das IE-Protein codiert, welches die komplette Replikation von EHV-1 steuert, wäre damit die Expression aller viralen Proteine unterbunden. Bislang ist die Herstellung solcher Viren aufgrund der komplexen Rolle des IE-Proteins bei der Regulation der Virusreplikation jedoch nicht gelungen.

### **D.5.4 Rekombinante EHV-1-Vektoren für den *Challenge* anderer spezifischer Immunantworten**

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit ein HIV-*Challenge* im Mausmodell mit dem auf RacL basierenden EHV-L-luc-gag imitiert. Dieser Vektor kann die Expression von zwei Transgenen vermitteln. Das Luciferase-Gen ermöglicht dabei einen relativ einfachen Nachweis des *Challenge*-Virus, das HIV-gag-Gen dient als Immunogen. Unter Verwendung anderer HIV-Transgene könnte auch die Wirksamkeit weiterer HIV-spezifischer Immunantworten untersucht werden. Darüber hinaus könnten die EHV-1-Vektoren ebenfalls zur Analyse von Vakzinen gegen weitere Infektionskrankheiten genutzt werden.

Für einen *Challenge* von HIV-Vakzinekandidaten im Mausmodell wäre die Untersuchung weiterer Applikationsrouten für EHV-L-luc-gag wie die intravaginale oder intrarektale von großem Interesse. Dazu sollte zunächst die entsprechende Biodistribution des EHV-L-Vektors analysiert werden.

Des Weiteren können auch andere Vakzinekandidaten und Immunisierungsstrategien mit Hilfe von EHV-L-luc-gag analysiert werden. Interessant wäre dabei außerdem, ob andere virale Vektoren den gleichen Einfluss auf das Immunsystem der Mäuse nehmen wie die NYVAC-Vektoren, so dass durch eine intranasale Immunisierung eine Infektion mit EHV-L-luc-gag eingeschränkt und eine intramuskuläre Immunisierung begünstigt wird. Erste Experimente mit rekombinanten Ad5-Vektoren deuteten bereits darauf hin, dass sich dabei die gleichen Auswirkungen auf einen *Challenge* ergeben (eigene, unveröffentlichte Daten). Im Weiteren sollten die genauen Effekte wie das Cytokin-Milieu oder die Qualität der aktivierten spezifischen Immunzellen durch die Vakzinierung mit den viralen Vektoren untersucht werden.

## Literaturverzeichnis

- Anon. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recomm. Rep.* 1992; 41: 1-19.
- Anon. Cellular and humoral immune responses to a canarypox vaccine containing human immunodeficiency virus type 1 Env, Gag, and Pro in combination with rgp120. *J. Infect. Dis.* 2001; 183: 563-570.
- Abrahams MR Anderson J A Giorgi E E Seoighe C Mlisana K Ping L H Athreya G S Treurnicht F K Keele B F Wood N Salazar-Gonzalez J F Bhattacharya T Chu H Hoffman I Galvin S Mapanje C Kazembe P Thebus R Fiscus S Hide W Cohen M S Karim S A Haynes B F Shaw G M Hahn B H Korber B T Swanstrom R Williamson C. Quantitating the multiplicity of infection with human immunodeficiency virus type 1 subtype C reveals a non-poisson distribution of transmitted variants. *J. Virol.* 2009; 83: 3556-3567.
- Adler H Messerle M Koszinowski U H. Cloning of herpesviral genomes as bacterial artificial chromosomes. *Rev. Med. Virol.* 2003; 13: 111-121.
- Adler H Messerle M Wagner M Koszinowski U H. Cloning and mutagenesis of the murine gammaherpesvirus 68 genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *J. Virol.* 2000; 74: 6964-6974.
- Al Soud WA Jonsson L J Radstrom P. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38: 345-350.
- Al Soud WA Radstrom P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39: 485-493.
- Alexaki A Liu Y Wigdahl B. Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence. *Curr. HIV. Res.* 2008; 6: 388-400.
- Alter HJ Eichberg J W Masur H Saxinger W C Gallo R Macher A M Lane H C Fauci A S. Transmission of HTLV-III infection from human plasma to chimpanzees: an animal model for AIDS. *Science* 1984; 226: 549-552.
- An DS Poon B Ho Tsong F R Weijer K Blom B Spits H Chen I S Uittenbogaart C H. Use of a novel chimeric mouse model with a functionally active human immune system to study human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin. Vaccine Immunol.* 2007; 14: 391-396.
- Arhel N Kirchhoff F. Host proteins involved in HIV infection: new therapeutic targets. *Biochim. Biophys. Acta* 2010; 1802: 313-321.
- Awan AR Baxi M Field H J. EHV-1-induced abortion in mice and its relationship to stage of gestation. *Res. Vet. Sci.* 1995; 59: 139-145.
- Awan AR Chong Y C Field H J. The pathogenesis of equine herpesvirus type 1 in the mouse: a new model for studying host responses to the infection. *J. Gen. Virol.* 1990; 71 ( Pt 5): 1131-1140.

- Ayash-Rashkovsky M Bentwich Z Arditti F Friedman S Reisner Y Borkow G. A novel small animal model for HIV-1 infection. *FASEB J.* 2005; 19: 1149-1151.
- Baba TW Jeong Y S Pennick D Bronson R Greene M F Ruprecht R M. Pathogenicity of live, attenuated SIV after mucosal infection of neonatal macaques. *Science* 1995; 267: 1820-1825.
- Baba TW Liska V Khimani A H Ray N B Dailey P J Penninck D Bronson R Greene M F McClure H M Martin L N Ruprecht R M. Live attenuated, multiply deleted simian immunodeficiency virus causes AIDS in infant and adult macaques. *Nat.Med.* 1999; 5: 194-203.
- Baenziger S Tussiwand R Schlaepfer E Mazzucchelli L Heikenwalder M Kurrer M O Behnke S Frey J Oxenius A Joller H Aguzzi A Manz M G Speck R F. Disseminated and sustained HIV infection in CD34+ cord blood cell-transplanted Rag2<sup>-/-</sup>gamma c<sup>-/-</sup> mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2006; 103: 15951-15956.
- Barouch DH. Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. *Nature* 2008; 455: 613-619.
- Barouch DH 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 Letvin N L. Eventual AIDS vaccine failure in a rhesus monkey by viral escape from cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 2002; 415: 335-339.
- Barouch DH Santra S Schmitz J E Kuroda M J Fu T M Wagner W Biliska M Craiu A Zheng X X Krivulka G R Beaudry K Lifton M A Nickerson C E Trigona W L Punt K Freed D C Guan L Dubey S Casimiro D Simon A Davies M E Chastain M Strom T B Gelman R S Montefiori D C Lewis M G Emini E A Shiver J W Letvin N L. Control of viremia and prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination. *Science* 2000; 290: 486-492.
- 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 Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220: 868-871.
- Bart PA Goodall R Barber T Harari A Guimaraes-Walker A Khonkarly M Sheppard N C Bangala Y Frchette M J Wagner R Liljestrom P Kraehenbuhl J P Girard M Goudsmit J Esteban M Heeney J Sattentau Q McCormack S Babiker A Pantaleo G Weber J. EV01: a phase I trial in healthy HIV negative volunteers to evaluate a clade C HIV vaccine, NYVAC-C undertaken by the EuroVacc Consortium. *Vaccine* 2008; 26: 3153-3161.
- Baxi MK Borchers K Bartels T Schellenbach A Baxi S Field H J. Molecular studies of the acute infection, latency and reactivation of equine herpesvirus-1 (EHV-1) in the mouse model. *Virus Res.* 1996a; 40: 33-45.
- Baxi MK Efstathiou S Lawrence G Whalley J M Slater J D Field H J. The detection of latency-associated transcripts of equine herpesvirus 1 in ganglionic neurons. *J.Gen.Virol.* 1995; 76 ( Pt 12): 3113-3118.
- Belshe RB Gorse G J Mulligan M J Evans T G Keefer M C Excler J L Duliege A M Tartaglia J Cox W I McNamara J Hwang K L Bradney A Montefiori D Weinhold K J. Induction of immune responses to HIV-1 by canarypox virus (ALVAC) HIV-1 and gp120 SF-2 recombinant vaccines in uninfected volunteers. NIAID AIDS Vaccine Evaluation Group. *AIDS* 1998; 12: 2407-2415.

- Belshe RB Graham B S Keefer M C Gorse G J Wright P Dolin R Matthews T Weinhold K Bolognesi D P Sposto R . Neutralizing antibodies to HIV-1 in seronegative volunteers immunized with recombinant gp120 from the MN strain of HIV-1. NIAID AIDS Vaccine Clinical Trials Network. *JAMA* 1994; 272: 475-480.
- Belyakov IM Derby M A Ahlers J D Kelsall B L Earl P Moss B Strober W Berzofsky J A. Mucosal immunization with HIV-1 peptide vaccine induces mucosal and systemic cytotoxic T lymphocytes and protective immunity in mice against intrarectal recombinant HIV-vaccinia challenge. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1998; 95: 1709-1714.
- Berges BK Wheat W H Palmer B E Connick E Akkina R. HIV-1 infection and CD4 T cell depletion in the humanized Rag2-/-gamma c-/- (RAG-hu) mouse model. *Retrovirology*. 2006; 3: 76.
- Bergquist C Johansson E L Lagergard T Holmgren J Rudin A. 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.* 1997; 65: 2676-2684.
- Berman PW Gregory T J Riddle L Nakamura G R Champe M A Porter J P Wurm F M Hershberg R D Cobb E K Eichberg J W. Protection of chimpanzees from infection by HIV-1 after vaccination with recombinant glycoprotein gp120 but not gp160. *Nature* 1990; 345: 622-625.
- Berman PW Murthy K K Wrin T Vennari J C Cobb E K Eastman D J Champe M Nakamura G R Davison D Powell M F Bussiere J Francis D P Matthews T Gregory T J Obijeski J F. Protection of MN-rgp120-immunized chimpanzees from heterologous infection with a primary isolate of human immunodeficiency virus type 1. *J.Infect.Dis.* 1996; 173: 52-59.
- Bieniasz PD Grdina T A Bogerd H P Cullen B R. Recruitment of a protein complex containing Tat and cyclin T1 to TAR governs the species specificity of HIV-1 Tat. *EMBO J.* 1998; 17: 7056-7065.
- Binley JM Wrin T Korber B Zwick M B Wang M Chappey C Stiegler G Kunert R Zolla-Pazner S Katinger H Petropoulos C J Burton D R. Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies. *J.Virol.* 2004; 78: 13232-13252.
- Bishop KN Holmes R K Sheehy A M Malim M H. APOBEC-mediated editing of viral RNA. *Science* 2004; 305: 645.
- Blanchard TJ Alcami A Andrea P Smith G L. Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine. *J.Gen.Virol.* 1998; 79 ( Pt 5): 1159-1167.
- Boberg A Brave A Johansson S Wahren B Hinkula J Rollman E. Murine models for HIV vaccination and challenge. *Expert.Rev.Vaccines.* 2008; 7: 117-130.
- Bonyhadi ML Kaneshima H. The SCID-hu mouse: an in vivo model for HIV-1 infection in humans. *Mol.Med.Today* 1997; 3: 246-253.
- Borkow G. Mouse models for HIV-1 infection. *IUBMB.Life* 2005; 57: 819-823.
- Borrow P Lewicki H Wei X Horwitz M S Peffer N Meyers H Nelson J A Gairin J E Hahn B H Oldstone M B Shaw G M. Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat.Med.* 1997; 3: 205-211.

- Boyle MJ Connors M Flanigan M E Geiger S P Ford H, Jr. Baseler M Adelsberger J Davey R T, Jr. Lane H C. The human HIV/peripheral blood lymphocyte (PBL)-SCID mouse. A modified human PBL-SCID model for the study of HIV pathogenesis and therapy. *J.Immunol.* 1995; 154: 6612-6623.
- Bozzacco L Trumpfheller C Huang Y Longhi M P Shimeliovich I Schauer J D Park C G Steinman R M. HIV gag protein is efficiently cross-presented when targeted with an antibody towards the DEC-205 receptor in Flt3 ligand-mobilized murine DC. *Eur.J.Immunol.* 2010; 40: 36-46.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 1976; 72: 248-254.
- Browning J Horner J W Pettoello-Mantovani M Raker C Yurasov S DePinho R A Goldstein H. Mice transgenic for human CD4 and CCR5 are susceptible to HIV infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1997; 94: 14637-14641.
- Bryant NA Davis-Poynter N Vanderplasschen A Alcamì A. Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding proteins. *EMBO J.* 2003; 22: 833-846.
- Buchbinder SP Mehrotra D V Duerr A Fitzgerald D W Mogg R Li D Gilbert P B Lama J R Marmor M Del Rio C McElrath M J Casimiro D R Gottesdiener K M Chodakewitz J A Corey L Robertson M N. Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet* 2008; 372: 1881-1893.
- Burton DR Desrosiers R C Doms R W Koff W C Kwong P D Moore J P Nabel G J Sodroski J Wilson I A Wyatt R T. HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nat.Immunol.* 2004; 5: 233-236.
- Calarese DA Scanlan C N Zwick M B Deechongkit S Mimura Y Kunert R Zhu P Wormald M R Stanfield R L Roux K H Kelly J W Rudd P M Dwek R A Katinger H Burton D R Wilson I A. Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition. *Science* 2003; 300: 2065-2071.
- Carter DM Radding C M. 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.* 1971; 246: 2502-2512.
- Casimiro DR Chen L Fu T M Evans R K Caulfield M J Davies M E Tang A Chen M Huang L Harris V Freed D C Wilson K A Dubey S Zhu D M Nawrocki D Mach H Troutman R Isopi L Williams D Hurni W Xu Z Smith J G Wang S Liu X Guan L Long R Trigona W Heidecker G J Perry H C Persaud N Toner T J Su Q Liang X Youil R Chastain M Bett A J Volkin D B Emini E A Shiver J W. Comparative immunogenicity in rhesus monkeys of DNA plasmid, recombinant vaccinia virus, and replication-defective adenovirus vectors expressing a human immunodeficiency virus type 1 gag gene. *J.Virol.* 2003; 77: 6305-6313.
- Catanzaro AT Koup R A Roederer M Bailer R T Enama M E Moodie Z Gu L Martin J E Novik L Chakrabarti B K Butman B T Gall J G King C R Andrews C A Sheets R Gomez P L Mascola J R Nabel G J Graham B S. Phase 1 safety and immunogenicity evaluation of a multiclade HIV-1 candidate vaccine delivered by a replication-defective recombinant adenovirus vector. *J.Infect.Dis.* 2006; 194: 1638-1649.

- Chartier C Degryse E Gantzer M Dieterle A Pavirani A Mehtali M. Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J.Virol.* 1996; 70: 4805-4810.
- Chesters PM Allsop R Purewal A Edington N. Detection of latency-associated transcripts of equid herpesvirus 1 in equine leukocytes but not in trigeminal ganglia. *J.Virol.* 1997; 71: 3437-3443.
- Chong SY Egan M A Kutzler M A Megati S Masood A Roopchand V Garcia-Hand D Montefiori D C Quiroz J Rosati M Schadeck E B Boyer J D Pavlakis G N Weiner D B Sidhu M Eldridge J H Israel Z R. Comparative ability of plasmid IL-12 and IL-15 to enhance cellular and humoral immune responses elicited by a SIVgag plasmid DNA vaccine and alter disease progression following SHIV(89.6P) challenge in rhesus macaques. *Vaccine* 2007; 25: 4967-4982.
- Coleman CM Wu L. HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs. *Retrovirology.* 2009; 6: 51.
- Colin M Moritz S Schneider H Capeau J Coutelle C Brahimi-Horn M C. Haemoglobin interferes with the ex vivo luciferase luminescence assay: consequence for detection of luciferase reporter gene expression in vivo. *Gene Ther.* 2000; 7: 1333-1336.
- Connor RI Korber B T Graham B S Hahn B H Ho D D Walker B D Neumann A U Vermund S H Mestecky J Jackson S Fenamore E Cao Y Gao F Kalams S Kunstman K J McDonald D McWilliams N Trkola A Moore J P Wolinsky S M. Immunological and virological analyses of persons infected by human immunodeficiency virus type 1 while participating in trials of recombinant gp120 subunit vaccines. *J.Virol.* 1998; 72: 1552-1576.
- Cronin J Zhang X Y Reiser J. Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Curr.Gene Ther.* 2005; 5: 387-398.
- Csellner H Walker C Wellington J E McLure L E Love D N Whalley J M. 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.* 2000; 145: 2371-2385.
- Damjanovic D Zhang X Mu J Fe M M Xing Z. Organ distribution of transgene expression following intranasal mucosal delivery of recombinant replication-defective adenovirus gene transfer vector. *Genet.Vaccines.Ther.* 2008; 6: 5.
- Datsenko KA Wanner B L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000; 97: 6640-6645.
- Davison AJ Eberle R Ehlers B Hayward G S McGeoch D J Minson A C Pellett P E Roizman B Studdert M J Thiry E. The order Herpesvirales. *Arch.Virol.* 2009; 154: 171-177.
- De Clercq E. Antiretroviral drugs. *Curr.Opin.Pharmacol.* 2010.
- de Silva TI Cotten M Rowland-Jones S L. HIV-2: the forgotten AIDS virus. *Trends Microbiol.* 2008; 16: 588-595.
- Didierlaurent A Ramirez J C Gherardi M Zimmerli S C Graf M Orbea H A Pantaleo G Wagner R Esteban M Kraehenbuhl J P Sirard J C. Attenuated poxviruses expressing a synthetic HIV protein stimulate HLA-A2-restricted cytotoxic T-cell responses. *Vaccine* 2004; 22: 3395-3403.

- Dower WJ Miller J F Ragsdale C W. High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16: 6127-6145.
- Earl PL Cotter C Moss B Vancott T Currier J Eller L A McCutchan F Birx D L Michael N L Marovich M A Robb M Cox J H. Design and evaluation of multi-gene, multi-clade HIV-1 MVA vaccines. *Vaccine* 2009.
- el Amad Z Murthy K K Higgins K Cobb E K Haigwood N L Levy J A Steimer K S. Resistance of chimpanzees immunized with recombinant gp120SF2 to challenge by HIV-1SF2. *AIDS* 1995; 9: 1313-1322.
- Esteban M. Attenuated poxvirus vectors MVA and NYVAC as promising vaccine candidates against HIV/AIDS. *Hum.Vaccin.* 2009; 5: 867-871.
- Ferrantelli F Ruprecht R M. Neutralizing antibodies against HIV -- back in the major leagues? *Curr.Opin.Immunol.* 2002; 14: 495-502.
- Field HJ Awan A R de la F R. Reinfection and reactivation of equine herpesvirus-1 in the mouse. *Arch.Virol.* 1992; 123: 409-419.
- Finzi D Blankson J Siliciano J D Margolick J B Chadwick K Pierson T Smith K Lisziewicz J Lori F Flexner C Quinn T C Chaisson R E Rosenberg E Walker B Gange S Gallant J Siliciano R F. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat.Med.* 1999; 5: 512-517.
- Finzi D Hermankova M Pierson T Carruth L M Buck C Chaisson R E Quinn T C Chadwick K Margolick J Brookmeyer R Gallant J Markowitz M Ho D D Richman D D Siliciano R F. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 1997; 278: 1295-1300.
- Flynn NM Forthal D N Harro C D Judson F N Mayer K H Para M F. Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *J.Infect.Dis.* 2005; 191: 654-665.
- Frahm N Adams S Kiepiela P Linde C H Hewitt H S Lichtenfeld M Sango K Brown N V Pae E Wurcel A G Altfeld M Feeney M E Allen T M Roach T St John M A Daar E S Rosenberg E Korber B Marincola F Walker B D Goulder P J Brander C. HLA-B63 presents HLA-B57/B58-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitopes and is associated with low human immunodeficiency virus load. *J.Virol.* 2005; 79: 10218-10225.
- Frampton AR, Jr. Goins W F Cohen J B von Einem J Osterrieder N O'Callaghan D J Glorioso J C. Equine herpesvirus 1 utilizes a novel herpesvirus entry receptor. *J.Virol.* 2005; 79: 3169-3173.
- Frampton AR, Jr. Stolz D B Uchida H Goins W F Cohen J B Glorioso J C. Equine herpesvirus 1 enters cells by two different pathways, and infection requires the activation of the cellular kinase ROCK1. *J.Virol.* 2007; 81: 10879-10889.
- Francis DP Gregory T McElrath M J Belshe R B Gorse G J Migasena S Kitayaporn D Pitisuttitham P Matthews T Schwartz D H Berman P W. Advancing AIDSVAX to phase 3. Safety, immunogenicity, and plans for phase 3. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* 1998; 14 Suppl 3: S325-S331.
- Frey G Peng H Rits-Volloch S Morelli M Cheng Y Chen B. A fusion-intermediate state of HIV-1 gp41 targeted by broadly neutralizing antibodies. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2008; 105: 3739-3744.

- Gallo RC Sarin P S Gelmann E P Robert-Guroff M Richardson E Kalyanaraman V S Mann D Sidhu G D Stahl R E Zolla-Pazner S Leibowitch J Popovic M. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220: 865-867.
- Geldmacher C Currier J R Herrmann E Haule A Kuta E McCutchan F Njovu L Geis S Hoffmann O Maboko L Williamson C Bix D Meyerhans A Cox J Hoelscher M. 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.* 2007; 81: 2440-2448.
- Gherardi MM Perez-Jimenez E Najera J L Esteban M. 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.* 2004; 172: 6209-6220.
- Gilbert PB 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 Berman P W. 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.* 2005; 191: 666-677.
- Girard MP Osmanov S K Kieny M P. A review of vaccine research and development: the human immunodeficiency virus (HIV). *Vaccine* 2006; 24: 4062-4081.
- Goldman JP Blundell M P Lopes L Kinnon C Di Santo J P Thrasher A J. Enhanced human cell engraftment in mice deficient in RAG2 and the common cytokine receptor gamma chain. *Br.J.Haematol.* 1998; 103: 335-342.
- Gomez CE Najera J L Domingo-Gil E Ochoa-Callejero L Gonzalez-Aseguinolaza G Esteban M. Virus distribution of the attenuated MVA and NYVAC poxvirus strains in mice *J.Gen.Virol.* 2007b; 88: 2473-2478.
- Gomez CE Najera J L Jimenez E P Jimenez V Wagner R Graf M Frachette M J Liljestrom P Pantaleo G Esteban M. 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* 2007d; 25: 2863-2885.
- Gomez CE 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 Esteban M. Generation and immunogenicity of novel HIV/AIDS vaccine candidates targeting HIV-1 Env/Gag-Pol-Nef antigens of clade C. *Vaccine* 2007e; 25: 1969-1992.
- Gonin P Gaillard C. Gene transfer vector biodistribution: pivotal safety studies in clinical gene therapy development. *Gene Ther.* 2004; 11 Suppl 1: S98-S108.
- Gosztanyi G Borchers K Ludwig H. Pathogenesis of equine herpesvirus-1 infection in the mouse model. *APMIS* 2009; 117: 10-21.
- Graf M Deml L Wagner R. 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.* 2004; 94: 197-210.
- Graham BS Koup R A Roederer M Bailer R T Enama M E Moodie Z Martin J E McCluskey M M Chakrabarti B K Lamoreaux L Andrews C A Gomez P L Mascola J R Nabel G J.

- Phase 1 safety and immunogenicity evaluation of a multiclade HIV-1 DNA candidate vaccine. *J.Infect.Dis.* 2006; 194: 1650-1660.
- Granzow H Klupp B G Fuchs W Veits J Osterrieder N Mettenleiter T C. Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J.Virol.* 2001; 75: 3675-3684.
- Gray ES Moore P L Pantophlet R A Morris L. N-linked glycan modifications in gp120 of human immunodeficiency virus type 1 subtype C render partial sensitivity to 2G12 antibody neutralization. *J.Virol.* 2007; 81: 10769-10776.
- Grundy FJ Baumann R P O'Callaghan D J. DNA sequence and comparative analyses of the equine herpesvirus type 1 immediate early gene. *Virology* 1989; 172: 223-236.
- Harari A Cellera C Enders F B Kostler J Codarri L Tapia G Boyman O Castro E Gaudieri S James I John M Wagner R Mallal S Pantaleo G. Skewed association of polyfunctional antigen-specific CD8 T cell populations with HLA-B genotype. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2007; 104: 16233-16238.
- Harrer T Harrer E Kalams S A Elbeik T Staprans S I Feinberg M B Cao Y Ho D D Yilma T Caliendo A M Johnson R P Buchbinder S P Walker B D. Strong cytotoxic T cell and weak neutralizing antibody responses in a subset of persons with stable nonprogressing HIV type 1 infection. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* 1996; 12: 585-592.
- Harro C Sun X Stek J E Leavitt R Y Mehrotra D V Wang F Bett A J Casimiro D R Shiver J W DiNubile M J Quirk E. Safety and immunogenicity of the Merck adenovirus serotype 5 (MRKAd5) and MRKAd6 human immunodeficiency virus type 1 trigene vaccines alone and in combination in healthy adults. *Clin.Vaccine Immunol.* 2009; 16: 1285-1292.
- Hasebe R Sasaki M Sawa H Wada R Umemura T Kimura T. Infectious entry of equine herpesvirus-1 into host cells through different endocytic pathways. *Virology* 2009; 393: 198-209.
- Herr W Protzer U Lohse A W Gerken G Meyer zum Buschenfelde K H Wolfel T. Quantification of CD8+ T lymphocytes responsive to human immunodeficiency virus (HIV) peptide antigens in HIV-infected patients and seronegative persons at high risk for recent HIV exposure. *J.Infect.Dis.* 1998; 178: 260-265.
- Hervouet C Luci C Cuburu N Cremel M Bekri S Vimeux L Maranon C Czerkinsky C Hosmalin A Anjuere F. Sublingual immunization with an HIV subunit vaccine induces antibodies and cytotoxic T cells in the mouse female genital tract. *Vaccine* 2010.
- Hinkula J Rollman E Lundholm P Benthin R Okuda K Wahren B. Genetic immunization with multiple HIV-1 genes provides protection against HIV-1/MuLV pseudovirus challenge in vivo. *Cells Tissues.Organs* 2004; 177: 169-184.
- Hofmann-Sieber H Wild J Fiedler N Tischer K von Einem J Osterrieder N Hofmann H Kostler J Wagner R. Impact of ETIF Deletion on Safety and Immunogenicity of EHV-1 Vectedored Vaccines. *J.Virol.* 2010.
- 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 Goulder P J. 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.* 2007; 81: 3667-3672.

- Huang Y Qiu C Liu L X Feng Y M Zhu T Xu J Q. A mouse model based on replication-competent Tiantan vaccinia expressing luciferase/HIV-1 Gag fusion protein for the evaluation of protective efficacy of HIV vaccine. *Chin Med.J.(Engl.)* 2009; 122: 1655-1659.
- Hubert PH Birkenmaier S Rziha H J Osterrieder N. Alterations in the equine herpesvirus type-1 (EHV-1) strain RacH during attenuation. *Zentralbl.Veterinarmed.B* 1996; 43: 1-14.
- Hutnick NA Carnathan D G Dubey S A Makedonas G Cox K S Kierstead L Ratcliffe S J Robertson M N Casimiro D R Ertl H C Betts M R. Baseline Ad5 serostatus does not predict Ad5 HIV vaccine-induced expansion of adenovirus-specific CD4+ T cells. *Nat.Med.* 2009; 15: 876-878.
- Im EJ Hanke T. Short communication: preclinical evaluation of candidate HIV type 1 vaccines in inbred strains and an outbred stock of mice. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* 2007; 23: 857-862.
- Izraeli S Pfeleiderer C Lion T. Detection of gene expression by PCR amplification of RNA derived from frozen heparinized whole blood. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19: 6051.
- Johansson EL Wassen L Holmgren J Jertborn M Rudin A. Nasal and vaginal vaccinations have differential effects on antibody responses in vaginal and cervical secretions in humans. *Infect.Immun.* 2001; 69: 7481-7486.
- Johnson DC Spear P G. Monensin inhibits the processing of herpes simplex virus glycoproteins, their transport to the cell surface, and the egress of virions from infected cells. *J.Virol.* 1982; 43: 1102-1112.
- Johnson M Huyn S Burton J Sato M Wu L. Differential biodistribution of adenoviral vector in vivo as monitored by bioluminescence imaging and quantitative polymerase chain reaction. *Hum.Gene Ther.* 2006a; 17: 1262-1269.
- Karakousis G Ye N Li Z Chiu S K Reddy G Radding C M. The beta protein of phage lambda binds preferentially to an intermediate in DNA renaturation. *J.Mol.Biol.* 1998; 276: 721-731.
- Keele BF Giorgi E E Salazar-Gonzalez J F Decker J M Pham K T Salazar M G Sun C Grayson T Wang S Li H Wei X Jiang C Kirchherr J L Gao F Anderson J A Ping L H Swanstrom R Tomaras G D Blattner W A Goepfert P A Kilby J M Saag M S Delwart E L Busch M P Cohen M S Montefiori D C Haynes B F Gaschen B Athreya G S Lee H Y Wood N Seoighe C Perelson A S Bhattacharya T Korber B T Hahn B H Shaw G M. Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2008; 105: 7552-7557.
- 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 Goulder P J. Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature* 2004; 432: 769-775.
- Kohn CW Fenner W R. Equine herpes myeloencephalopathy. *Vet.Clin.North Am.Equine Pract.* 1987; 3: 405-419.

- Koup RA Safrit J T Cao Y Andrews C A McLeod G Borkowsky W Farthing C Ho D D. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J.Virol.* 1994; 68: 4650-4655.
- Koyanagi Y Tanaka Y Kira J Ito M Hioki K Misawa N Kawano Y Yamasaki K Tanaka R Suzuki Y Ueyama Y Terada E Tanaka T Miyasaka M Kobayashi T Kumazawa Y Yamamoto N. Primary human immunodeficiency virus type 1 viremia and central nervous system invasion in a novel hu-PBL-immunodeficient mouse strain. *J.Virol.* 1997; 71: 2417-2424.
- Kreher CR Dittrich M T Guerkov R Boehm B O Tary-Lehmann M. CD4+ and CD8+ cells in cryopreserved human PBMC maintain full functionality in cytokine ELISPOT assays. *J.Immunol.Methods* 2003; 278: 79-93.
- Kuang YQ Tang X Liu F L Jiang X L Zhang Y P Gao G Zheng Y T. Genotyping of TRIM5 locus in northern pig-tailed macaques (*Macaca leonina*), a primate species susceptible to Human Immunodeficiency Virus type 1 infection. *Retrovirology.* 2009; 6: 58.
- Kuroda MJ Schmitz J E Charini W A Nickerson C E Lifton M A Lord C I Forman M A Letvin N L. Emergence of CTL coincides with clearance of virus during primary simian immunodeficiency virus infection in rhesus monkeys. *J.Immunol.* 1999; 162: 5127-5133.
- Kwong PD Wyatt R Robinson J Sweet R W Sodroski J Hendrickson W A. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 1998; 393: 648-659.
- Kydd JH Smith K C Hannant D Livesay G J Mumford J A. Distribution of equid herpesvirus-1 (EHV-1) in respiratory tract associated lymphoid tissue: implications for cellular immunity. *Equine Vet.J.* 1994; 26: 470-473.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
- Lal RB Chakrabarti S Yang C. Impact of genetic diversity of HIV-1 on diagnosis, antiretroviral therapy & vaccine development. *Indian J.Med.Res.* 2005; 121: 287-314.
- Lee EC Yu D Martinez d, V Tessarollo L Swing D A Court DL Jenkins N A Copeland N G. A highly efficient *Escherichia coli*-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics* 2001; 73: 56-65.
- Letvin NL. Progress and obstacles in the development of an AIDS vaccine. *Nat.Rev.Immunol.* 2006; 6: 930-939.
- Lewis JB Thompson Y G Caughman G B. Transcriptional control of the equine herpesvirus 1 immediate early gene. *Virology* 1993; 197: 788-792.
- Lewis JB Thompson Y G Feng X Holden V R O'Callaghan D Caughman G B. Structural and antigenic identification of the ORF12 protein (alpha TIF) of equine herpesvirus 1. *Virology* 1997a; 230: 369-375.
- Li Z Karakousis G Chiu S K Reddy G Radding C M. The beta protein of phage lambda promotes strand exchange. *J.Mol.Biol.* 1998; 276: 733-744.
- Liu J Kjekken R Mathiesen I Barouch D H. Recruitment of antigen-presenting cells to the site of inoculation and augmentation of human immunodeficiency virus type 1 DNA vaccine immunogenicity by in vivo electroporation. *J.Virol.* 2008; 82: 5643-5649.

- Luckay A Sidhu M K Kjekken 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 Egan M A. Effect of plasmid DNA vaccine design and in vivo electroporation on the resulting vaccine-specific immune responses in rhesus macaques. *J.Virol.* 2007; 81: 5257-5269.
- Lusso P Di M, V Ensoli B Franchini G Jemma C Derocco S E Kalyanaraman V S Gallo R C. Expanded HIV-1 cellular tropism by phenotypic mixing with murine endogenous retroviruses. *Science* 1990; 247: 848-852.
- Mariani R Rutter G Harris M E Hope T J Krausslich H G Landau N R. A block to human immunodeficiency virus type 1 assembly in murine cells. *J.Virol.* 2000; 74: 3859-3870.
- Marshall KR Field H J. Demonstration of equine herpesvirus-1 neuronal latency in murine olfactory bulbs using a novel combined in situ PCR and protein synthesis method. *Virology* 1997; 229: 279-282.
- Mascola JR Snyder S W Weislow O S Belay S M Belshe R B Schwartz D H Clements M L Dolin R Graham B S Gorse G J Keefer M C McElrath M J Walker M C Wagner K F McNeil J G McCutchan F E Burke D S. Immunization with envelope subunit vaccine products elicits neutralizing antibodies against laboratory-adapted but not primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Vaccine Evaluation Group. *J.Infect.Dis.* 1996; 173: 340-348.
- Mascola JR Stiegler G VanCott T C Katinger H Carpenter C B Hanson C E Beary H Hayes D Frankel S S Birx D L Lewis M G. Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nat.Med.* 2000; 6: 207-210.
- Matano T Shibata R Siemon C Connors M Lane H C Martin M A. Administration of an anti-CD8 monoclonal antibody interferes with the clearance of chimeric simian/human immunodeficiency virus during primary infections of rhesus macaques. *J.Virol.* 1998; 72: 164-169.
- Mayr A Bohm H O Brill J WOYCIECH.S. Charakterisierung Eines Stutenabortvirus aus Polen und Vergleich Mit Bekannten Rhinopneumonitisvirus-Stammen des Pferdes. *Archiv fur Die Gesamte Virusforschung* 1965; 17: 216-&.
- Mayr A Pette J Petzoldt K Wagener K. [Studies on the development of a live vaccine against rhinopneumonitis (mare abortion) of horses]. *Zentralbl.Veterinarmed.B* 1968; 15: 406-418.
- McCormack S Stohr W Barber T Bart P A Harari A Moog C Ciuffreda D Cellera C Cowen M Gamboni R Burnet S Legg K Brodnicki E Wolf H Wagner R Heeney J Frchette M J Tartaglia J Babiker A Pantaleo G Weber J. EV02: a Phase I trial to compare the safety and immunogenicity of HIV DNA-C prime-NYVAC-C boost to NYVAC-C alone. *Vaccine* 2008; 26: 3162-3174.
- McElrath MJ De Rosa S C Moodie Z Dubey S Kierstead L Janes H Defawe O D Carter D K Hural J Akondy R Buchbinder S P Robertson M N Mehrotra D V Self S G Corey L Shiver J W Casimiro D R. HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept Step Study: a case-cohort analysis. *Lancet* 2008; 372: 1894-1905.
- McGeoch DJ Rixon F J Davison A J. Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res.* 2006; 117: 90-104.

- Mehandru S Poles M A Tenner-Racz K Horowitz A Hurley A Hogan C Boden D Racz P Markowitz M. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J.Exp.Med.* 2004; 200: 761-770.
- Messerle M Crnkovic I Hammerschmidt W Ziegler H Koszinowski U H. Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1997; 94: 14759-14763.
- Mettenleiter TC Klupp B G Granzow H. Herpesvirus assembly: an update. *Virus Res.* 2009; 143: 222-234.
- Mocarski ES Post L E Roizman B. Molecular engineering of the herpes simplex virus genome: insertion of a second L-S junction into the genome causes additional genome inversions. *Cell* 1980; 22: 243-255.
- Modrow S Dietrich Falke Uwe Truyen. *Molekulare Virologie, Heidelberg - Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2003.*
- Montero M van Houten N E Wang X Scott J K. The membrane-proximal external region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope: dominant site of antibody neutralization and target for vaccine design. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 2008; 72: 54-84, table.
- Mosier DE Gulizia R J Baird S M Wilson D B. Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature* 1988; 335: 256-259.
- Murphy KC. The lambda Gam protein inhibits RecBCD binding to dsDNA ends. *J.Mol.Biol.* 2007; 371: 19-24.
- Muster T Steindl F Purtscher M Trkola A Klima A Himmler G Rucker F Katinger H. A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J.Virol.* 1993; 67: 6642-6647.
- Nath BM Schumann K E Boyer J D. The chimpanzee and other non-human-primate models in HIV-1 vaccine research. *Trends Microbiol.* 2000; 8: 426-431.
- Neubauer A Braun B Brandmuller C Kaaden O R Osterrieder N. Analysis of the contributions of the equine herpesvirus 1 glycoprotein gB homolog to virus entry and direct cell-to-cell spread. *Virology* 1997; 227: 281-294.
- Neubauer A Osterrieder N. Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) glycoprotein K is required for efficient cell-to-cell spread and virus egress. *Virology* 2004; 329: 18-32.
- Nitayaphan S Khamboonruang C Sirisophana N Morgan P Chiu J Duliege A M Chuenchitra C Supamongse T Rungruengthanakit K deSouza M Mascola J R Boggio K Ratto-Kim S Markowitz L E Birx D Suriyanon V McNeil J G Brown A E Michael R A. A phase I/II trial of HIV SF2 gp120/MF59 vaccine in seronegative thais. AFRIMS-RIHES Vaccine Evaluation Group. Armed Forces Research Institute of Medical Sciences and the Research Institute for Health Sciences. *Vaccine* 2000; 18: 1448-1455.
- Nitayaphan S Pitisuttithum P Karnasuta C Eamsila C de Souza M Morgan P Polonis V Benenson M Vancott T Ratto-Kim S Kim J Thapinta D Garner R Bussaratid V Singharaj P el Habib R Gurunathan S Heyward W Birx D McNeil J Brown A E. Safety and immunogenicity of an HIV subtype B and E prime-boost vaccine combination in HIV-negative Thai adults. *J.Infect.Dis.* 2004; 190: 702-706.

- O'Brien KL Liu J King S L Sun Y H Schmitz J E Lifton M A Hutnick N A Betts M R Dubey S A Goudsmit J Shiver J W Robertson M N Casimiro D R Barouch D H. Adenovirus-specific immunity after immunization with an Ad5 HIV-1 vaccine candidate in humans. *Nat.Med.* 2009; 15: 873-875.
- O'Callaghan DJ Osterrieder N. Equine herpesviruses. 1999; 508-515.
- Osterrieder N. Construction and characterization of an equine herpesvirus 1 glycoprotein C negative mutant. *Virus Res.* 1999; 59: 165-177.
- Osterrieder N Neubauer A Brandmuller C Braun B Kaaden O R Baines J D. The equine herpesvirus 1 glycoprotein gp21/22a, the herpes simplex virus type 1 gM homolog, is involved in virus penetration and cell-to-cell spread of virions. *J.Virol.* 1996a; 70: 4110-4115.
- Osterrieder N Neubauer A Brandmuller C Kaaden O R O'Callaghan D J. The equine herpesvirus 1 IR6 protein influences virus growth at elevated temperature and is a major determinant of virulence. *Virology* 1996b; 226: 243-251.
- Osterrieder N Neubauer A Brandmuller C Kaaden O R O'Callaghan D J. 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.* 1998; 72: 9806-9817.
- Osterrieder N Van de Walle G R. Pathogenic potential of equine alphaherpesviruses: The importance of the mononuclear cell compartment in disease outcome. *Vet.Microbiol.* 2010.
- Osterrieder N Wagner R Brandmuller C Schmidt P Wolf H Kaaden O R. Protection against EHV-1 challenge infection in the murine model after vaccination with various formulations of recombinant glycoprotein gp14 (gB). *Virology* 1995; 208: 500-510.
- Oualikene W Gonin P Eloit M. Short and long term dissemination of deletion mutants of adenovirus in permissive (cotton rat) and non-permissive (mouse) species. *J.Gen.Virol.* 1994; 75 ( Pt 10): 2765-2768.
- Pantaleo G Koup R A. Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what we should know. *Nat.Med.* 2004; 10: 806-810.
- Pantophlet R Burton D R. GP120: target for neutralizing HIV-1 antibodies. *Annu.Rev.Immunol.* 2006; 24: 739-769.
- Parren PW Marx P A Hessel A J Luckay A Harouse J Cheng-Mayer C Moore J P Burton D R. Antibody protects macaques against vaginal challenge with a pathogenic R5 simian/human immunodeficiency virus at serum levels giving complete neutralization in vitro. *J.Virol.* 2001; 75: 8340-8347.
- Pastoret PP Vanderplasschen A. Poxviruses as vaccine vectors. *Comp Immunol.Microbiol.Infect.Dis.* 2003; 26: 343-355.
- Patel JR Edington N. The pathogenicity in mice of respiratory, abortion and paresis isolates of equine herpesvirus-1. *Vet.Microbiol.* 1983; 8: 301-305.
- Perreau M Pantaleo G Kremer E J. Activation of a dendritic cell-T cell axis by Ad5 immune complexes creates an improved environment for replication of HIV in T cells. *J.Exp.Med.* 2008; 205: 2717-2725.

- Peters BS Jaoko W Vardas E Panayotakopoulos G Fast P Schmidt C Gilmour J Bogoshi M Omosa-Manyonyi G Dally L Klavinskis L Farah B Tarragona T Bart P A Robinson A Pieterse C Stevens W Thomas R Barin B McMichael A J McIntyre J A Pantaleo G Hanke T Bwayo J. Studies of a prophylactic HIV-1 vaccine candidate based on modified vaccinia virus Ankara (MVA) with and without DNA priming: effects of dosage and route on safety and immunogenicity. *Vaccine* 2007; 25: 2120-2127.
- Peyerl FW Barouch D H Letvin N L. Structural constraints on viral escape from HIV- and SIV-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Viral Immunol.* 2004; 17: 144-151.
- Pitisuttithum P Berman P W Phonrat B Suntharasamai P Raktham S Srisuwanvilai L O Hirunras K Kitayaporn D Kaewkungwal J Migasena S Sheppard H W Li E Chernow M Peterson M L Shibata R Heyward W L Francis D P. Phase I/II study of a candidate vaccine designed against the B and E subtypes of HIV-1. *J.Acquir.Immune.Defic.Syndr.* 2004; 37: 1160-1165.
- Pitisuttithum P Gilbert P Gurwith M Heyward W Martin M van Griensven F Hu D Tappero J W Choopanya K. Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand. *J.Infect.Dis.* 2006; 194: 1661-1671.
- Potash MJ Chao W Bentsman G Paris N Saini M Nitkiewicz J Belem P Sharer L Brooks A I Volsky D J. A mouse model for study of systemic HIV-1 infection, antiviral immune responses, and neuroinvasiveness. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2005; 102: 3760-3765.
- Priddy FH Brown D Kublin J Monahan K Wright D P Lalezari J Santiago S Marmor M Lally M Novak R M Brown S J Kulkarni P Dubey S A Kierstead L S Casimiro D R Mogg R DiNubile M J Shiver J W Leavitt R Y Robertson M N Mehrotra D V Quirk E. Safety and immunogenicity of a replication-incompetent adenovirus type 5 HIV-1 clade B gag/pol/nef vaccine in healthy adults. *Clin.Infect.Dis.* 2008; 46: 1769-1781.
- Prochazka M Gaskins H R Shultz L D Leiter E H. The nonobese diabetic scid mouse: model for spontaneous thymomagenesis associated with immunodeficiency. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1992; 89: 3290-3294.
- Puax AL Michel M L. New gene-based approaches for an AIDS vaccine. *Comp Immunol.Microbiol.Infect.Dis.* 2003; 26: 357-372.
- Purewal AS Allsopp R Riggio M Telford E A Azam S Davison A J Edington N. Equid herpesviruses 1 and 4 encode functional homologs of the herpes simplex virus type 1 virion transactivator protein, VP16. *Virology* 1994; 198: 385-389.
- Ramirez JC Finke D Esteban M Kraehenbuhl J P Acha-Orbea H. Tissue distribution of the Ankara strain of vaccinia virus (MVA) after mucosal or systemic administration. *Arch.Virol.* 2003; 148: 827-839.
- Reks-Ngarm S Pitisuttithum P Nitayaphan S Kaewkungwal J Chiu J Paris R Prensri N Namwat C de Souza M Adams E Benenson M Gurunathan S Tartaglia J McNeil J G Francis D P Stablein D Birx D L Chunsuttiwat S Khamboonruang C Thongcharoen P Robb M L Michael N L Kunasol P Kim J H. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N.Engl.J.Med.* 2009; 361: 2209-2220.
- Robert-Guroff M. Replicating and non-replicating viral vectors for vaccine development. *Curr.Opin.Biotechnol.* 2007; 18: 546-556.
- Romani B Engelbrecht S Glashoff R H. Antiviral roles of APOBEC proteins against HIV-1 and suppression by Vif. *Arch.Virol.* 2009; 154: 1579-1588.

- Roshorn Y Hong J P Kobayashi N McMichael A J Volsky D J Potash M J Takiguchi M Hanke T. Novel HIV-1 clade B candidate vaccines designed for HLA-B\*5101(+) patients protected mice against chimaeric ecotropic HIV-1 challenge. *Eur.J.Immunol.* 2009; 39: 1831-1840.
- Rowland-Jones S Dong T Krausa P Sutton J Newell H Ariyoshi K Gotch F Sabally S Corrah T Kimani J MacDonald K Plummer F Ndinya-Achola J Whittle H McMichael A. The role of cytotoxic T-cells in HIV infection. *Dev.Biol.Stand.* 1998; 92: 209-214.
- Rudolph J O'Callaghan D J Osterrieder N. 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* 2002; 49: 31-36.
- Rudolph J Osterrieder N. Equine herpesvirus type 1 devoid of gM and gp2 is severely impaired in virus egress but not direct cell-to-cell spread. *Virology* 2002; 293: 356-367.
- Rutjens E Balla-Jhagjhoorsingh S Verschoor E Bogers W Koopman G Heeney J. Lentivirus infections and mechanisms of disease resistance in chimpanzees. *Front Biosci.* 2003; 8: d1134-d1145.
- Schauber CA Tuerk M J Pacheco C D Escarpe P A Veres G. Lentiviral vectors pseudotyped with baculovirus gp64 efficiently transduce mouse cells in vivo and show tropism restriction against hematopoietic cell types in vitro. *Gene Ther.* 2004; 11: 266-275.
- Schmitz JE Kuroda M J Santra S Sasseville V G Simon M A Lifton M A Racz P Tenner-Racz K Dalesandro M Scallon B J Ghayeb J Forman M A Montefiori D C Rieber E P Letvin N L Reimann K A. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* 1999; 283: 857-860.
- Schutten M Tenner-Racz K Racz P van Bekkum D W Osterhaus A D. Human antibodies that neutralize primary human immunodeficiency virus type 1 in vitro do not provide protection in an in vivo model. *J.Gen.Virol.* 1996; 77 ( Pt 8): 1667-1675.
- Shacklett BL Critchfield J W Ferre A L Hayes T L. Mucosal T-cell responses to HIV: responding at the front lines. *J.Intern.Med.* 2009; 265: 58-66.
- Shinoda K Xin K Q Okuda K. A modified HIV challenge assay in mice by using luciferase-expressing vaccinia virus. *Vaccine* 2006; 24: 2751-2754.
- Shiver JW Fu T M Chen L Casimiro D R Davies M E Evans R K Zhang Z Q Simon A J Trigona W L Dubey S A Huang L Harris V A Long R S Liang X Handt L Schleif W A Zhu L Freed D C Persaud N V Guan L Punt K S Tang A Chen M Wilson K A Collins K B Heidecker G J Fernandez V R Perry H C Joyce J G Grimm K M Cook J C Keller P M Kresock D S Mach H Troutman R D Isopi L A Williams D M Xu Z Bohannon K E Volkin D B Montefiori D C Miura A Krivulka G R Lifton M A Kuroda M J Schmitz J E Letvin N L Caulfield M J Bett A J Youil R Kaslow D C Emini E A. Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature* 2002; 415: 331-335.
- Slater JD Borchers K Thackray A M Field H J. The trigeminal ganglion is a location for equine herpesvirus 1 latency and reactivation in the horse. *J.Gen.Virol.* 1994; 75 ( Pt 8): 2007-2016.
- Smith KC Borchers K. A study of the pathogenesis of equid herpesvirus-1 (EHV-1) abortion by DNA in-situ hybridization. *J.Comp Pathol.* 2001; 125: 304-310.

- Smith KC Whitwell K E Binns M M Dolby C A Hannant D Mumford J A. Abortion of virologically negative foetuses following experimental challenge of pregnant pony mares with equid herpesvirus 1. *Equine Vet.J.* 1992; 24: 256-259.
- Smith PM Kahan S M Rorex C B von Einem J Osterrieder N O'Callaghan D J. Expression of the full-length form of gp2 of equine herpesvirus 1 (EHV-1) completely restores respiratory virulence to the attenuated EHV-1 strain KyA in CBA mice. *J.Virol.* 2005; 79: 5105-5115.
- Sodeik B Ebersold M W Helenius A. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J.Cell Biol.* 1997; 136: 1007-1021.
- Sorin M Kalpana G V. Dynamics of virus-host interplay in HIV-1 replication. *Curr.HIV.Res.* 2006; 4: 117-130.
- Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.* 1975; 98: 503-517.
- Spaete RR Mocarski E S. Insertion and deletion mutagenesis of the human cytomegalovirus genome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1987; 84: 7213-7217.
- Stiegler G Kunert R Purtscher M Wolbank S Voglauer R Steindl F Katinger H. A potent cross-clade neutralizing human monoclonal antibody against a novel epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* 2001; 17: 1757-1765.
- Stokes A Alber D G Greensill J Amellal B Carvalho R Taylor L A Doel T R Killington R A Halliburton I W Meredith D M. The expression of the proteins of equine herpesvirus 1 which share homology with herpes simplex virus 1 glycoproteins H and L. *Virus Res.* 1996; 40: 91-107.
- Streeck H Frahm N Walker B D. The role of IFN-gamma Elispot assay in HIV vaccine research. *Nat.Protoc.* 2009; 4: 461-469.
- Sun Y Iglesias E Samri A Kamkamidze G Decoville T Carcelain G Autran B. A systematic comparison of methods to measure HIV-1 specific CD8 T cells. *J.Immunol.Methods* 2003; 272: 23-34.
- Susanne Modrow Dietrich Falke Uwe Truyen. *Molekulare Virologie, Heidelberg - Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2003.*
- Tartaglia J Perkus M E Taylor J Norton E K Audonnet J C Cox W I Davis S W van der H J Maignier B Riviere M . NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology* 1992; 188: 217-232.
- Tary-Lehmann M Saxon A Lehmann P V. The human immune system in hu-PBL-SCID mice. *Immunol.Today* 1995; 16: 529-533.
- Telford EA Watson M S McBride K Davison A J. The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology* 1992; 189: 304-316.
- Tischer BK von Einem J Kaufer B Osterrieder N. Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *Biotechniques* 2006; 40: 191-197.

- Traggiai E Chicha L Mazzucchelli L Bronz L Piffaretti J C Lanzavecchia A Manz M G. Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science* 2004; 304: 104-107.
- Trapp S von Einem J Hofmann H Kostler J Wild J Wagner R Beer M Osterrieder N. Potential of equine herpesvirus 1 as a vector for immunization. *J.Virol.* 2005; 79: 5445-5454.
- Tsunetsugu-Yokota Y Morikawa Y Isogai M Kawana-Tachikawa A Odawara T Nakamura T Grassi F Autran B Iwamoto A. Yeast-derived human immunodeficiency virus type 1 p55(gag) virus-like particles activate dendritic cells (DCs) and induce perforin expression in Gag-specific CD8(+) T cells by cross-presentation of DCs. *J.Virol.* 2003; 77: 10250-10259.
- Van de Walle GR Peters S T VanderVen B C O'Callaghan D J Osterrieder N. Equine herpesvirus 1 entry via endocytosis is facilitated by alphaV integrins and an RSD motif in glycoprotein D. *J.Virol.* 2008; 82: 11859-11868.
- Van den BW Derore A Simoens P. Anatomy and nomenclature of murine lymph nodes: Descriptive study and nomenclatory standardization in BALB/cAnNCrI mice. *J.Immunol.Methods* 2006; 312: 12-19.
- Van Duyn R Pedati C Guendel I Carpio L Kehn-Hall K Saifuddin M Kashanchi F. The utilization of humanized mouse models for the study of human retroviral infections. *Retrovirology.* 2009; 6: 76.
- van Woensel PA Goovaerts D Markx D Visser N. A mouse model for testing the pathogenicity of equine herpes virus-1 strains. *J.Virol.Methods* 1995a; 54: 39-49.
- van Zijl M Quint W Briaire J de Rover T Gielkens A Berns A. Regeneration of herpesviruses from molecularly cloned subgenomic fragments. *J.Virol.* 1988; 62: 2191-2195.
- Veazey RS DeMaria M Chalifoux L V Shvetz D E Pauley D R Knight H L Rosenzweig M Johnson R P Desrosiers R C Lackner A A. Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science* 1998; 280: 427-431.
- Veazey RS Shattock R J Pope M Kirijan J C Jones J Hu Q Ketas T Marx P A Klasse P J Burton D R Moore J P. Prevention of virus transmission to macaque monkeys by a vaginally applied monoclonal antibody to HIV-1 gp120. *Nat.Med.* 2003; 9: 343-346.
- von Einem J Schumacher D O'Callaghan D J Osterrieder N. The alpha-TIF (VP16) homologue (ETIF) of equine herpesvirus 1 is essential for secondary envelopment and virus egress. *J.Virol.* 2006; 80: 2609-2620.
- von Einem J Smith P M Van de Walle G R O'Callaghan D J Osterrieder N. In vitro and in vivo characterization of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) mutants devoid of the viral chemokine-binding glycoprotein G (gG). *Virology* 2007; 362: 151-162.
- von Einem J Wellington J Whalley J M Osterrieder K O'Callaghan D J Osterrieder N. 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.* 2004; 78: 3003-3013.
- Walker C Love D N Whalley J M. Comparison of the pathogenesis of acute equine herpesvirus 1 (EHV-1) infection in the horse and the mouse model: a review. *Vet.Microbiol.* 1999; 68: 3-13.

- Watkins DI Burton D R Kallas E G Moore J P Koff W C. Nonhuman primate models and the failure of the Merck HIV-1 vaccine in humans. *Nat.Med.* 2008; 14: 617-621.
- Wei X Decker J M Wang S Hui H Kappes J C Wu X Salazar-Gonzalez J F Salazar M G Kilby J M Saag M S Komarova N L Nowak M A Hahn B H Kwong P D Shaw G M. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 2003; 422: 307-312.
- Welch HM Bridges C G Lyon A M Griffiths L Edington N. Latent equid herpesviruses 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and co-cultivation from lymphoid tissues. *J.Gen.Virol.* 1992; 73 ( Pt 2): 261-268.
- Wellington JE Love D N Whalley J M. Evidence for involvement of equine herpesvirus 1 glycoprotein B in cell-cell fusion. *Arch.Virol.* 1996; 141: 167-175.
- Wild J Bieler K Kostler J Frachette M J Jeffs S Vieira S Esteban M Liljestrom P Pantaleo G Wolf H Wagner R. Preclinical evaluation of the immunogenicity of C-type HIV-1-based DNA and NYVAC vaccines in the Balb/C mouse model. *Viral Immunol.* 2009a; 22: 309-319.
- Wild P Engels M Senn C Tobler K Ziegler U Schraner E M Loepfe E Ackermann M Mueller M Walther P. Impairment of nuclear pores in bovine herpesvirus 1-infected MDBK cells. *J.Virol.* 2005; 79: 1071-1083.
- Wild P Senn C Manera C L Sutter E Schraner E M Tobler K Ackermann M Ziegler U Lucas M S Kaech A. Exploring the nuclear envelope of herpes simplex virus 1-infected cells by high-resolution microscopy. *J.Virol.* 2009b; 83: 408-419.
- Wood M Perrotte P Onishi E Harper M E Dinney C Pagliaro L Wilson D R. Biodistribution of an adenoviral vector carrying the luciferase reporter gene following intravesical or intravenous administration to a mouse. *Cancer Gene Ther.* 1999; 6: 367-372.
- Wu JC Sundaresan G Iyer M Gambhir S S. Noninvasive optical imaging of firefly luciferase reporter gene expression in skeletal muscles of living mice. *Mol.Ther.* 2001; 4: 297-306.
- Wyatt R Kwong P D Desjardins E Sweet R W Robinson J Hendrickson W A Sodroski J G. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* 1998; 393: 705-711.
- Wyatt R Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 1998; 280: 1884-1888.
- Yamanishi K Rapp F. Temperature-sensitive mutants of human cytomegalovirus. *J.Virol.* 1977; 24: 416-418.
- Yuki Y Nochi T Kiyono H. Progress towards an AIDS mucosal vaccine: an overview. *Tuberculosis.(Edinb.)* 2007; 87 Suppl 1: S35-S44.
- Zamborlini A Lehmann-Che J Clave E Giron M L Tobaly-Tapiero J Roingard P Emiliani S Toubert A de The H Saib A. Centrosomal pre-integration latency of HIV-1 in quiescent cells. *Retrovirology.* 2007; 4: 63.
- Zhang Y Buchholz F Muyrers J P Stewart A F. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat.Genet.* 1998; 20: 123-128.

## Publikationen

### Artikel

---

Helga Hofmann-Sieber, Jens Wild, Nicole Fiedler, Karsten Tischer, Jens von Einem, Nikolaus Osterrieder, Heike Hofmann, Josef Köstler and Ralf Wagner. *Forward with EHV-1 as a Viral Vector System*. Journal of Virology, September 2010

Javier Espinosa, Thomas Brunner, Nicole Fiedler, Karl Forchhammer, Alicia M. Muro Pastor, Iris Maldener. *DevT (Alr4674), an Eukaryotic-type Ser/Thr Protein Phosphatase, is Essential for Heterocyst Function in the Cyanobacterium Anabaena sp. PCC 7120*. Microbiology, August 2010

### Vorträge

---

Nicole Fiedler, Helga Hofmann-Sieber, Jens Wild, Josef Köstler, Karsten Tischer, Jens von Einem, Nikolaus Osterrieder, Ralf Wagner. *Transgene-Specific Immune Responses Induced by Gradually Attenuated Equine Herpes Virus – 1 (EHV-1) Vectors and Their Biodistribution*. Gesellschaft für Virologie Tagung, Leipzig, März 2009

Nicole Fiedler. *Enhancement of the Potent Equine Herpesvirus – 1 (EHV-1) Vector System*. Foringen Doktoranden-Symposium, München, November 2008

Nicole Fiedler. *Recombinant Attenuated Equine Herpes Virus (EHV-1) as a Vector – Infection Studies in Human PBMCs and Their Subpopulations*. Foringen Doktoranden-Symposium, München, Dezember 2007

### Poster-Präsentationen

---

Nicole Fiedler, Jens Wild, Josef Köstler, Kathrin Kindsmüller, Katharina Böckl, Thomas Dobner, Jens von Einem, Nikolaus Osterrieder and Ralf Wagner. *Using a Recombinant Equine Herpes Virus (EHV-1) to Challenge the Protective Characteristics Induced by HIV-Vaccines in the Mouse-Model*. AIDS Kongress, Wien, Juli 2010

Nicole Fiedler, Helga Hofmann-Sieber, Jens Wild, Josef Köstler, Karsten Tischer, Jens von Einem, Nikolaus Osterrieder, Ralf Wagner. *The Potential of the Equine Herpes Virus – 1 (EHV-1) Vector System as HIV-1 Vaccine under Safety Aspects*. Deutsch Österreichischer Schweizerischer AIDS Kongress, St. Gallen, Juni 2009

Nicole Fiedler, Helga Hofmann-Sieber, Jens Wild, Josef Köstler, Karsten Tischer, Jens von Einem, Nikolaus Osterrieder, Ralf Wagner. *Transgene-Specific Immune Responses Induced by Gradually Attenuated Equine Herpes Virus – 1 (EHV-1) Vectors and Their Biodistribution*. Gesellschaft für Virologie Tagung, Leipzig, März 2009

Nicole Fiedler, Josef Köstler, Helga Hofmann-Sieber, Katharina Boeckl, Julia Dobmeier, Karsten Tischer, Nikolaus Osterrieder, Ralf Wagner. *Efficient HIV Antigen Expression and Presentation on Human Cells through an Equine Herpesviral Vector System*. Foringen Symposium of the Research Network, Hersching, April 2008

## Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ralf Wagner für die Überlassung des Themas bedanken und dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, die Promotionsarbeit in seiner Gruppe anzufertigen.

Ein großes Dankeschön auch an Herrn Prof. Dr. Thomas Dobner für die bereitwillige Betreuung meiner Doktorarbeit und das Interesse an meiner Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Hans Wolf möchte ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Regensburg bedanken.

Ein herzliches Dankeschön auch an Dr. Jens Wild für die Unterstützung bei den Mausexperimenten, das geduldige Korrekturlesen und vor allem für seine ausdauernde Diskussionsbereitschaft sowie an Dr. Josef Köstler für seine Hilfsbereitschaft und sein Interesse an meiner Arbeit.

Der ganzen AG Wagner möchte ich für die schöne und lehrreiche Zeit sowie die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Dabei stand mir so manch eine/einer mit Rat und Tat zur Seite. Ganz besonders möchte ich mich bei den ehemaligen und derzeitigen „65ern“ bedanken, insbesondere Ruth für das aufmerksame Korrekturlesen meiner Arbeit. Außerdem ein herzliches Dankeschön an Kathrin für die nette „Betreuung“ während unseres Hamburg-Ausflugs und an Asli für unsere Mocca, die es beim Verfassen dieser Arbeit immer wieder geschafft hat mich aufzumuntern.

Unsere gemeinsamen „Freizeitaktivitäten“ werden mir fehlen!

Ganz besonders möchte ich meiner Familie, insbesondere meinem Mann, für ihr Verständnis, die Geduld und ihre Unterstützung danken.