

Replizierende foamyvirale Vektoren zur Stimulation einer
effektiven und permanenten Immunantwort gegen
HIV und tumorassoziierte Antigene

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (*Dr. rer. nat.*)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Rico Blochmann

geb. in Dresden

Berlin, 2014

Diese Dissertation wurde in der Arbeitsgruppe „HIV und andere Retroviren“
am Robert Koch-Institut in Berlin unter der Betreuung
von Herrn Prof. Dr. Dr. Reinhard Kurth (†2014)
und Herrn PD Dr. Norbert Bannert angefertigt.

Die Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2010 bis März 2014 erstellt.

1. Gutachter: PD Dr. Norbert Bannert, Robert Koch-Institut, Berlin
2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel, Freie Universität Berlin

Disputation am 04.06.2014

Danksagungen

Besonderen Dank möchte ich an Herrn Prof. Dr. Dr. Reinhard Kurth (†2014) richten. Erst durch seine Unterstützung konnte das Projekt am Robert Koch-Institut initialisiert und durchgeführt werden. Für seine persönliche Unterstützung möchte ich mich recht herzlich bei ihm bedanken. Herr Prof. Kurth wird für mich fortwährend eine Vorbildfunktion einnehmen.

Des Weiteren möchte ich besonders Herrn Dr. Uwe Fiebig für die immerwährende Unterstützung, aufgebrauchte Geduld und angenehme Zusammenarbeit während meiner Zeit am Robert Koch-Institut und darüber hinaus danken.

Ebenfalls danke ich herzlich Herrn PD Dr. Norbert Bannert und Herrn Dr. Stephen Norley für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Robert Koch-Institut sowie für die Betreuung und Beurteilung meiner Arbeit und auch für die stetige Diskussionsbereitschaft.

Für die externe Betreuung meiner Arbeit danke ich herzlich Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel vom Institut für Biologie – Mikrobiologie der Freien Universität Berlin.

Herrn Dr. Joachim Denner und Herrn Dr. Sven Stengel möchte ich danken, weil mir erst durch Ihre Unterstützung der Einstieg am Robert Koch-Institut ermöglicht wurde.

Frau Patricia Mützlitz danke ich herzlich für die hilfreiche Unterstützung und angenehme Zusammenarbeit während der Durchführung der Tierversuche. Ohne Ihre Hilfe wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Für die experimentelle Unterstützung und die großzügige Gastfreundschaft möchte ich mich weiterhin herzlich bei Nicky & Stephen Norley bedanken.

Sandra Kühn und Christiane Bug sowie allen anderen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe FG18 (P12 / P13 / ZBS4) danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und Gesellschaft während meiner Dissertation und darüber hinaus.

Meiner Familie - insbesondere meinen Eltern - danke ich herzlich für die moralische und finanzielle Unterstützung während des gesamten Studiums und der Doktorandenzeit.

Inhalt

Verzeichnis der Tabellen	i
Verzeichnis der Abbildungen.....	ii
Abkürzungsverzeichnis.....	iii
1. Einleitung	1
1.1 Entwicklung von anti-retroviralen Impfstoffen zur Eindämmung der HIV-Pandemie ...	2
1.2 Potential von Anti-Tumorimpfstoffen als Begleittherapie	5
1.3 Foamyviren als einziger Vertreter der <i>Spumaretrovirinae</i>	8
1.3.1 Partikel Aufbau und genetische Organisation der Viren	12
1.3.2 Replikationszyklus der Foamyviren	17
1.4 Potential von foamyviralen Vektoren in der Gentherapie und Immunologie	18
1.4.1 Sicherheit von Foamyvirus basierten Impfstoffen.....	21
1.5 Zielsetzung der Dissertation	24
2. Material & Methoden	25
2.1 Material.....	25
2.1.1 Chemikalien/Material	25
2.1.2 Geräte	25
2.1.1 Puffer, Lösungen und Medien	26
2.1.2 Kits	28
2.1.3 Zellen	28
2.1.3.1 Bakterienstämme	28
2.1.3.2 <i>Mammalia</i> Zelllinien.....	28
2.1.4 Viren	28
2.1.5 Antikörper	29
2.1.6 Enzyme	29
2.1.7 Primer und Sonden	29
2.1.8 Vektoren	30
2.1.8.1 Kommerzielle Vektoren.....	30
2.1.8.2 Erstellte Vektoren	30
2.1.9 Versuchstiere	31
2.1.10 Software	31

2.2	Methoden.....	32
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	32
2.2.1.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	32
2.2.1.2	Quantitative real-time PCR zum Nachweis von viraler DNA.....	33
2.2.1.3	Relative Quantifizierung der DNA-Menge mittels der $\Delta\Delta C_T$ -Methode nach Pfaffl [2001]	37
2.2.1.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	38
2.2.1.5	Isolation von genomischer DNA aus Organproben mittels Phenol/Chloroform-Extraktion.....	38
2.2.1.6	Klonierungs-Methoden.....	39
2.2.1.7	Sequenzierung von Plasmiden.....	41
2.2.1.8	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	41
2.2.2	Mikrobiologische Methoden.....	42
2.2.2.1	Kultivierung und Konservierung von Bakterien	42
2.2.2.2	Herstellung elektrokompenter Bakterien	42
2.2.2.3	Elektroporation elektrokompenter Bakterien	43
2.2.2.4	Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i>	43
2.2.3	Zellbiologische Methoden	44
2.2.3.1	Kultivierung und Konservierung von eukaryotischen Zelllinien.....	44
2.2.3.2	Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen.....	44
2.2.3.3	Zellyse eukaryotischer Zellen	45
2.2.3.4	Zellmorphologische Dokumentation mittels Licht-/Fluoreszenzmikroskopie.....	45
2.2.4	Virologische Methoden.....	46
2.2.4.1	Virustitration von Zellkulturüberständen	46
2.2.4.2	Vergleich der Replikationskompetenz der erstellten PFV-Mutanten zum PFVwt <i>in vitro</i>	46
2.2.4.3	Ko-Kultivierung von primären Gewebszellen und Speichel für den Virus-Nachweis	47
2.2.5	Immunologische Methoden.....	48
2.2.5.1	Immunologischer Nachweis von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot (WB)	48
2.2.5.2	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (ELISA).....	48
2.2.5.3	<i>Enzyme linked immunosorbent spot</i> (ELISPOT) Assay.....	49
2.2.6	Tierexperimente	50

2.2.6.1	Serumgewinnung und Isolation von peripheren Blutzellen.....	50
2.2.6.2	Entnahme und Aufarbeitung von Organproben	51
2.2.6.3	Herstellung der Gene Gun-Munition.....	51
2.2.6.4	Applikation von viralen Vektoren durch die „Helios® Gene Gun“	52
2.2.6.5	Versuchsplan Phase I und Phase II	52
3.	Ergebnisse	55
3.1	Konstruktion von replizierenden viralen Vektoren auf Basis von PFV	55
3.2	PCR-basierter Replikationsnachweis der PFV-Mutanten <i>in vitro</i>	57
3.3	Infektionsversuch von Hamstern und Mäusen mit PFV und den PFV-Mutanten.....	60
3.4	Genetische Optimierung der PFV- Δ Bet-Vektoren	65
3.5	Nachweis der Hybridvirus-gesteuerten Antigen-Expression mittels GFP	70
3.6	Konstruktion von HIV- und Prostata-Antigen-exprimierenden PFV-Vakzinen	77
3.7	PCR-basierter Replikationsvergleich der optimierten PFV-Mutanten <i>in vitro</i>	83
3.8	Replikationsnachweis der Antigen-exprimierenden PFV-Impfviren <i>in vivo</i>	86
3.9	Nachweis einer gezielten Langzeitstimulation des Immunsystems durch die persistierende Replikation und Antigen-Präsentation der Impfviren.....	95
4.	Diskussion	100
4.1	Konstruktion von replizierenden PFV- Δ Bet-Mutanten und Charakterisierung der Replikationseigenschaften <i>in vitro</i> sowie <i>in vivo</i>	100
4.1.1	Erstellung und Erprobung von replikationskompetenten PFV- Δ Bet-Basis-Vektoren	100
4.1.2	Anwendbarkeit der erstellten PFV-Mutanten im Kleintiermodell.....	102
4.2	Optimierung der PFV- Δ Bet-Mutanten für die Antigen-Präsentation und Charakterisierung der Replikations- und Expressionseigenschaften <i>in vitro</i>	106
4.2.1	Optimierung der im Tiermodell getesteten Basis-Vektoren <i>in vitro</i>	106
4.2.2	Konstruktion von Fremdantigen-exprimierenden PFV-Hybridviren	108
4.2.3	Konstruktion von HIV- und Prostata-Antigen-exprimierenden Impfvektoren.....	111
4.2.4	qPCR-basierter Replikationsvergleich der PFV-Hybrid-Vektoren <i>in vitro</i>	113
4.3	Immunisierung von Hamstern und Mäusen durch Applikation von replizierenden Impfviren und Bewertung der resultierenden Immunantwort.....	114
4.3.1	Replikationsnachweis der Impfviren <i>in vivo</i>	114
4.3.2	Auswertung der Vektor-stimulierten Immunantwort gegen heterologe Fremdantigene	118
4.4	Beurteilung der Anwendbarkeit dieses PFV-Impfsystems im Menschen.....	123

5. Zusammenfassung	126
6. Ausblick	128
7. Literaturverzeichnis	129
7.1 Publikationen	129
7.2 Internetquellen.....	147
8. Publikationen	148
9. Curriculum Vitae	149
10. Anhang	I
10.1 Vektorkarten	I
10.2 Verwendete MCS-Sequenzen, Oligonukleotide und Primer.....	XIV
10.3 Peptidsequenzen und Peptidpools des HIV-CLT-Peptid-Sets	XVII

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Primertabelle für die qPCR zum Nachweis von viraler DNA von PFV	36
Tabelle 2: Temperatur-Profile von <i>sticky</i> , <i>blund</i> und <i>sticky/blund end</i> Ligationen	40
Tabelle 3: Gruppenverteilung Phase I.....	53
Tabelle 4: Gruppenverteilung Phase II	54
Tabelle 5: Ergebnis der Impfvirus Re-Isolation aus den Hamstergruppen der zweiten Tierversuchsphase	94

Anhang:

Liste I: Oligonukleotide	XV
Liste II: Klonierungs-Primer.....	XV
Liste III: Sequenzierungs-Primer.....	XVI
Liste IV: Peptidsequenzen des Peptid-Sets: HIV-CTL-Epitop-String	XVII

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Lichtmikroskopische Aufnahmen von naiven und Foamyvirus-infizierten BHK-21-Zellen	10
Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von SFVmac Partikeln	12
Abb. 3: Schematischer Aufbau des foamyviralen Genoms und Darstellung der wesentlichsten transkribierten mRNA-Spezies.	14
Abb. 4: Sequenzvergleich des <i>pol</i> -Gens von verschiedenen Foamyvirus-Subtypen und Lage der generischen Sonde	34
Abb. 5: Schematische Darstellung von PFVwt, PFVmcs, PFV <i>basic</i> , PFV Δ bet und PFVdel.....	56
Abb. 6: Auswertung der Messergebnisse der qPCR des <i>in vitro</i> Replikationsvergleichs von PFV mit den Mutanten PFVmcs, PFV <i>basic</i> , PFV Δ bet und PFVdel.....	58
Abb. 7: ELISA-Messergebnisse zu dem Infektionsversuch von Hamstern und Mäusen mit dem PFVwt.....	61
Abb. 8: ELISA-Messergebnisse zu dem Infektionsversuch von Hamstern und Mäusen mit PFVmcs, PFV Δ bet und PFVdel	63
Abb. 9: Veranschaulichung der genetischen Optimierung der Tas-Sequenz der Mutanten PFcV-T0, -T1 und -T2a	67
Abb. 10: Schematische Darstellung der genetisch optimierten PFcV-Mutanten PFcV-T0, -T1, -T0a, -T1a und -T2a	68
Abb. 11: Auswertung der Messergebnisse der qPCR des <i>in vitro</i> Replikationsvergleich von PFV mit den PFcV-Mutanten PFcV-T0, -T0a, -T1, -T1a und -T2a.....	69
Abb. 12: Schematische Darstellung der Expression und post-translationalen Prozessierung von GFP durch die optimierten PFV-GFP-Hybridviren PFhV-T0a<GFP>, PFhV-T1a<GFP> und PFhV-T2a<GFP>.....	71
Abb. 13: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von PFhV-T0a<GFP>-infizierten BHK-21-Zellen	72
Abb. 14: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von PFhV-T1a<GFP>-infizierten BHK-21-Zellen	73
Abb. 15: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von PFhV-T2a<GFP>-infizierten BHK-21-Zellen	74

Abb. 16: Western Blot zum Nachweis von viralen PFV-Proteinen und 2F5-GFP in PFhV-T0a<GFP>- und PFhV-T2a<GFP>-infizierten BHK-21-Zellen	76
Abb. 17: Schematische Darstellung der Antigenexpression durch die PSCA- und HIV-CLT-PFV-Hybridviren	78
Abb. 18: PCR Nachweis der genetischen Stabilität der PSCA- und HIV-Impfvektoren	80
Abb. 19: Western Blot zum Nachweis von viralen PFV-Proteinen und der Antigene GFP, PSCA und HIV-CLT-Epitop in den Zelllysaten infizierter BHK-21-Zellen	81
Abb. 20: Auswertung der Messergebnisse der qPCR des <i>in vitro</i> Replikationsvergleich von PFV mit den optimierten Tas-naiven PFV-Mutanten des Basisvirus PFcV-T0.....	83
Abb. 21: Auswertung der Messergebnisse der qPCR des <i>in vitro</i> Replikationsvergleichs von PFV mit den optimierten Tas <i>m1</i> -PFV-Mutanten des Basisvirus PFcV-T1	85
Abb. 22: Auszug aus den Messergebnissen des Peptid-ELISAs zur Bestimmung einer induzierten humoralen Immunantwort gegen HIV-CTL-Epitope in den Versuchstiergruppen H5-H13 und M5-M9, 321 bzw. 343 Tage nach Infektion	88
Abb. 23: Diagramme zu den ELISA-Messdaten des <i>in vivo</i> Infektionsversuchs von Hamstern mit den optimierten Tas-naiven-PFV-Mutanten sowie der Negativkontrollgruppe.....	90
Abb. 24: Diagramme zu den ELISA-Messdaten des <i>in vivo</i> Infektionsversuchs von Hamstern mit den optimierten Tas <i>m1</i> -PFV-Mutanten PFcV-T1, PFhV-T1<CTL> & PFhV-T1a<CTL> ...	92
Abb. 25: Diagramme zu den ELISA-Messdaten des <i>in vivo</i> Infektionsversuchs von Mäusen mit den optimierten HIV-CTL-Epitop-exprimierenden PFhV-Hybridviren und die dazu äquivalenten Basisviren PFcV-T0 und TFcV-T1	93
Abb. 26: Auszug aus den Messergebnissen des Peptid-ELISAs zur Bestimmung einer induzierten gezielten humoralen Immunantwort gegen HIV-CTL-Epitope in den Versuchstiergruppen H5-H13 und M5-M9.....	96
Abb. 27: Ergebnisse des durchgeführten IFN γ -ELISPOT gegen HIV-CTL-Peptide mit den Mausmilzzellen der immunisierten Mausgruppen M5 bis M9.....	98
Abb. 28: Darstellung des vermutlichen C57BL/6-Maus-Kern-Epitops des HIV-CTL-Epitop-Proteins	121

Abkürzungsverzeichnis

AAV	adeno-assoziierte virale Vektoren
Abb	Abbildung
Ad5	Adenovirus Typ 5
add	addieren auf ein Gesamtvolumen von
AGM	Afrikanische Grüne Meerkatze
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrom</i>
AK	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
APCs	<i>antigen-presenting cells</i> , Antigen präsentierende Zellen
APOBEC	<i>apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide</i>
AS	Aminosäure
BCA	<i>Bicin Choninic acid Assay</i>
bel	<i>between env and LTR</i> , zwischen env und LTR
BFV	Bovines Foamyvirus
BHK	<i>baby hamster kidney</i>
bp	Basenpaare
bzw	beziehungsweise
CA	Kapsidprotein
CAS	<i>cis</i> -aktive Sequenzen
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase
CMV	Zytomegalovirus
CPE	<i>cytopathic effect</i> , zytopathischer Effekt
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
ddH ₂ O	Aqua bidest
DCs	dendritische Zellen
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EFV	Equin Foamyvirus
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ELISPOT	<i>enzyme linked immunosorbent spot</i>
EM	Elektronenmikroskop
Env	<i>envelope proteine</i> , Hüllprotein
ER	endoplasmatischen Retikulum
FCV	felines Calicivirus
ff	fortfolgende
FFV	Felines Foamyvirus
FKS	fötales Kälberserum
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
Gag	<i>group specific antigen</i> , gruppenspezifisches Antigen
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierenden Faktor
gp	Glykoprotein

HFV	Humanes Foamyvirus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettich Peroxidase
HSRV	Humanes Spumaretrovirus
hyb	Hybride
IAVI	<i>International AIDS Vaccine Initiative</i>
i.p.	intra peritoneal
IFN- γ	Interferon γ
IgG	Immunglobulin G
IL-2	Interleukin 2
IN	Integrase
IP	interner Promotor
iPSC	transformierte pluripotente Stammzellen
kb	kilo Basen
kDa	kilo Dalton
LAD	Leukozytenadhäsionsdefekt
LB	Luria-Bertani
LP	<i>leader peptide</i> , Signalpeptid
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MA	Matrixprotein
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MERS-CoV	Middle East respiratory syndrome Corona Virus
MHC	major histocompatibility complex
MLV	<i>murine leukemia virus</i>
MVA	<i>modified vaccinia ankara virus</i>
NC	<i>nucleo capsid proteine</i> , Nukleokapsitprotein
NEB	<i>New England Biolabs</i>
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NK	Negativkontrolle
NLS	<i>nuclear localisation signal</i> , Kernlokalisierungssignal
NOD/SCID	<i>Non-Obese Diabetic / Severe Combined Immunodeficiency</i> , Typ II-Diabetes / schwere kombinierte Immundefizienz
OD	Optische Dichte
OPD	o-Phenylendiamin
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
PAP	prostataspezifische saure Phosphatase
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> , mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Saline
PBS-T	<i>phosphate buffered saline + tween</i> , Phosphat-gepufferte Saline + Tween
PCa	Prostatakarzinom
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyethylenimin
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
PFcV	<i>prototype foamy carrier virus</i> , Prototyp-Foamy-Träger-Virus
PFhV	<i>prototype foamy hybrid virus</i> , Prototyp-Foamy-Hybrid-Virus

PFV	<i>prototypic foamy virus</i>
PHA	Phytohaemag-glutinin
PK	Positivkontrolle
POD	Peroxydase
Pol	Polymerase
PPT	Polypurintrakt
PR-RT/RH	Protease - Reverse Transkriptase /RNase-H-Komplex
PSA	<i>prostate specific antigen</i> , Prostata spezifisches Antigen
PSCA	<i>prostate stem cell antigen</i> , Prostata Stammzell Antigen
PSMA	<i>prostate specific membrane antigen</i> , Prostata-spezifisches Membran-Antigen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PWM	<i>pokeweed mitogen</i>
qPCR	<i>quantitative PCR, real time PCR</i>
RE	Restriktionsenzyme
RIPA	<i>RadioImmunoPrecipitation Assay</i>
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonucleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SFU	<i>spot forming units</i>
SFVagm	<i>simian foamy virus african green monkey</i> , SFV-3
SFVbab	<i>simian foamy virus baboon</i> , SFV-10
SFVcpz(hu)	<i>simian foamy virus human</i> , HFV, PFV
SFVgor	<i>simian foamy virus gorilla</i> , SFVgg
SFVmac	<i>simian foamy virus rhesus macaque</i> , SFV-1
SFVmar	<i>simian foamy virus marmoset</i>
SFVora	<i>simian foamy virus orangutan</i> , SFV-11
SFVspm	<i>simian foamy virus spider monkey</i> , SFV- 8
SFVsqu	<i>simian foamy virus squirrel monkey</i> , SFV- 4
SIV	Simianes Immundefizienz-Virus
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
SU	<i>surface unit</i> , Oberflächeneinheit
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tas	Transaktivator der Spumaviren
TCID	<i>tissue culture infectious dose</i>
TM	transmembran
Ü	Übertrag
u. a.	unter anderem
UNAIDS	<i>United Nations Department of AIDS</i>
Vif	<i>virion infectivity factor</i>
WB	Western Blot
WHO	<i>World Health Organization</i>
wt	Wildtyp
Δnef	<i>deletion negative regulatory factor</i>

1. Einleitung

Durch die medizinische Forschung der letzten Jahrzehnte konnte eine Vielzahl von wirksamen Medikamenten und effektiven Impfstoffen bereitgestellt werden, wodurch die Lebensqualität der Menschen in vielen Teilen der Erde erheblich verbessert wurde. Dabei ist der Einsatz von protektiven Impfstoffen nach wie vor der effektivste medizinische Ansatz, um der Ausbreitung von Infektionskrankheiten entgegen zu wirken. Die erzielten Impferfolge, wie die 1980 von der *world health organization* (WHO) für ausgerottet erklärten Pockenviren, belegen die andauernde Erfolgsgeschichte der Vakzinierung, welche durch die Arbeiten von Wissenschaftlern wie Edward Jenner, Robert Koch oder Paul Ehrlich erst ermöglicht wurden. Auch jüngste Erfolge durch Einführung einer Schutzimpfung bei jungen Frauen gegen das Humane Papilloma Virus oder erste positiv verlaufene Studien im Feld der Anti-Tumorimpfstoffentwicklung bestätigen erneut, wie erfolgversprechend die Entwicklung und Erprobung innovativer Impfstrategien sein kann. Jedoch belegen aktuelle Ereignisse, wie die Ausbreitung eines neu entdeckten *Middle East respiratory syndrome* Corona Virus (MERS-CoV) im arabischen Raum oder das fortwährende Auftreten von zoonotischen Infektionen mit neuen Influenzavirusstämmen in Asien die Notwendigkeit, die Anstrengungen im Bereich der Impfstoffentwicklung weiter zu intensivieren und infolgedessen den Impfschutz in der Bevölkerung weiter voranzutreiben.

Ein weiteres Beispiel für die Notwendigkeit der Entwicklung von innovativen Vakzinierungsmethoden bieten die enttäuschenden Ergebnisse der HIV-Impfstoffentwicklung der vergangenen 30 Jahre. Weder die Methoden der klassischen Impfstoffentwicklung, wie rekombinante *Subunit*-Vakzine oder inaktivierte virale Partikel, noch die Erprobung neuer experimenteller Impfstrategien, wie DNA-Impfstoffe, Liposomen oder auf MVA/Adenovirus-basierende Impfstoffe, konnten in klinischen Studien einen ausreichenden Schutz gegen eine HIV-Infektion induzieren. In einer 2009 abgeschlossenen klinischen Phase III-Vakzinierungsstudie, bei der eine Kombination aus verschiedenen neuartigen Impfstoffen verwendet wurde (Thai-Trial, RV144), konnten jedoch erste dringend notwendige Erfolge bei der Induktion einer schützenden Immunantwort gegen HIV erzielt werden. Dabei scheint jedoch die Induktion einer breiten und sterilen Immunität der Weltbevölkerung mit dieser neuen Impfstrategie eher unwahrscheinlich, da der beobachtete Impfschutz in der Vakzinierungsgruppe eher marginal ausfiel und die scheinbar schützende Immunantwort nur bis ca. ein Jahr nach Immunisierung nachgewiesen werden konnte (Sekaly,

2008; Rerks-Ngarm *et al.*, 2009). Aus diesem Grund erfolgte in den letzten Jahren die Entwicklung von alternativen Vakzinierungsstrategien, auf der Basis von replikationskompetenten viralen Vektoren. Dabei zeigten kürzlich veröffentlichte Experimente mit einem modifizierten, replikationskompetenten Zytomegalovirus (CMV) des Rhesusaffen erste erfolgverheißende Ergebnisse im SIV-Primatenmodell (Hansen *et al.*, 2011, 2013). Jedoch ist hinsichtlich des Sicherheitsrisikos der Einsatz von genetisch veränderten Viren, welche in naiver Form ein pathogenes Potential enthalten, weiterhin umstritten. Darum beschäftigt sich die hier vorliegende Dissertation mit der Entwicklung eines neuartigen Impfkonzpts auf der Grundlage von replizierenden Vektorsystemen unter Verwendung der apathogenen und persistent replizierenden Spumaviren. Dabei könnte der Einsatz von apathogenen Viren als Vakzinierungsmethode hinsichtlich der Sicherheitsbedenken bei der medizinischen Anwendung von viralen Vektorsystemen neue Impulse setzen. In dieser Einleitung soll erläutert werden, warum das Spuma- oder Foamyvirus ein potentieller Kandidat für Entwicklung von neuen Impfstrategien darstellt und gegenüber CMV-basierten, lentiviralen oder gammaretroviralen Vektorsystemen erhebliche Vorteile bieten könnte. Auch schien es sinnvoll, die Entwicklung von replizierenden Vektoren auf die Bereiche der Krebstherapie hinsichtlich der Generierung von Antitumorimpfstoffen auszuweiten.

1.1 Entwicklung von anti-retroviralen Impfstoffen zur Eindämmung der HIV-Pandemie

In Deutschland lebten Ende 2012 ca. 78.000 Menschen mit einer HIV-Infektion. Dabei stieg im Vergleich zum Vorjahr die Zahl der Neudiagnosen im Jahr 2012 um ≈ 600 auf ca. 3.400, wobei vor allem in der Gruppe junger homosexueller Männer die Infektionsraten anstiegen (Robert Koch-Institut (RKI) - EpiBul 46/2011; 47/2012). Weltweit wird die Zahl auf ca. 35,3 (32,2-38,8) Millionen Menschen geschätzt, wovon ein Großteil in Afrika lebt (UNAIDS – *Global report* 2013). Die sich seit den 1980er Jahren ausbreitende weltweite HIV-Pandemie konnte durch Aufklärung, Prävention und Entwicklung von hochwirksamen antiretroviralen Medikamenten in vielen Regionen der Erde eingedämmt werden. Jedoch scheint eine HIV-Eradikation mit dieser Strategie aussichtslos. Deshalb erfolgte parallel dazu die Entwicklung und Erprobung klassischer Impfstoffansätze zur Induktion einer schützenden Immunabwehr (u. A. Carlson *et al.*, 1990; Gardner *et al.*, 1991; Hartung *et al.*, 1992). Dabei konnte ein 100%iger Impfschutz im SIV-

Affenmodell erzielt werden. Jedoch konnte in nachfolgenden Experimenten gezeigt werden, dass der induzierte Impfschutz im Primaten nicht auf den applizierten viralen Proteinen, sondern vielmehr auf die im Vakzin enthaltenen humanen Proteine basierte (Norley *et al.*, 1998). Dadurch war die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen ausgeschlossen. Aus diesem Grund lag der Schwerpunkt der Forschung in den letzten Jahren auf der Entwicklung neuer Impfstoffe. Dabei wurde eine Vielzahl von neuartigen Ansätzen erprobt, welche unter dem Begriff „Genetische Impfstoffe“ zusammengefasst werden können. Dazu zählen z. B. DNA-basierte Impfstoffe, welche durch intrazelluläre Expression und anschließende Präsentation von rekombinant-generierten immunogenen HIV-Peptidsequenzen die Etablierung einer Virus-gerichteten zytotoxischen T-Zell-Abwehr stimulieren können (u. a. *multi-CTL epitope vaccine*; Hanke *et al.*, 1998a, 1999). Darüber hinaus wurde eine Vielzahl von genetisch modifizierten viralen Vektoren entwickelt, wie z.B. *Modified Vaccinia Ankara* (MVA), adenovirale Vektoren (Ad) oder adeno-assoziierte virale Vektoren (AAV), welche ebenfalls die Expression und Präsentation von definierten immunogenen HIV-Proteinsequenzen einleiten, um somit eine breite HIV-spezifische Immunabwehr im Impfling zu etablieren. Diese Impfsysteme wurden unter dem Begriff Trägervirus-assoziierte Impfstoffe zusammengefasst (u. a. Buge *et al.*, 1997; Belyakov *et al.*, 1998; Seth *et al.*, 1998; Xin *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2005). Die experimentelle Erprobung dieser neu entwickelten Impfkonzepete lieferten abermals vielversprechende Ergebnisse im Affenmodell. Dabei zeigte besonders die *prime/boost*-Applikation von verschiedenen Impfstoffregimen eine hohe Effektivität bei der Induktion eines Impfschutzes. Deshalb folgte die Erprobung der verschiedenen Kombinationsimpfstoffe in den klinischen Phasen I-III (u. a. Vanichseni *et al.*, 2004; Watana-veeradej *et al.*, 2006; Guimaraes-Walker *et al.*, 2008). Diese Studien haben jedoch gezeigt, dass keiner der getesteten Impfsysteme die gewünschte schützende Immunität im Menschen induzieren konnte. Insbesondere der enttäuschende Verlauf der klinischen Erprobung eines Ad5-basierten Ansatzes (STEP-Studie - HVTN 502 - Merck 2007) zeigte die Notwendigkeit der Entwicklung neuer Strategien (Robb, 2008; Sekaly, 2008; Watkins *et al.*, 2008). Diesbezüglich erfolgte in den letzten Jahren die Weiterentwicklung neuer Impfkonzepete. In einer 2009 abgeschlossenen Phase III-HIV-Vakzinierungsstudie in Thailand (Thai-Trial, RV144) konnte zumindest ein erster nominaler Teilerfolg erzielt werden. Die Teilnehmer erhielten einen Kombinationsimpfstoff, unter Verwendung der *prime/boost*-Strategie. Die überwiegend heterosexuellen Teilnehmer im Alter zwischen 18 und 30 Jahren erhielten in Woche 0 und 4 ein modifiziertes, replikationsdefizientes Pockenimpfvirus

(vCP1521), welches die HIV-1 Gene Oberflächenprotein, gruppenspezifisches Antigen sowie Protease exprimiert. In Woche 12 und 24 erhielten die Teilnehmer neben einer weiteren vCP1521-Injektion zusätzlich einen weiteren Impfstoff, bestehend aus dem rekombinant hergestellten Oberflächenproteinen (AIDSVAX B/E). Wie vCP1521 wurde AIDSVAX B/E von dem in Thailand dominierenden HIV-1-Stamm E und dem in Europa vorherrschenden Stamm B abgeleitet. Bei dieser Studie konnte eine Reduktion des Infektionsrisikos um 31% in der immunisierten Gruppe erzielt werden. Trotz der allgemein positiven Bewertung der Ergebnisse dieser Studie muss die Kurzlebigkeit des beobachteten Impfschutzes beachtet werden, da ein möglicherweise schützender Effekt lediglich innerhalb der ersten sechs Monate induziert werden konnte. Nach dieser Zeit ist der Impfstoff faktisch unwirksam (Rerks-Ngarm *et al.*, 2009; RKI - EpiBul 48/2009).

Bis heute basieren die einzigen Ansätze, die einen wirksamen und reproduzierbaren Schutz gegen eine SIV-Infektion im Rhesusaffenmodell induzieren können, auf replikationskompetenten Impfviren. Insbesondere auf Nef-attenuiertes (Δ nef) SIV wurden lange Zeit große Hoffnungen gesetzt. Ursprung dieses Ansatzes ist die Beobachtung von acht Bluttransfusionsempfängern, die versehentlich mit einer natürlich entstandenen Δ nef-HIV-Mutante infiziert wurden (*Sydney Blood Bank Cohort*). Fünf der acht Infizierten konnten über einen Zeitraum von mehr als 15 Jahren medizinisch beobachtet werden. Dabei zeigte sich, dass die infizierten Patienten ohne antiretrovirale Therapie, bei einer stabilen Zahl CD4+ Zellen und einer niedrigen Viruslast, lange symptomfrei blieben. Diese drastisch verlangsamte Krankheitsprogression konnte auch in adulten Rhesusaffen nach Infektion mit einer analogen Δ nef-SIVmac-Mutante nachgewiesen werden. In diesen Versuchen konnte außerdem gezeigt werden, dass die Infektion durch Δ nef-SIVmac-Mutanten einen Schutz vor der Infektion mit dem Wildtypvirus induzierte (Daniel *et al.*, 1992). In weiterführenden Studien stellte sich jedoch heraus, dass dieses Impfvirus in neugeborenen Rhesusaffen zur Ausbildung von AIDS führt (Baba *et al.*, 1999). Auch im Falle der *Sydney Blood Bank* Kohorte traten nach über 15 Jahren bei drei Personen, inklusive des HIV- Δ nef-infizierten Blut-Donors, Krankheitssymptome auf (Learmont *et al.*, 1999). Somit war der Einsatz von attenuierten Immundefizienzviren in dieser Form in Menschen nahezu ausgeschlossen. Dennoch belegen diese Ergebnisse das mögliche Potenzial von replikationskompetenten Impfsystemen.

In den letzten Jahren gelangte durch die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Louis Picker der Ansatz von attenuierten replikationskompetenten Impfviren zu neuer Aufmerksamkeit. 2011 berichteten Hansen *et al.* erstmalig von der erfolgreichen Erprobung eines replikationskompetenten CMV-

basierten Impfvirus im Affenmodell (Hansen *et al.*, 2011). Dabei wurden die Tiere mit einem genetisch modifizierten Beta-Herpesvirus des Makaken (RhCMV/SIV) infiziert. Dieses Impfvirus verbleibt nach Primärinfektion latent im Wirt und führte in variablen Zeitintervallen zu transienten Virämien. Zusätzlich erfolgte die Vakzinierung mit einem Adeno5-basierten Impfvektor (Ad5/SIV) und einem DNA-Impfstoff unter Verwendung der *prime/boost*-Strategie. Durch die Impfvektoren wurden die SIV-abgeleiteten Antigene Gag, Pol, Rev/Nef/Tat und Env präsentiert. Es konnte gezeigt werden, dass 13 der 24 Rhesusaffen der RhCMV/SIV-Impfgruppen nach mehrfacher intra-rektaler SIVmac239 (bis zu 25) Belastung die Virämie kontrollieren konnten. Dagegen zeigten alle Tiere der Vergleichsgruppen (unbehandelt n=27, DNA/Ad5 n=9) einen SIV-typischen Infektionsverlauf. Obwohl in diesem Versuch keine Verminderung der Infektionsraten erreicht wurde, stellt die Viruskontrolle in über der Hälfte der Tiere einen enormen Erfolg dar. Dabei scheint die Verwendung von solchen replizierenden, potentiell pathogenen Impfviren für den Einsatz im Menschen als zu riskant, weil die möglichen einzugehenden Risiken bislang nicht abgeschätzt werden können. Aus diesem Grund besteht der dringende Bedarf die Entwicklung neuer Ansätze und Techniken weiter voranzutreiben, um dem Ziel eines breiten HIV-Impfschutzes näher zu kommen.

1.2 Potential von Anti-Tumorimpfstoffen als Begleittherapie

Der Einsatz von Anti-Tumorimpfstoffen zur gezielten Stimulation einer körpereigenen Abstoßungsreaktion des Tumorgewebes gewinnt dank der guten Ergebnisse in den klinischen Testphasen immer mehr an Bedeutung. Bereits die Zulassung eines Anti-Prostatatumor-Impfstoffes in den USA belegt die Erfolgsaussichten dieses Ansatzes, sich als sinnvolle Ergänzung zu den klassischen Behandlungsmethoden zu etablieren. In einer Vielzahl von Studien konnte gezeigt werden, dass die Stimulation einer tumorspezifischen Immunantwort durch aktive Immunisierung die Krankheitsprogression deutlich verzögern kann. Beispielhaft sei hier eine aktuelle Phase II-Studie erwähnt, durch die eine Verlängerung der Überlebenszeit von Glioblastompatienten mittels Peptidimmunisierung gegen eine EGFRvIII-Variante von 15 auf 26 Monate erreicht werden konnte. In drei Fällen (n=18) konnte durch die Applikation des Impfstoffes das Tumorwachstum bis zur Publikation der Studie sogar ganz gestoppt werden (Sampson *et al.*, 2010). Ähnliche Erfolge erzielte die Applikation von Anti-Tumorimpfstoffen z.B. bei der Behandlung von Nierenzellen-

karzinomen, Mammakarzinomen oder Prostatakrebs (Jocham *et al.*, 2004; Romond *et al.*, 2005; Madan *et al.*, 2009).

Das Prostatakarzinom (PCa) zählt zu den häufigsten Krebsarten bei Männern über 50 und ist zu einem späten Stadium der Krankheit durch seine stark metastasierende Eigenschaft nur noch schwer behandelbar. Deshalb zählt Prostatakrebs zu den dritthäufigsten krebsbedingten Todesursachen in Deutschland. Jedoch liegt die Überlebensrate bei einer früh gestellten Diagnose bei 92%. Dabei ist die Zahl der gestellten Frühdiagnosen durch das gesetzliche Prostatakrebs Früherkennungsprogramm der Bundesregierung deutlich gestiegen (RKI - Krebs in Deutschland 2007/2008). Bei früh diagnostizierten PCa begründet sich die gute Prognose hauptsächlich dadurch, dass die Drüse vollständig operativ entfernt werden kann, ohne dabei lebensnotwendige Systeme zu beeinträchtigen. Jedoch verschlechtern sich die Heilungschancen deutlich bei einer bereits eingetretenen Metastasierung. Um dieses Stadium der Krankheit besser therapieren zu können, werden derzeit große Hoffnungen in die Entwicklung von Anti-Prostatatumor-Vakzinen gesetzt. Dabei gelten gerade im Fall des PCa die Erfolgchancen bei der Entwicklung spezifischer Immuntherapien als besonders hoch. Dies begründet sich vor allem in den speziellen charakteristischen Eigenschaften dieser Tumorerkrankung. Dazu zählt das relativ langsame Tumorwachstum, wodurch für die Induktion einer Autologen-Immunantwort mehr Zeit zur Verfügung steht (Sanda *et al.*, 1994). Dabei zählt das spezielle Expressionsmuster von Prostatatumorzellen zu den bedeutendsten charakteristischen Merkmalen, welches die Entwicklung von prostataspezifischen Anti-Tumorimpfstoffen rechtfertigt. Es konnte gezeigt werden, dass in den meisten Fällen spezielle Prostataproteine in Tumorzellen überexprimiert werden (Reiter *et al.*, 1997; Rubin *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2002). Zusätzlich ist das Proteom von Prostatazellen sehr spezifisch. Damit bieten sich hervorragende Angriffspunkte für eine immunologisch induzierte Tumorabstoßungsreaktion. Zusätzlich ist die immunologische Toleranz gegen diese körpereigene Proteine vergleichbar schwach ausgeprägt, wodurch im Verlaufe einer Tumorerkrankung die spontane Bildung von Autoimmunantikörpern im Patienten beobachtet werden konnte (Nilsson *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2005). Durch eine aktive Immunisierung kann diese Toleranz überwunden und eine breite zelluläre und humorale Immunantwort induziert werden (Wang *et al.*, 2005). Dabei könnte durch die Verwendung von xenogenen (z. B. murine) Antigenen eine mögliche Toleranz noch effektiver umgangen werden. Es konnte gezeigt werden, dass durch die hohe Homologie von murinen und humanen Sequenzen, immunogene Epitope weitgehend erhalten bleiben, wodurch

eine Autoimmunität in der Maus durch humane Proteine erzielt werden konnte (Gregor *et al.*, 2005).

Wie bereits erwähnt, erfolgte 2010 die Zulassung einer immunstimulatorischen Methode zur postoperativen Prostatakrebs-Behandlung für den amerikanischen Markt. Zudem befinden sich weitere Impfstoffe in den klinischen Testphasen. Im Folgenden sollen diese Präparate kurz beschrieben werden. Das Produkt „Provenge®“ (Sipuleucel-T) der Firma Dendreon wurde 2010 von der US-Arzneimittelbehörde als Impfstoff zur Behandlung des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms zugelassen und besteht aus einer dreimaligen Infusion extrakorporal stimulierter autologer APCs (*antigen presenting cells*). Als immunstimulatorisches Antigen dient dabei ein Fusionsprotein, bestehend aus der prostataspezifischen sauren Phosphatase (PAP) und dem Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF) als genetisches Adjuvans. Die Stimulation der APCs, insbesondere der Dendritischen Zellen (DCs), erfolgt durch *ex vivo* Elektroporation der Gensequenz des Antigens. Eine klinische Studie (Phase III) zeigte, dass die Lebensdauer austherapierter PCa-Patienten durch diese Behandlung um durchschnittlich 4,1 Monate zunimmt (n=512) (Kantoff *et al.*, 2010a). Die Behandlung ist jedoch sehr aufwendig und kostenintensiv und daher auf derzeit ca. 2000 Patienten pro Jahr beschränkt.

Ein weiterer in der klinischen Phase befindlicher Impfstoff ist „PROSTVAC-VF®“ der Firma Bavarian Nordic. Dieser basiert auf attenuierten Pockenviren und enthält neben dem Prostata-spezifischen Antigen (PSA) noch weitere immunstimulatorische Moleküle (B7.1, ICAM-1, und LFA-3). Auch dieser Impfstoff führte in der klinischen Phasen II zu einer signifikanten Verlängerung der Lebenszeit von metastasierenden PCa Patienten (Madan *et al.*, 2009; Kantoff *et al.*, 2010b). Neben diesem Pox-Impfstoff befinden sich weitere auf MVA-basierte Anti-PCa-Vakzine in den klinischen Testphasen I und II. (MVA-BN®-PRO: McLeod *et al.*, 2013 und TroVax®: Harrpo *et al.*, 2010; Amato *et al.*, 2012). Obwohl diese Impfviren keine persistierende Infektion etablieren können, wurde mit der Verwendung transient replizierender Impfviren erstmals der Notwendigkeit einer länger anhaltenden Stimulation der Anti-Tumorantwort Rechnung getragen.

Neben den Prostataantigenen PAP und PSA werden noch weitere hochspezifische tumorassoziierte Gene überexprimiert, welche einen Angriffspunkt für die Anti-Tumorvakzinierung bieten. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass PSCA (*prostate stem cell antigen*) in 88% der Androgen-abhängigen und -unabhängigen PCa verstärkt auf der Zelloberfläche exprimiert werden (Reiter *et al.*, 1997). Dabei bietet die Überexpression von tumorspezifischen Oberflächenmarkern einen

hervorragenden Angriffspunkt, für die Entwicklung von antikörperbasierten Immunstimulatoren. Diesbezüglich konnten *in vivo* Studien belegen, dass durch die Applikation von monoklonalen PSCA-spezifischen Antikörpern eine Hemmung des Tumorwachstums in Mäusen erzielt werden konnte (Saffran et al., 2001). Einen weiteren Hinweis, für die Wirksamkeit von monoklonalen Antikörpern als Anti-Tumorwirkstoff, lieferte eine klinische Phase I-Studie. Dabei führte die Gabe eines radioaktiv markierten monoklonalen Antikörpers gegen das Prostata spezifische Membranantigen (PSMA) zur Reduktion des Plasma-PSA-Spiegels in einigen Patienten (Bander et al., 2005). Ähnliche Erfolge lieferte die Behandlung mit *ex vivo* PSMA-elektroporierter DCs in einer klinischen Phase II-Studie (Murphy et al., 2000). Neben diesen oben genannten Vakzinierungsversuchen mit genetischen Impfstoffen erfolgte die Erprobung von inaktivierten Tumorzellen als Impfstrategie. Das unter dem Namen „GVAX“ bekannte Präparat erzielt in der klinischen Phase II eine signifikante Verlängerung der Lebenszeit in der Impfgruppe (Higano et al., 2008). Dagegen führte die Applikation von GVAX, in einer klinischen Phase III-Studie, zu einer Erhöhung der Mortalitätsrate, wodurch der Einsatz inaktiverter Tumorzellen eher kritisch bewertet wurde (Small et al., 2009; Copier & Dalglish, 2010).

Dennoch belegt die Vielzahl von positiv bewerteten Studien das große Potential von Anti-Tumorimpfstoffen als begleitende Tumorthherapie. Gerade im Fall der postoperativen Anwendung könnte vermutlich eine die permanente Stimulation der tumorgerichteten Immunabwehr zu einer deutlichen Minimierung der Rückfallquote beitragen. Jedoch bieten die bisherigen Ansätze nur eine temporär begrenzte Stimulation der autologen Immunabwehr. Aus diesem Grund scheint es sinnvoll, die Entwicklung von Antitumorimpfstoffen auf replizierende Vektoren auszuweiten, um durch eine permanente Präsentation von Antigenen die immunologische Toleranz effektiver überwinden zu können.

1.3 Foamyviren als einziger Vertreter der *Spumaretrovirinae*

Retroviren sind intrazelluläre Parasiten, welche vollkommen von der Stoffwechselaktivität der Wirtszelle abhängig sind. Die Viren dieser Familie kennzeichnen sich hauptsächlich durch eine gemeinsame Enzymklasse: der Reversen Transkriptase (RT). Dieses Enzym katalysiert die Synthese des einzelsträngigen viralen RNA Genoms in doppelsträngige DNA, welche dann als Pro-Virus durch die viruseigene Integrase (IN) in das Genom der Wirtszelle integriert. Durch diese

Integration der viralen DNA können irreversible Schädigungen des Wirtsgenoms verursacht und wirtsspezifische Onkogene durch die Promotoraktivität der viralen 3'LTR (*long terminal repeat*) aktiviert werden. Auch ermöglicht es dem Virus, seine Erbinformation innerhalb der Wirtspopulation vertikal durch Vererbung weiter zu geben (Keimzellübertragung). In allen Säugetierarten findet man heute endogene Pro-Viren und sogenannte Retroelemente. Das menschliche Genom besteht beispielsweise zu ca. 8% bis 10% aus diesen Elementen (Gifford & Tristem, 2003). Dabei scheinen diese vorzeitlichen Relikte auch nützliche Aufgaben in der menschlichen Physiologie zu übernehmen (Bannert & Kurth, 2004; de Parseval & Heidmann, 2005). Jedoch erfolgt die hauptsächliche Ausbreitung innerhalb einer Wirtspopulation durch horizontale Übertragung, das heißt durch Infektion von Wirt zu Wirt. Zu den bekanntesten Vertretern der Retroviren gehört das Humane Immundefizienzvirus (HIV-1), welches 1983 als Ursachen für das *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (AIDS) identifiziert wurde (Chermann *et al.*, 1983).

Foamyviren gehören ebenfalls zur Familie der Retroviren und sind der einzige bekannte Genus der Unterfamilie der „*Spumaretrovirinae*“. Sie unterscheiden sich in wesentlichen Eigenschaften von anderen Retroviren, wie Replikationszyklus, Morphogenese und Partikelstruktur (Linial, 1999; Lecellier & Saib, 2000; Linial & Eastman, 2003). Als auffälligstes Merkmal der Spumaviren gilt die in allen bekannten Wirten beobachtete vollkommene Apathogenität. Wohingegen die Infektion *in vitro* einen ausgeprägten zytopathischen Effekt (CPE) induziert. Dieser kennzeichnet sich durch die Bildung großer mehrkerniger Zellstrukturen, welche als Synzytien bezeichnet werden und durch die Expression des retroviralen Rezeptorproteins vermittelt werden. Bei einer foamyviralen Infektion werden sehr viele Moleküle dieses Oberflächenproteins innerhalb der Zelle gebildet, wodurch eine verstärkte Synzytienbildung induziert wird. Als zweites charakteristisches Merkmal *in vitro* kann eine Vakuolisierung innerhalb des Zellplasmas beobachtet werden. Mikroskopisch betrachtet erscheinen diese Strukturen schaumartig, wodurch das Spuma- (lat.: Schaum) oder Foamy- (engl.: schaumig) Virus seinen Namen erhielt. Dieses Phänomen wurde 1954 in Zellkulturen aus Affennierengewebe erstmals beschrieben (Enders & Peebles, 1954). Doch bis heute ist noch unklar was genau diese Vakuolisierung auslöst. In Abb. 1 ist beispielhaft eine Aufnahme gezeigt, welche die namensgebenden typischen CPEs einer foamyviralen Infektion verdeutlichen.

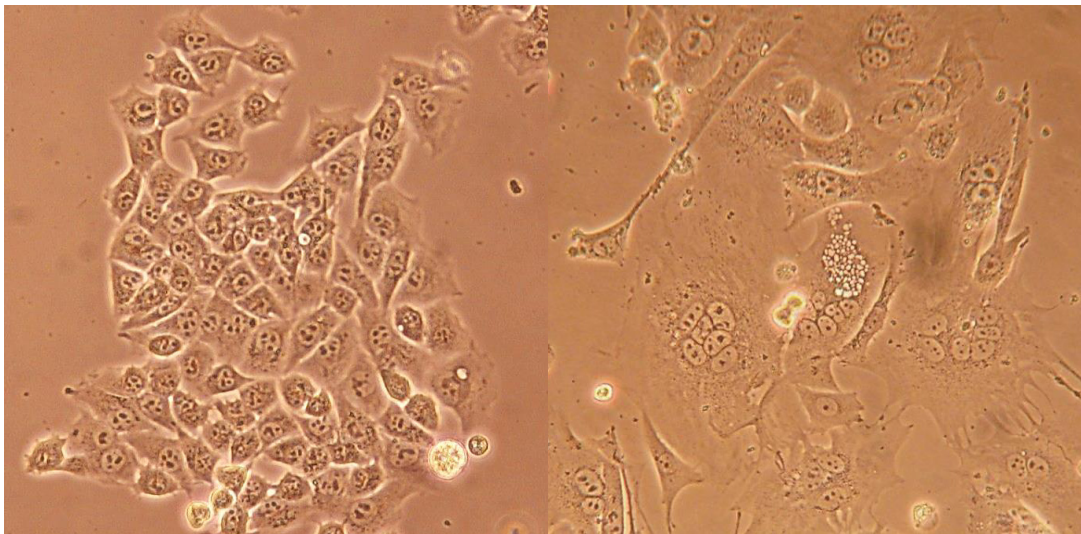


Abb. 1: Lichtmikroskopische Aufnahmen von naiven und Foamyvirus-infizierten BHK-21-Zellen

Links sind naive BHK-21-Zellen zu sehen (mikroskopische Vergrößerung von 1:400). Rechts ist eine durch Foamyviren degenerierte BHK-21-Zellkultur gezeigt (mikroskopische Vergrößerung von 1:400). Diese Strukturen sind für eine foamyvirale Infektion *in vitro* charakteristisch. In der Mitte befindet sich eine Vakuolen-artige Struktur, welche sich innerhalb einer mehrkernigen Synzytie gebildet hat. Umliegend sind weitere Synzytien erkennbar.

Trotz der außergewöhnlichen zytopathischen Effekte *in vitro* verläuft die natürliche Infektion des Wirtes latent und ohne jegliche Anzeichen einer Pathogenität (Falcone *et al.*, 2003; Boneva *et al.*, 2007). Bislang sind mehrere natürliche Foamyvirus-Subtypen in verschiedenen Spezies identifiziert worden. Dazu gehören z.B. nicht-humane Primaten, Katzen, Rinder und Pferde. Die Foamyvirusprävalenz bei nicht-humanen Primaten ist hoch und kann bei in Gefangenschaft lebenden Tieren Werte bis zu 100% erreichen (Schweizer *et al.*, 1995; Blewett *et al.*, 2000; Meiering & Linial, 2001). Dabei wird die Infektion vermutlich durch Beißen, Kratzen oder Lecken offener Wunden innerhalb der Wirtspopulation übertragen (Falcone *et al.*, 2003). Auch konnte gezeigt werden, dass eine Infektionsübertragung durch Bluttransfusionen bei Affen möglich ist (Brooks *et al.*, 2007). Bei infizierten Wirten konnte in fast allen Geweben pro-virale DNA gefunden werden, wobei lediglich in der oralen Mukosa eine Transkription von viraler mRNA nachgewiesen werden konnte (Falcone *et al.*, 1999a; Murray *et al.*, 2006). Somit ist vermutlich der Speichel das Hauptreservoir für freie virale Partikel, wodurch der Hauptübertragungsweg durch Speichel-Blut-Kontakt als wahrscheinlich gilt. Bei Rindern erfolgt die Transmission wahrscheinlich durch eine Mutter-Kind-Übertragung durch die Muttermilch (Roman *et al.*, 2007). Dabei wurde innerhalb einer in Polen lebenden Kohorte eine Prävalenz von 42% nachgewiesen. Der durchgeführte Antikörperrnachweis gegen Foamyviren bei in Deutschland lebenden Rindern zeigte lediglich eine Infektionsrate von 7%. Eine kürzlich veröffentlichte Studie, welche die feline Foamyvirus (FFV)-Infektionsraten von in

Deutschland lebenden Hauskatzen mittels Antikörpernachweis untersuchte, konnte eine Prävalenz von 39% nachweisen (Bleiholder *et al.*, 2011).

Die Entdeckung der Foamyviren 1971, welche aus dem Tumorgewebe eines kenianischen Patienten isoliert wurden, implizierte die Existenz eines Foamyvirus innerhalb der menschlichen Population (Achong *et al.* 1971). Somit erhielt dieses Isolat die anfängliche Bezeichnung „humanes Foamyvirus“ (HFV). Jedoch ergaben spätere Sequenzanalysen, dass es sich bei diesem ersten menschlichen Isolat um ein Schimpansen-Foamyvirus (SFVcpz(hu)) handeln musste, welches vermutlich durch Zoonose auf den Patienten übertragen wurde (Herchenröder *et al.*, 1994). Auf Basis dieser Entdeckung wurde die Existenz eines humanen Foamyvirus verworfen. Jedoch gilt die zoonotische Transmission von Primaten auf den Menschen als wahrscheinlich (Schweizer *et al.*, 1995). Es folgten weitere Untersuchungen hinsichtlich der zoonotischen Transmission von Foamyviren auf den Menschen. Dabei konnten verschiedene simiane Foamyvirussubtypen (u.a. SFVmac, SFVagm, SFVbab, SFVgor) im Menschen nachgewiesen werden. 2-4% der untersuchten Menschen, welche in direkten Kontakt zu nicht-humanen Primaten stehen (Zoomitarbeiter, Mensch mit Kontakt zu Tempelaffen in Asien), zeigten eine Immunantwort gegen HFV. Die Transmission von Primaten auf den Menschen erfolgt dabei durch direkte Bisse oder Kontakt von offenen Wunden mit infektiösem Speichel der Tiere. Auch die Verarbeitung von Affenfleisch kann zu einer Infektion führen (Heneine *et al.*, 1998; Sandstrom *et al.*, 2000; Brooks *et al.*, 2002; Wolfe *et al.* 2004, Jones-Engel *et al.*, 2008). Dagegen konnte die Übertragung von Mensch-zu-Mensch bislang nicht nachgewiesen werden. Dies belegte eine Langzeitstudie mit SFV-infizierten Menschen, bei der weder durch sexuellen Kontakt noch durch den Austausch von Körperflüssigkeiten wie Speichel, Blut oder Blutprodukte eine Mensch-zu-Mensch-Transmission nachgewiesen werden konnte. Somit gilt der Mensch als „*dead-end host*“, wodurch die Existenz einer endemisch infizierten Population nahezu ausgeschlossen werden kann. Wie auch in den natürlichen Wirten verläuft die zoonotische Infektion latent und ohne jegliche Anzeichen einer virusinduzierten Pathogenese. Jedoch führt die pro-virale Integration in das Genom der Wirtszelle zu einer lebenslangen Persistenz des Virus (Boneva *et al.*, 2002, 2007; Heneine *et al.*, 2003). Foamyviren sind die ältesten bekannten Retroviren. Da man in nahe verwandten Primatenspezies besonders eng verwandte SFV-Subtypen vorfindet, wird davon ausgegangen, dass diese Viren schon seit mehr als 60 Millionen Jahren mit ihren Wirtsorganismen koexistieren (Switzer *et al.*, 2005). In dieser langen Ko-Evolution ist höchstwahrscheinlich auch die Apathogenität der Foamyviren begründet.

1.3.1 Partikelbau und genetische Organisation der Viren

Foamyvirale Partikel enthalten, im Gegensatz zu den anderen bekannten Retroviren, keine klassisch-prozessierten gruppenspezifische Antigen (Gag)-Spaltprodukte wie Matrixprotein (MA), Kapsidprotein (CA) oder Nukleokapsidprotein (NC). Stattdessen setzt sich das virale Proteingerüst aus dem kompletten Gag-Vorläuferprotein und einem prozessiertem 3-4 kDa kürzerem Gag-Protein zusammen. Beide Proteine sind am Aufbau der Virionen beteiligt (Enssle *et al.* 1997, Zemba *et al.* 1998). Aus diesem Grund bezeichnet man foamyvirale Partikel als *immature*, weil die Erscheinungsform unter dem Elektronenmikroskop (EM) eher unreifen Virionen von Retroviren ähneln (Saib *et al.* 1995a). Als zweites charakteristisches Merkmal gilt die ungewöhnliche Dichte von eintrittsvermittelnden Rezeptorproteinen (Env) auf der Virusoberfläche. Diese glykosylierten Proteinstrukturen setzen sich aus der transmembranen Einheit (TM) und der Oberflächeneinheit (SU) zusammen und bilden als Trimere das funktionale Rezeptormolekül. Zusätzlich verfügen Foamyviren über ein ungewöhnlich langes Signalpeptid (LP), welches ebenfalls innerhalb des Virion lokalisiert ist (Lindemann *et al.* 2001). Die durchschnittliche Partikelgröße beträgt 100-140 nm. Abb. 2 zeigt beispielhaft eine EM-Aufnahme von SFVmac-Virionen. In der Abbildung ist deutlich eine hohe Dichte von Env-Strukturen auf der Virusoberfläche zu erkennen, gefolgt von der Lipid-Doppelmembran und dem sphärischem Kern.

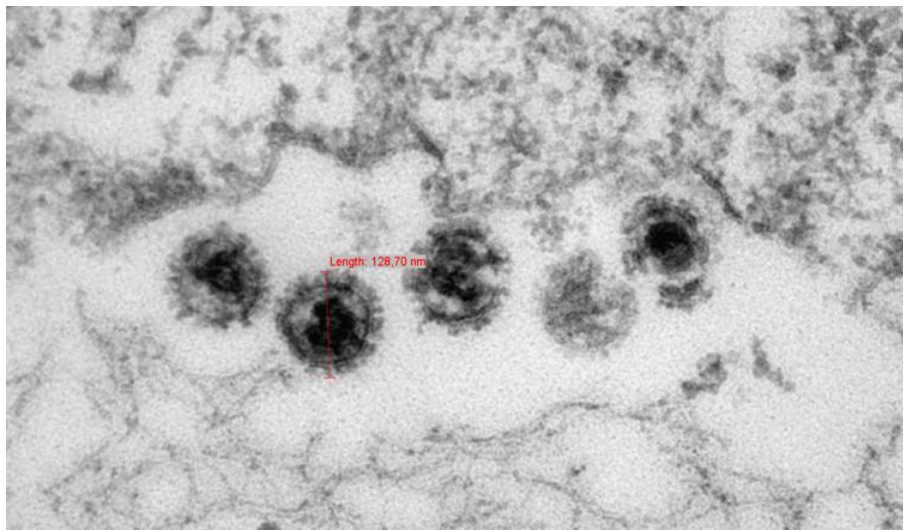


Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von SFVmac Partikeln (Quelle: Lars Möller, RKI)

Diese EM Aufnahme zeigt Virionen, des während der Promotion gewonnen primärisolates SFVmac-R289hybAGM (Blochmann *et al.*, 2014). Zu sehen sind die auf der Oberfläche befindlichen Env-Strukturen in hoher Dichte, gefolgt von der Lipid-Doppelmembran und dem innerem Kern. Der Durchmesser der Partikel beträgt 128,70 nm. Die Viren wurden in BHK-21-Zellen kultiviert. Diese Aufnahme wurde von der RKI-internen Elektronenmikroskopie erstellt, mit Hilfe von Herrn Lars Möller.

Innerhalb des von Gag-Proteinen umhüllten Kapsids befinden sich die Spaltprodukte des Pol-Vorläuferproteins. Dazu zählen die Intergrase (IN) und der Protease-Reverse Transkriptase /RNase-H - Komplex (PR-RT/RH) (Netzer *et al.*, 1993; Morozov *et al.*, 1997). Der wichtigste Bestandteil des Virions ist das virale Genom, welches bei Foamyviren zumindest teilweise bereits als umgeschriebene DNA vorliegt, wodurch sich das Virus von der Familie der Orthoretroviren unterscheidet (Moebes *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 1999).

Aufgrund seiner genetischen Organisation zählt das Foamyvirus zu den komplexen Retroviren. Mit einer Genomgröße von 12–13 kb zählt es zu den größten innerhalb der Retrovirusfamilie (Lecellier & Saib, 2000). Kodiert werden die klassischen retroviralen Gene *gag*, *pol* und *env*. Zusätzlich gibt es zwei weitere Leserahmen für die akzessorischen Proteine Bet und Tas. Diese befinden sich zwischen dem *env*-Gen und der 3'LTR und werden somit auch als *bet*-Gene bezeichnet (*bet* = *between env and LTR*) (Flügel *et al.*, 1987). Flankiert wird das virale Genom von den für Retroviren typischen LTR-Regionen, welche für die Integration von essentieller Bedeutung sind und in die U3-, R- und U5-Region eingeteilt werden. Zusätzlich enthalten die LTR-Regionen eine Promotoraktivität und ein Polyadenylierungssignal. Dabei vermittelt die 5'LTR die Translation der viralen Gene. Wie bereits erwähnt, kann die 3'LTR vermittelte Promotoraktivität eine Integrationsort-abhängige Aktivierung von Onkogenen induzieren, wodurch Retroviren u. a. ein onkogenes Potential besitzen (Pedersen & Sørensen, 2010). Jedoch konnte bei Foamyviren bislang keine infektionsbedingte Tumorgenese beobachtet werden. Neben diesen LTR-Promotoren besitzen Foamyviren einen zusätzlichen internen Promotor (IP), welcher innerhalb des *env*-Gens lokalisiert ist. Dieser IP gilt als weiteres charakteristisches foamyvirales Merkmal, da diese Struktur bei keinem anderen Retrovirus zu finden ist. Über den IP werden die akzessorischen Gene *bet* und *tas* transkribiert. Dieses Element ist für die Replikation der Foamyviren essentiell (Löchelt *et al.*, 1994; 1995). Darüber hinaus verfügen Foamyviren auch über klassische retrovirale Sequenzen, welche für den Replikationszyklus von Bedeutung sind. Dazu zählen die Primerbindungsstelle (PBS) in der U5-Region der 5'LTR, welche als Startpunkt für die reverse Transkription fungiert und der Polypurintrakt (PPT), welcher sich unmittelbar vor der 3'LTR lokalisiert und ebenfalls an der Reversen Transkription beteiligt ist (Flügel *et al.*, 1987; Maurer *et al.*, 1988). Zusätzlich zum 3'PPT verfügen Foamyviren über einen weiteren internen PPT, welcher sich innerhalb des *pol*-Gens lokalisiert und vermutlich als zweiter Initiationsort zur DNA-Plusstrangsynthese fungiert (Kupiec *et al.*, 1988; Charneau *et al.*, 1992). Neben diesen für die Reverse Transkription essentiellen

Sequenzen beinhalten Foamyviren weitere Sequenzelemente, welche für Retroviren typisch sind. Dazu zählen *cis*-aktive Sequenzen (CAS), welche für die Genomverpackung und die Enkapsidierung der viralen Polymerase benötigt werden (Erlwein *et al.*, 1998; Peters *et al.*, 2005). Von den viralen Promotoren werden unterschiedliche mRNA-Spezies translatiert. In Abb. 3 ist der Aufbau des foamyviralen Genoms sowie die wesentlichsten Transkripte der viralen mRNA schematisch dargestellt (Rethwilm, 2010).

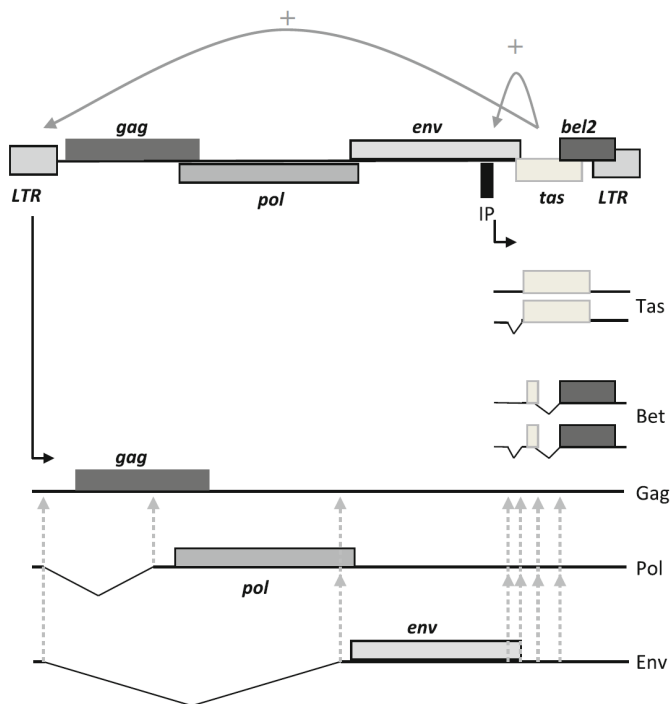


Abb. 3: Schematischer Aufbau des foamyviralen Genoms und Darstellung der wesentlichsten transkribierten mRNA-Spezies.

Die Abb. zeigt das foamyvirale Genom mit den LTR-Regionen, den Genen *gag*, *pol* und *env* und der akzessorischen Gene (*tas* und *bet*) (oben). Von dem internen Promotor (IP) werden die mehrfach gespleißten Transkripte für die akzessorischen Proteine Tas und Bet abgelesen. Dabei fungiert Tas als Enhancerprotein, welches die Transkription des IP reguliert und gleichzeitig die Translation der viralen Strukturgene durch Bindung an die U3-Region der 5'LTR aktiviert. Die *gag*-mRNA entspricht gleichzeitig der viralen Vollängen-mRNA und wird durch die Reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben. Die Pol-Synthese wird von einer eigenständigen mRNA gebildet, sowie wie die Rezeptormoleküle des *env*-Gens. Neben diesen mRNA-Spezies werden noch weitere mehrfach gespleißte Transkripte gebildet, welche durch Pfeile angedeutet wurden. Unter anderem ein Env-Bet-Fusionsprotein.

Quelle: *Med. Microbiol. Immunol.* (2010) 199. S. 198; Rethwilm, 2010

Gag-, Pol- und Env-Prozessierung:

Die Strukturproteine Gag und Env sowie das enzymatische Polyprotein Pol werden jeweils von einer eigenständigen mRNA translatiert (siehe Abb. 3). Dabei ist die Synthese einer gespleißten *pol* mRNA-Spezies ein weiteres charakteristisches Merkmal der Spumaretroviren (Enssle *et al.*, 1996; Jordan *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1996). Bei den Orthoretroviren werden die Proteine Gag und Pol entweder durch *frameshift* oder durch Überlesen des Stopp-codons von der viralen Vollängen-mRNA translatiert. Das Gag Protein wird, wie bei den anderen Retroviren, von der genomischen Vollängen-mRNA translatiert. Wie bereits erwähnt, wird das gruppenspezifische Antigen (Gag) nicht in die für Retroviren typischen Spaltprodukte MA, CA und NC prozessiert. Stattdessen erfolgt die proteasevermittelte Spaltung hauptsächlich an einer Stelle am Ende des C-terminalen Bereichs.

Dabei wird abhängig vom Subtyp ein 3-4 kDa großes Peptid vom Gag-Vorläuferprotein abgespalten. Sowohl das Vorläuferprotein als auch das Spaltprodukt sind für die Bildung infektiöser Partikel essentiell und bilden im Western Blot die charakteristische foamyvirale Doppelbande (Enssle *et al.*, 1997; Zemba *et al.*, 1998; Flügel & Pfrepper, 2003). Zusätzlich zu den Spaltsequenzen befinden sich noch weitere funktionelle Sequenzabschnitte innerhalb des Gag-Proteins, welche an der Bildung funktionaler Partikel beteiligt sind (z.B. Glycine-Arginin Bereiche; *GR-Boxes*) (Schliephake & Rethwilm, 1994; Eastman & Linial, 2001; Cartellieri *et al.*, 2005).

Von dem enzymatischen Pol-Vorläuferprotein wird lediglich die IN-Einheit autokatalytisch abgespalten. Somit bleibt Protease und RT/RH voneinander abhängig als Proteinkomplex erhalten (Netzer *et al.*, 1993; Pfrepper *et al.*, 1998). Des Weiteren konnte eine Mn^{2+} abhängige katalytische Aktivität des RT/RH-Komplex gezeigt werden (Kögel *et al.*, 1995). Außerdem weist der RT/RH-Komplex eine gesteigerte Enzymaktivität auf, wodurch die verstärkte Bildung foamyviraler DNA *in vitro* erklärt werden könnte (Rinke *et al.*, 2002; Boyer *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu den Gamma-retroviren bevorzugt die foamyvirale IN weniger aktiv transkribierte Gene und Promotorregionen, wodurch das geringere kanzerogene Potential der Foamyviren begründet werden könnte (Nowrouzi *et al.*, 2006).

Das Env-Vorläuferprotein wird nach der Synthese am endoplasmatischen Retikulum (ER) in die Untereinheiten LP, SU und TM durch zelleigene Proteasen gespalten. Nach der Spaltung liegt das TM-Protein als TypI α -Helix-Membranankerprotein vor und bindet mit der extrazellulären Domäne das frei werdende SU-Protein (Pietschmann *et al.*, 2000; Lindemann & Göpfert, 2003; Duda *et al.*, 2006). Das für Retroviren ungewöhnlich lange LP oder Signal Peptid verfügt über eine Transmembrandomäne und ist Teil der viralen Rezeptor-Struktur. Der zytoplasmatische Teil des LPs bindet das Gag Strukturprotein und ist somit für die Bildung foamyviraler Partikel essentiell (Lindemann *et al.*, 2001). Dieser für Retroviren ungewöhnliche Aufbau des Rezeptormoleküls verhindert vermutlich auch die Pseudotypisierung foamyviraler Partikel mit den Env-Glykoproteinen anderer Retroviren, wie dies innerhalb der Familie der Orthoretroviren möglich ist (Lindemann *et al.*, 1997; Fischer *et al.*, 1998). Alle Untereinheiten verfügen über Glykosylierungsstellen (N=15 bei HFV), welche vorwiegend im Bereich von SU stark glykosyliert werden (Lüftenegger *et al.*, 2005).

Akzessorische Proteine:

In 3'-Richtung nach dem IP befinden sich zwei offene Leserahmen. Diese kodieren die Sequenz für die akzessorischen Proteine Tas und Bet (siehe Abb. 3). Der Transaktivator der Spumaviren (Tas) wird vom ersten offenen Leserahmen (ORF-1) kodiert. Dabei erfolgt die IP-vermittelte Aktivierung der mRNA-Synthese durch den Transaktivator selbst (Rethwilm *et al.*, 1991). Mit steigender Zellkonzentration bindet Tas am 5'LTR-Promotor und aktiviert die Synthese der viralen Gene *gag*, *pol* und *env*. Somit ist Tas für die virale Replikation essentiell (Löchelt *et al.*, 1991; Erlwein & Rethwilm, 1993). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Tas auch zelluläre Gene aktivieren kann (Wagner *et al.*, 2000). Die dafür benötigte DNA-Erkennungsdomäne befindet sich im zentralen Bereich des Proteins, hinter dem mit Bet identischen N-terminalen Bereich. Am C-terminalen Ende befinden sich ein nukleäres Lokalisationssignal sowie die Proteinsequenzen für die Aktivierung der Genexpression (He *et al.*, 1993; Venkatesh & Chinnadurai, 1993; Chang *et al.*, 1995). Neben der Vollängen-mRNA prozessieren Foamyviren auch eine Δ *tas*-Deletionsvariante, welche ebenfalls als pro-virale DNA in das Wirtsgenom integrieren kann und vermutlich eine Funktion während der persistenten Infektion übernimmt (Saib *et al.*, 1995b).

Das akzessorische Bet-Protein wird von einer gespleißten mRNA gebildet (siehe Abb. 3). Dabei setzt sich die Sequenz aus dem N-terminalen Teil von Tas und dem kompletten *bel2*-ORF zusammen (Muranyi & Flügel, 1991). Innerhalb der Zelle lokalisiert sich Bet sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch (Lecellier *et al.*, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass Bet von Zellen sekretiert wird und von anderen Zellen wieder aufgenommen werden kann (Giron *et al.*, 1998). In infizierten Wirten konnte auch eine Bet-spezifische Antikörperantwort nachgewiesen werden (Hahn *et al.*, 1994). Bislang mehren sich die Hinweise, welche Funktion das virale Protein im Replikationszyklus der Foamyviren übernehmen könnte. Jedoch fehlt bis heute ein allgemeingültiges Gesamtkonzept, welches die Funktion vollständig erklären könnte. Dabei scheint die Expression von Bet die Zellen vor einer Superinfektion zu schützen (Bock *et al.*, 1998). Auch wurden natürliche Δ Tas-Virusvarianten gefunden, welche lediglich den fusionierten Bet Leserahmen enthalten. Dadurch wird der Leserahmen von Tas zerstört. Infolgedessen erhöht sich die Konzentration von Bet innerhalb der Zelle im fortgeschrittenen Infektionsstadium (Saib *et al.*, 1995b). Deshalb wird angenommen, dass Bet eine Art Tas-Antagonisten-Funktion übernehmen könnte und somit bei der Etablierung der latenten und persistenten Virusinfektion beteiligt sein könnte (Meiering & Linial, 2002). Auch konnte eine *in vitro* Interaktion mit dem antiviralen,

zellulären Protein APOBEC3 (*apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide 3*) beobachtet werden. Dies könnte auf eine HIV-Vif ähnliche Funktion hinweisen, bei der Bet zelleigenen Abwehrmechanismen entgegen wirken könnte. (Löchelt *et al.*, 2005; Russell *et al.*, 2005; Perkovic *et al.*, 2009). Jedoch widerlegt eine weitere Publikation diesen Effekt (Delebecque *et al.*, 2006). Somit ist die eindeutige Funktion des Bet-Proteins im Replikationszyklus der Foamyviren weiterhin offen.

1.3.2 Replikationszyklus der Foamyviren

Der foamyvirale Replikationszyklus gleicht in vielen Punkten dem Replikationszyklus anderer Retroviren. Jedoch treten innerhalb der Replikationsphasen einige charakteristische Unterschiede auf, welche Ähnlichkeiten zum Replikationszyklus der Hepadnaviren aufweisen. Aus diesem Grund gelten Foamyviren auch als evolutionäres Bindeglied zwischen Retro- und Hepadnaviren (Lecellier *et al.*, 2000). Diese Erkenntnis bedingte 2002 eine taxonomische Neueinteilung der Retrovirusfamilie in *Orthoretrovirinae* und *Spumaretrovirinae*, wobei Foamyviren als einziger Vertreter der Subfamilie *Spumaretrovirinae* hinzugefügt wurden (Rethwilm, 2003; Linial *et al.*, 2005). Als auffälligstes Merkmal der Unterteilung gilt die reverse Transkription der genomischen RNA zu einem späten Zeitpunkt des Infektionszyklus innerhalb der primär-infizierten Zelle (Yu *et al.*, 1996). Somit kann die Verpackung des viralen Genoms als RNA oder DNA erfolgen. Dabei gibt es Hinweise darauf, dass die DNA enthaltenden Virionen die infektiöse Fraktion darstellen könnten (Möbes *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 1999). Diese Beobachtungen machen Foamyviren scheinbar zu DNA-Viren, die über ein RNA-Intermediat replizieren, wodurch sie sich deutlich von den Orthoretroviren unterscheiden (Rethwilm, 2003). Der Viruseintritt wird vermutlich durch ein ubiquitär verbreitetes Zelloberflächenprotein vermittelt. In einer Reihe von Studien konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl von Zelltypen mit Foamyviren infiziert werden kann, darunter auch Zellen aus Vogel- und Reptiliengewebe (Mergia *et al.*, 1996; Hill *et al.*, 1999). Der dabei verwendete Rezeptor konnte jedoch noch nicht identifiziert werden. Der anschließende Eintritt des Kapsids in die Wirtszelle wird durch Endozytose und einem pH-abhängigen Fusionsprozess vermittelt (Picard-Maureau *et al.*, 2003; Duda *et al.*, 2006). Wie bei den anderen Retroviren erfolgt der Transport des Kapsids entlang des Mikrotubulsystems der Zelle bis zum Zentrosom, wo es längere Zeit verweilen kann. Der darauffolgende Abbau des Kapsids, die Formung des Prä-Integrationskomplexes sowie der Transport in den Zellkern konnten noch nicht vollständig aufgeklärt werden (Saib *et al.*, 1997a;

Petit *et al.*, 2003; Lehmann-Che *et al.*, 2007). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass der Eintritt des viralen Genoms in den Zellkern von der mitosebedingten Auflösung der Zellkernmembran abhängig ist (Patton *et al.*, 2004; Trobridge & Russell, 2004). Anschließend erfolgt die Integration des Pro-Virus in das Genom der Wirtszelle. Dabei bevorzugt die foamyvirale Integrase weniger aktiv transkribierte Integrationsorte, worauf im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird. Die Initialisierung der Gensynthese ist zelltypabhängig und wird durch eine zellinduzierte basale Expression des transaktivator Proteins vom IP eingeleitet. Dadurch werden erste Tas-Moleküle gebildet, welche den IP aktivieren und die Bildung weiterer Tas-Moleküle induzieren. Mit steigender Konzentration kommt es zur Aktivierung des LTR-Promotors und die Gene *gag*, *pol* und *env* werden transkribiert. Dabei bildet die ungespleißte *gag*-mRNA die Basis für neue virale Genome (Löchelt, 2003). Bei HFV/SFV findet die Partikelbildung hauptsächlich an den inneren Membranen des ERs und nur teilweise an der Zytoplasmamembran statt (Lindemann & Göpfert, 2003; Linial & Eastman, 2003; Delelis *et al.*, 2004). Gleichzeitig erfolgt die partielle Umschreibung der viralen RNA in DNA durch die RT. Es konnte gezeigt werden, dass sich *in vitro* große Mengen viraler, teilweise zirkuläre DNA-Moleküle anhäufen. Diese können in den Zellkern zurückkehren und ähnlich wie Retrotransposons erneut integrieren. Auch wurde ein Zell-zu-Zell-Transfer viraler DNA beobachtet (Heinkelein *et al.* 2000; Delelis *et al.*, 2005). Allerdings ist unklar, ob diese Besonderheiten für die Replikation der Foamyviren *in vivo* eine Bedeutung haben. Auch sind die Mechanismen die zu einer vollkommenen Apathogenität *in vivo* führen noch vollkommen ungeklärt.

1.4 Potential von foamyviralen Vektoren in der Gentherapie und Immunologie

Deutschland ist traditionell ein Zentrum der Forschung an Foamyviren. Bereits in den frühen 90er Jahren gelang es den Virologen an der Universität Würzburg und dem deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg, das Genom des 1971 entdeckten „humanen Foamyvirus“ (HFV) zu isolieren und für gentechnische Anwendungen nutzbar zu machen (Rethwilm *et al.*, 1990; Löchelt *et al.*, 1991). Die dabei erstellten replikationskompetenten viralen Vektoren (pHSRV) ermöglichten die genaue Charakterisierung der Replikationseigenschaften von Foamyviren *in vitro* sowie *in vivo*. Dadurch zählt das 1971 isolierte humane Foamyvirus zu den am besten untersuchten Isolaten innerhalb dieses Genus und erhielt deshalb die Bezeichnung *prototypic foamy virus* (PFV) (Rethwilm, 2003).

Resultierend aus der jahrzehntelangen Grundlagenforschung an Foamyviren entstehen derzeit erste an der klinischen Anwendung orientierte Ansätze, die nun auch weltweit aufgegriffen werden. Hierbei wird insbesondere der Einsatz von Foamyvirus-basierten, nichtreplizierenden Vektorsystemen für gentherapeutische Anwendungen angestrebt. Durch die fortwährende Optimierung dieses Vektorsystems konnte in den letzten Jahren eine alternative Methode zu den bereits etablierten retroviralen Transduktions-Systemen bereitgestellt werden (Wu *et al.*, 1998; 1999; Heinkelein *et al.*, 1998; 2002; Trobridge *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2002; Wiktorowicz *et al.*, 2009). Dabei bieten foamyvirale Systeme eine Reihe von bedeutenden Vorteilen gegenüber lentiviralen und γ -retroviralen Vektorsystemen. Als bedeutendster Vorteil kann die bereits erwähnte dauerhaft apathogene Infektion des Wirtes genannt werden. Darüber hinaus sind die erweiterte Verpackungskapazität (gesamt 9,2 kb) und der breite Zelltropismus weitere gewichtige Gründe für den Einsatz von foamyviralen Vektorsystemen (Mergia *et al.*, 1996; Hill *et al.*, 1999; Wiktorowicz *et al.*, 2009). Die Anwendbarkeit von foamyviralen Vektoren konnte bereits durch die Forschungsarbeiten einiger Arbeitsgruppen unter Beweis gestellt werden. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass primäre periphere Blutzellen, inklusive CD34+ hämatopoetische Stammzellen verschiedener Spezies (Mensch, Maus, Affen, Hund), erfolgreich transduziert werden können. Dabei konnten Transduktionsraten von 19% bis zu 84% erzielt werden. Diese Transduktions-Effizienz ist mit der lentiviralen Transduktionsperformance vergleichbar (Hirata *et al.*, 1996; Leurs *et al.*, 2003; Kiem *et al.*, 2007). Die Funktionalität und Stabilität der transduzierten Zellen wurden anschließend im Typ II Diabetes/schwere kombinierte Immundefizienz (NOD/SCID) Mäuse-Xenotransplantationsmodell getestet (Zucali *et al.* 2002; Leurs *et al.*, 2003). Dabei konnte eine stabile Genexpression von bis zu 18 Wochen nach Transplantation gezeigt werden (Josephson *et al.*, 2004). Aufbauend auf diesen Ergebnissen erfolgte die Entwicklung von anwendungsbezogenen foamyviralen Vektoren. Es konnte gezeigt werden, dass beispielsweise eine effektive Hemmung der HIV/SIV-Replikation (bis zu 98%) *in vitro* durch die Transduktion humaner Zellen mit anti-retroviralen Genen (anti-*rev/tat/env* siRNA/shRNA), gp41 fusions-inhibitor maC46 (T-20) oder den Rev-Antagonist RevM10 erzielt werden konnte (Park *et al.*, 2005; 2009; Taylor *et al.*, 2008; Keim *et al.*, 2010). Auch belegen erste Behandlungserfolge bei an Leukozytenadhäsionsdefekt (LAD) erkrankten Hunden, welche durch eine Infusion mit Vektor transduzierten, hämatopoetische Stammzellen behandelt wurden, das enorme Potential von foamyviralen Vektoren für gentherapeutische Anwendung (Bauer *et al.*, 2011; 2013).

Neben diesen Anwendungen von replikationsdefizienten foamyviralen Vektorsystemen in der Gentherapie wäre der Einsatz von replizierenden Vektorsystemen für die klinische Anwendung vorstellbar. Die denkbare Anwendung solcher Vektorsysteme könnte unter bestimmten Voraussetzungen die nachhaltige und dauerhafte Behandlung von genetisch bedingten Krankheitsbildern ermöglichen. Ebenfalls vorstellbar wäre der Einsatz von replizierenden foamyviralen Vektorsystemen zur gezielten Induktion einer dauerhaften und starken Immunantwort gegen eine Vielzahl von mikrobiologischen Erregern oder Tumorantigenen. Durch die vektorinduzierte, permanente Expression und Präsentation von definierten Proteinstrukturen könnte die Effektivität von genetischen Impfstoffen erheblich gesteigert werden. Der Einsatz von foamyviralen Vektoren als Immunstimulator gegen definierte virale Antigene konnte bereits in einer Publikation unter Beweis gestellt werden. Der Arbeitsgruppe von Martin Löchelt (DKFZ) ist es gelungen, replikationskompetente auf FFV-basierte Vektor-Expressions-Systeme zu konstruieren, welche unter Kontrolle der viralen Replikation die Expression von heterologen Antigenen einleiten konnten. Dabei konnte die gentechnisch eingefügte Erbinformation zur Antigenexpression durch horizontale Infektion auf naive Zellen übertragen werden. Jedoch führte die mehrfache Passage der Virusüberstände auf naive Zellen zum Verlust der Antigen-Expressions-Eigenschaften (Schwantes *et al.*, 2002). In der Folgepublikation wurde das erstellte FFV-Vektorexpressions-System auf die Anwendbarkeit als Impfvektorsystem im Katzenmodell getestet. Dabei wurden die Versuchstiere mit einem genetisch modifizierten feline Calicivirus (FCV)-Antigen-exprimierenden FFV-FCV-Hybridvirus immunisiert. Durch die persistente Replikation der FFV-FCV-Hybridviren sollte eine schützende, FCV-spezifische Immunantwort in den Katzen etabliert werden. Nach der anschließenden FCV-Exposition konnte eine signifikante Minderung der FCV-induzierten Geschwüre in der mit FFV-FCV-Hybridvirus immunisierten Gruppe erzielt werden. Jedoch führte die langfristige Kultivierung der Impfviren ebenfalls zum Verlust der heterologen Antigen-Expressions-Eigenschaften. Dabei konnte die genetische Instabilität des Vektorsystems auf die Komposition der Impfviren zurückgeführt werden (Schwantes *et al.*, 2003). Dennoch konnten diese ersten Immunisierungsversuche mit replizierenden foamyviralen Impfsystemen das Potential dieser Immunisierungsstrategie bestätigen. Bislang fehlen jedoch Folgestudien, die diesen Ansatz weiterführend aufgegriffen haben. Lediglich eine vorangegangene Arbeit der Arbeitsgruppe von Axel Rethwilm (Uni Würzburg) zeigte äquivalente Ergebnisse bei der Konstruktion von replizierenden, Antigen-exprimierenden Hybridviren auf der Basis von PFV (Schmidt & Rethwilm

1995). In dieser Arbeit wurde das Genom des Vektors pHSRV2 (PFV) so modifiziert, dass ebenfalls virusfremde Gene durch die Virusreplikation des Vektors zusätzlich exprimiert werden konnten. Dabei wurde der *bet*-Leserahmen von PFV durch die Gensequenz des Reporterproteins CAT (Chloramphenicol Acetyltransferase) ersetzt, um anschließend die Aktivität der Transferase durch ein CAT-Assay bestimmen zu können. Die Ergebnisse konnten eine CAT-Aktivität im Zellysate von infizierten Zellen bestätigen. Auch konnte der Erhalt der Virusreplikation über ein Virus-Titrations-Assay gezeigt werden. Zusätzlich wurde die Expression weiterer Proteine getestet und die Stabilität des Vektorsystems ermittelt. Dabei konnte, im Gegensatz zu der Arbeit von Schwantes *et al.* (2002), eine stabile Proteinexpression über zehn Passagen der Virusüberstände auf naive Zellen gezeigt werden. In dieser Arbeit wurde ebenfalls erwähnt, dass dieses auf PFV basierte Vektorsystem auch für die Induktion einer gezielten permanenten Immunantwort denkbar wäre. Bis heute fehlen jedoch auch für dieses Beispiel weiterführende Arbeiten, die das Potential solcher auf PFV/SFV basierten Δ Bet-Hybridviren zur Induktion einer gezielten breiten Immunantwort bestätigen konnten. Womöglich wurde der Einsatz solcher gentechnisch modifizierter Viren zur Induktion einer Immunantwort durch etwaige Einwände hinsichtlich der Sicherheit solcher Systeme nicht weiter konsequent vorangetrieben. Dabei gibt es heute Hinweise darauf, dass Bet-deletierte Foamyviren ebenfalls eine persistierende und apathogene Infektion im Wirt etablieren können. Der Fund einer persistent verlaufenden SFV-Infektion im Menschen, welche durch eine natürlich entstandene SFV_{agm}-Bet-Deltionsmutante etabliert werden konnte, lieferte einen Hinweis dafür, dass solche Systeme möglicherweise für den Einsatz im Menschen denkbar wären (Callahan *et al.*, 1999). Natürlich erfordert die Anwendung solcher Systeme im Menschen ein hohes Maß an Sicherheit und Stabilität. Die Ergebnisse der Vergangenheit haben gezeigt, dass die Anwendung von integrierenden Vektorsystemen im Menschen unvorhersehbare Risiken beinhalten können. Hinsichtlich dieser Sicherheitsbedenken könnte womöglich der Einsatz von foamyviralen Vektorsystemen dazu beitragen, die Risiken solcher Systeme zu reduzieren. Dies soll im folgenden Abschnitt näher erläutert werden.

1.4.1 Sicherheit von Foamyvirus basierten Impfstoffen

Ein wesentlicher Grund, warum bis heute die Weiterentwicklung von retroviralen Vektoren nicht konsequent vorangetrieben wurde, sind Sicherheitsbedenken hinsichtlich der irreversiblen genetischen Eingriffe bei der Anwendung solcher Vektorsysteme. Klinische Studien mit lentiviralen

oder γ -retroviralen Vektoren haben gezeigt, dass die durch Orthoretroviren induzierte Insertionsmutagenese und die damit in Verbindung stehende Aktivierung von Onkogenen auch bei der Verwendung stark attenuierter Vektorsysteme auftreten können (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2008; Knight *et al.*, 2013). Seit der Entdeckung der Foamyviren 1971 wurde intensiv nach einem Virus-assoziiertem Krankheitsbild geforscht. Dabei konnte in zwei Studien eine immunsuppressive Wirkung in der Anfangsphase einer PFV-Infektion bei Kaninchen und Mäusen gezeigt werden, welche jedoch im weiteren Versuchsverlauf vom Immunsystem kompensiert werden konnte (Hooks & Detrick-Hooks, 1979; Santillana-Hayat *et al.*, 1993). Auch konnte bei einer künstlich induzierten Überexpression von foamyviralen Proteinen in transgenen Mäusen eine Schädigung des Zentralnervensystems und der quergestreiften Muskulatur beobachtet werden (Aguzzi *et al.*, 1996). Jedoch scheint es eher unwahrscheinlich, dass bei einer natürlichen oder zoonotischen Infektion diese stark artifiziellen Expressionsmuster auftreten können. Denn bislang konnte in jedem bekannten Wirt lediglich eine äußerst basale Expression viraler Gene nachgewiesen werden (Falcone *et al.*, 1999a; 2003). Auch bei einer zoonotischen SFV-Infektion im menschlichen Wirt ist der Nachweis einer viralen Replikation nur schwer möglich (Heneine *et al.*, 1998). Dies spricht folglich für eine eingeschränkte basale Virusreplikation im Menschen.

Bis heute konnte nach über vier Jahrzehnten intensiver Forschung weder eine erhöhte Tumorzinzidenz noch eine für Orthoretroviren typische Induktion von irreversiblen Immundefekten in infizierten Primaten nachgewiesen werden. Deshalb besteht heute ein weitgehender Konsens darüber, dass Foamyviren weder in ihren natürlichen Wirten noch nach zoonotischer Übertragung auf den Menschen ein Krankheitsbild auslösen (Boneva *et al.*, 2007; Jones-Engel *et al.*, 2008; Khan, 2009). Das fehlende onkogene Potential von Foamyviren kann vermutlich durch die bevorzugten Integrationsorte der viralen IN begründet werden. Für lentivirale und γ -retrovirale Vektorsysteme konnte gezeigt werden, dass sie vorzugsweise in aktiv-transkribierte Genregionen inserieren, wodurch Proto-Onkogene unkontrolliert aktiviert werden können (Mitchell *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2003; Knight *et al.*, 2013). In Studien zu *murine leukemia virus* (MLV)-Vektor-induzierten Leukämien konnte die unkontrollierte Proliferation von Blutzellen mit der MLV-induzierten Aktivierung der Gene *LMO-2* und *MDS/Evi1* in Verbindung gebracht werden (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2008). Diesbezüglich erfolgte die Charakterisierung der Integrationsmuster von foamyviralen Vektoren, um sie mit den Integrationsorten der herkömmlichen Vektorsysteme vergleichen zu können. In humanen Zellen konnte gezeigt werden, dass sich die Integrationsorte von foamyviralen

Vektoren über das gesamte Genom verteilen dabei aber keine willkürlichen Integrationsmuster aufweisen. Im Vergleich zu HIV oder MLV konnte keine allgemeine Präferenz für die Integration in kodierende Sequenzen aktiver Gene gezeigt werden. Jedoch zeigen Foamyviren eine mit anderen Retroviren vergleichbare Integrationspräferenz vor CpG-Inseln und Transkriptionsstartpunkten. Auch konnte gezeigt werden, dass Foamyviren ebenfalls dazu neigen in der Nähe von Proto-Onkogenen zu integrieren. Jedoch konnte dabei eine niedrigere Integrationsrate in Bezug auf HIV oder MLV festgestellt werden (Nowrouzi *et al.*, 2006; Trobridge *et al.*, 2006). Diese Ergebnisse könnten auf ein mögliches kanzerogenes Potential von Foamyviren hindeuten. Gegen diese Beobachtungen *in vitro* spricht die ausbleibende Tumorgenese in zoonotisch oder natürlich infizierten Wirten. Erste Ergebnisse aus einem Langzeit-Tierversuch (4-7 Jahre) mit transplantierten, Foamy-Vektor-transduzierten, hämatopoetischen Stammzellen zeigen ebenfalls keine Hinweise auf eine vektorinduzierte lymphatische oder myeloische Leukämie im Hundemodell. Die in diesem Versuch durchgeführte genetische Analyse der transduzierten Hundebloodzellen sprechen ebenfalls gegen eine Foamy-Vektor bedingte Insertionsonkogenese (Bauer *et al.*, 2013). Eine weitere erst kürzlich veröffentlichte Studie mit humanen, Foamy-Vektor transformierten, pluripotenten Stammzellen (iPSC) konnte erneut eine Foamyvirus-vermittelte Aktivierung von Onkogenen nicht bestätigen (Deyle *et al.*, 2013). Diese Resultate deuten darauf hin, dass durch die Weiterentwicklung von foamyviralen Transduktions-Systemen eine Minimierung des Sicherheitsrisikos erzielt werden könnte. Hinsichtlich der guten Ergebnisse, welche durch die Verwendung von replikationskompetenten Anti-HIV-Impfstoffen erzielt werden konnten, scheint es sinnvoll, die Weiterentwicklung von replikationskompetenten Vektoren voranzutreiben. Aus diesem Grund beschäftigt sich die hier vorliegende Dissertation mit der Entwicklung und tierexperimentellen Erprobung von replikationskompetenten, foamyviralen Vektorsystemen zur Induktion einer effektiven und permanenten Immunantwort gegen definierte Antigene. Dabei soll zunächst die Funktionalität und Effektivität der Vakzinierungsmethode im Vordergrund stehen. Experimentelle Arbeiten zur Abschätzung und Reduktion der möglichen Risiken, welche durch die Anwendung dieses neuartigen Vakzinierungs-Konzepts auftreten könnten, soll dabei nachfolgenden Arbeiten vorbehalten bleiben.

1.5 Zielsetzung der Dissertation

In einer Vielzahl von klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass keiner der bisher im Menschen getesteten HIV-Impfstoffe die gewünschte schützende Immunität induzieren konnte. Aus diesem Grund konzentrierten sich die Bemühungen der letzten Jahre auf die Entwicklung neuer Lösungsansätze, um die Effektivität der HIV-Vakzinierung zu verbessern. Dabei konnten durch die Anwendung von replikationskompetenten CMV-basierten Vektorsystemen vielversprechende Ergebnisse erzielt werden. Auch im Feld der Anti-Tumorimpfstoffentwicklung werden derzeit große Hoffnungen auf die Entwicklung neuer effektiverer Impfstoffe gesetzt, um vor allem austherapierten Krebspatienten neue Behandlungsmethoden anbieten zu können.

Aus diesen Gründen ist das Ziel dieser Dissertation die Entwicklung und Erprobung einer neuen effektiveren Vakzinierungsmethode auf der Basis von replizierenden foamyviralen Vektoren. Foamyviren wurden gewählt, da sie nach derzeitigem Kenntnisstand die Vorteile verschiedenster Systeme in sich vereinen, wie z. B. keine Präimmunität in der Bevölkerung, fehlende Pathogenität, keine Mensch-zu-Mensch-Übertragung, geringes onkogenes Potenzial und lebenslange Replikation mit Präsentation des Zielantigens im potentiellen Impfling. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob durch gezielte genetische Modifikationen des viralen Genoms von PFV die Konstruktion eines stabil replizierenden, Antigen-präsentierenden Impfvektor-Expressions-Systems möglich ist. Dabei sollten zunächst die Expressions- und Präsentationseigenschaften von modellhaften HIV- und Prostata-spezifischen Antigenen untersucht werden. Im Anschluss soll das entwickelte Impfvektor-System auf seine Eigenschaften als Immunstimulator im Langzeit-Tierversuch getestet werden. Hierbei soll zunächst die Untersuchung der Effektivität der Vakzinierungsmethode hinsichtlich der Induktion einer humoralen und zellulären Immunantwort im Vordergrund stehen.

2. Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien/Material

Alle nachfolgend nicht mit aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen, BRD) bezogen.

Chemikalie/Material	Hersteller, Ort, Land
Agarose, gold standard	peQLab GmbH, Erlangen, BRD
Acrylamid/Bis Solution 29:1 (30%)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Ammoniumpersulfat (w/v) 10% (APS)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
BioMax MR Film	Kodak GmbH, Stuttgart, BRD
dNTPs Mix (10mM)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
ECL™ Western Blotting Detection Reagents	GE HealthcareUK Ltd., Little Charlfont, UK
GelRed™ 10.000 x	Biotium, Hayward, USA
gentleMACS™ C-Tubes	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, BRD
Nuklease-freies Wasser	Promega, Madison, USA
Multi Screen HTS® Filter Plates 0,45µm	Merck Millipore, Massachusetts, USA
SDS Solution (w/v) 10%	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl- enthylenediamine)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
96-Well ELISA-Platte Maxisorb™	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

2.1.2 Geräte

Gerät	Hersteller, Ort, Land
Avanti Zentrifuge J-20 XP, Rotor JA 25.50	Beckman Coulter, Krefeld, BRD
Brutschrank (Bakterien)	Heraeus, Hanau, BRD
Brutschrank (Zellkultur)	Sanyo Electric Biomedical Co., Osaka, J
ELISPOT-Reader	AID Diagnostika GmbH, Straßberg, BRD
Entwicklermaschine Curix 60	Kodak GmbH, Stuttgart, BRD
GelDoc 2000	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Gene Pulser® II	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
gentalMACS™ Dissociator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, BRD
Heraeus Megafuge 1.0 R	Kendro Laboratory Products GmbH,

Helios™ Gene Gun	Langensfeld, BRD
Microchef FM B930 1100W	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Fluoreszenz Mikroskop ECLIPSE TS 100	Moulinex, München, BRD
Mini-Protean II Electrophoresis Cell	Nikon Corporation, Tokyo, J
MJ Research PTC-200 gradient cycler	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Mx3500® Multiplex Quantitative PCR System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000	Stratagene, La Jolla, USA
Sterilbank Steril Gard Class2	peQLab GmbH, Erlangen, BRD
Thermomixer 5436	The Baker Company, Sanford, USA
Tischzentrifuge Centrifuge 5415D	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, BRD
Trans-Blot SD®, Semi-Dry Transfer Cell	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, BRD
Tubing Prep Station	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

2.1.1 Puffer, Lösungen und Medien

Puffer, Lösungen	Zusammensetzung
PBS	137 mM NaCl; 8,8 mM Na ₂ PO ₄ ; 2,7 mM KCl; 0,7 mM KH ₂ PO ₄ ; ddH ₂ O pH 7,2
HEPES-Puffer	1 mM HEPES
Agarose-Gelelektrophorese:	
DNA-Ladepuffer (10x)	50% (v/v) Glycerin; 200 mM EDTA; 1 Spatelspitze Orange G; ddH ₂ O
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Fermentas Inc., Burlington, CA
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	Fermentas Inc., Burlington, CA
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris; 50 mM EDTA; 1 M Acetat; ddH ₂ O; pH 8,0
SDS-PAGE:	
Laufpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 1 g/l Natriumlauryl-sulfat; ddH ₂ O; pH 8,3
Lämmli-puffer Probenpuffer (2x)	20 g/l Natriumlaurylsulfat; 710 mM β-Mercapto-ethanol; 250 ml/l Glycerol; 125 ml/l Sammelgelpuffer pH 6,8; 0,01% (w/v) Bromphenolblau
PageRuler Plus Prestained Proteine Ladder	Fermentas Inc., Burlington, CDN
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl; pH 6,8 (Bio-Rad)
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl; pH 8,8 (Bio-Rad)

Western Blot:

Transferpuffer	48 mM Tris; 39 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol; 3,75 g/l SDS; ddH ₂ O
Blockierungspuffer	2% (w/v) Magermilchpulver; 10% (w/v) FKS in PBS-Lösung
Waschpuffer	0,1% (v/v) Tween 20 in PBS-Lösung

ELISA:

o-Phenylenediamine	P1063 100TAB (Sigma-Aldrich) in ddH ₂ O + H ₂ O ₂
Phosphate-Citrat Puffer	P4809 100TAB (Sigma-Aldrich) in ddH ₂ O
PBS pH 6,0	siehe oben; pH 6,0
Waschpuffer	0,1% (v/v) Tween 20 in PBS-Lösung

Zellysepuffer:

Proteinase K Lysepuffer	10% (v/v) 10 x PCR-Puffer; 1% (v/v) Proteinase K; ddH ₂ O
RIPA-Puffer	150 mM NaCl; 5mM EDTA; 10 mM Tris; 0,1% SDS; 0,1% Natrium-Deoxycholat; 1% Triton X; 4% Complete mini Protease Inhibitor Mix (Roche Diagnostics GmbH)

Nährmedien/Selektionsmittel	Hersteller / Zusammensetzung
Cryo solution (serum-free), Cryo-SFM	Provitro, Berlin, BRD
DMEM High Glucose (4,5 g/l)	PAA Laboratories; Pasching; AT
E-MEM High Glucose (4,5 g/l)	PAA Laboratories; Pasching; AT
RPMI High Glucose (4,5 g/l)	PAA Laboratories; Pasching; AT
Fötales Kälberserum	PAA Laboratories, Pasching, AT
Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)	10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 1 g/l NaCl; ddH ₂ O <i>ad</i> 1l; NaOH <i>ad</i> pH 7,5
2x Yeast/Trypton-Medium (2YT-Medium)	16 g/l Trypton; 10 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; ddH ₂ O <i>ad</i> 1l; NaOH <i>ad</i> pH 7
SOC-Medium	20 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 4 g/l Glucose; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 5 mM MgCl ₂ ; ddH ₂ O <i>add</i> 1l
Ampicillin	Biochrom AG, Berlin, BRD
Penicillin / Streptomycin (10000U / 10000 µg/µl)	Biochrom AG, Berlin, BRD

Allen Zellkultur-Medien wurden 10% (v/v) FKS und 1% Penicillin / Streptomycin Lösung (100 mM) zugesetzt. Zur Selektion von Transformanten wurde dem Medium Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml zugegeben. Für die Zellkultivierung auf Festmedium-Platten, wurde dem Flüssigmedium 15 g/l Agar-Agar zugesetzt.

2.1.2 Kits

Kitbezeichnung	Hersteller, Ort, Land
BigDye® Direct Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, BRD
BCA Protein Assay Reagent	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Endo-free Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden, BRD
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
GeneJET PCR Purification Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
AP Conjugate Substrate Kit	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

2.1.3 Zellen

2.1.3.1 Bakterienstämme

Stamm	Hersteller, Ort, Land
Clean Genome® <i>E. coli</i> MDS 42	Scarab Genomics, Madison, USA
<i>E. coli</i> Top10	Invitrogen, Karlsruhe, BRD
<i>E. coli</i> DH5α	Invitrogen, Karlsruhe, BRD

2.1.3.2 *Mammalia* Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Spezies	ATCC Nr.
BHK-21	Nieren Fibroblasten	Hamster	CCL-10
MRC-5	Lungen Fibroblasten	Human	CCL-171

2.1.4 Viren

Virusstamm	Herkunft	NCBI Nr.
Humanes Spumaretrovirus (SFVcpz(hu)/PFV/HFV)	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Löchelt	HSU21247

2.1.5 Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller, Ort, Land
Polyklonales IgG aus Ziege <anti-Maus-IgG> konjugiert mit HRP	1:2000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
Polyklonales IgG aus Ziege <anti-Hamster-IgG> konjugiert mit HRP	1:10.000	Acris Antibodies GmbH, Herford, BRD
Monoklonales IgG (mAb 2F5) aus dem Menschen <anti-HIV-1-gp41>	1:10.000	Imgenex Corporation, San Diego, USA*
mAb AN18 <anti-Maus-IFN γ >	1:500	MABTECH AB, Nacka, SE
mAb R4-6A2-Biotin <anti-Maus-IFN γ >	1:1000	MABTECH AB, Nacka, SE
Streptavidin konjugiert mit ALP	1:1000	MABTECH AB, Nacka, SE

* Das angegebene Reagenz wurde vom NIH AIDS Research and Reference Reagent Programm, Division of AIDS, NIAID, NIH: HIV-1 gp41 monoklonaler Antikörper (2F5) von Herrn Dr. Hermann Katinger bereitgestellt.

2.1.6 Enzyme

Enzymname	Enzymklasse	Hersteller, Ort, Land
AmpilTaq Gold™ (5 U/ μ l)	DNA-Polymerase	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
<i>Pfu</i> Ultra (2.5 U/ μ l)	DNA-Polymerase	Agilent Technologies, La Jolla, CA
FastAP™ (1 U/ μ l)	Alkaline Phosphatase	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Proteinase K (20 mg/ml)	Protease	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, BRD
T4-DNA-Ligase (5 U/ μ l)	DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Trypsin-Lsg.	Protease	PAA Laboratories, Pasching, AT

Alle in dieser Arbeit verwendetet Restriktions-Enzyme wurden von Thermo Fisher Scientific bezogen und laut Herstellerangaben verwendet.

2.1.7 Primer und Sonden

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe, BRD synthetisiert und entsalzt. Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide, Primer und Sonden wurden in Tabelle 1 und im Anhang ab S. XV aufgelistet. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in ddH₂O gelöst und in einer Arbeitskonzentration von 100 μ M verwendet.

2.1.8 Vektoren

2.1.8.1 Kommerzielle Vektoren

Vektor	Vektorart	Herkunft
pHSRV2/13	Virales Genom	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn M. Löchelt (Löchelt et al., 1991)
pTH-PSCA	Expressionsvektor	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn O. Hohn
pTH.H	Expressionsvektor	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn T. Hanke (Hanke et al. 1998a)
Zero Blunt® TOPO®	Klonierungsvektor	Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit for Sequencing von Invitrogen GmbH, Karlsruhe, BRD
TOPO-TA Cloning®	Klonierungsvektor	TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing von Invitrogen GmbH, Karlsruhe, BRD
pDisplay™	Klonierungsvektor	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, BRD

2.1.8.2 Erstellte Vektoren

In dieser Dissertation wurden eine Reihe von Vektoren erstellt, welche nachfolgend tabellarisch aufgelistet wurden.

Vektor	Vektor-backbone	Größe in bp	MCS	Fremdgen
pPFV _{mcs}	pAT153	15.404	MCS-1	leer
pPFV _{del}	pAT153	14.284	-	-
pPFV _{basic}	pAT153	15.238	MCS-1	leer
pPFV _{Δbet}	pAT153	14.796	MCS-1	leer
pPFcV-T0	pAT153	14.830	MCS-2	leer
pPFcV-T0 _{del}	pAT153	13.634	-	-
pPFcV-T1	pAT153	14.827	MCS-2	leer
pPFcV-T0a	pAT153	14.896	MCS-2A	leer
pPFcV-T1a	pAT153	14.893	MCS-2A	leer
pPFcV-T2a	pAT153	14.889	MCS-2A	leer
pPFhV-T0a<GFP>	pAT153	15.628	-	2F5-GFP
pPFhV-T1a<GFP>	pAT153	15.625	-	2F5-GFP

pPFhV-T2a<GFP>	pAT153	15.621	-	2F5-GFP
pPFhV-T0<PSCA>	pAT153	15.214	-	2F5-hPSCA
pPFhV-T0<CTL>	pAT153	15.278	-	2F5-HIV-CTL
pPFhV-T0<CTL>del	pAT153	14.055	-	2F5-HIV-CTL
pPFhV-T1<PSCA>	pAT153	15.211	-	2F5-hPSCA
pPFhV-T1<CTL>	pAT153	15.276	-	2F5-HIV-CTL
pPFhV-T0a<CTL>	pAT153	15.341	-	2F5-HIV-CTL
pPFhV-T1a<CTL>	pAT153	15.339	-	2F5-HIV-CTL

2.1.9 Versuchstiere

Art

Syrischer Goldhamster (*Mesocricetus auratus*)

Maus (C57BL/6) (*Mus musculus*)

Die verwendeten Versuchstiere wurden von Charles River Laboratories Deutschland bezogen. Alle Tiere wurden für die Zeit des Versuchs im hauseigenen Tierstall des Robert Koch-Instituts gehalten und versorgt.

2.1.10 Software

Die Bearbeitungen von DNA- oder Proteinsequenzen, sowie die Illustration der Vektorkarten erfolgte mit dem Programm DNASTAR Lesergene 10 SeqBuilder. Die Auswertung der Sequenzierungs-Chromatogramme sowie der Sequenzvergleich erfolgte mit dem Programm DNASTAR Lesergene 10 SeqMan Pro. Die Graphen wurden mit SigmaPlot 11.0 oder Microsoft Office Excel 2010 erstellt. Die Texte und Tabellen wurden mit Microsoft Office Word 2010 erstellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion ist eine molekularbiologische Methode zum Nachweis oder zur Vermehrung von definierten DNA-Fragmenten. Die *in vitro* Amplifikation von DNA-Fragmenten aus Genomischer- oder Plasmid-DNA erfolgte mittels rekombinant hergestellten, thermostabilen DNA-Polymerasen des Typ II und speziell synthetisierten Oligonukleotiden (Primer). Die Reaktion erfolgte unter einem definierten, zyklischen Thermoprofil in einem Thermo-Cycler (Saiki *et al.*, 1985; Mullis & Faloona, 1987). Nachfolgend ist exemplarisch ein häufig verwendeter Reaktionsansatz sowie das dazu gehörige Thermo-Cycler-Programm aufgelistet.

Reaktionsansatz:		Thermo-Cycler-Programm:			
Probe	2,0 µl	Denaturierung	95°C	3-10 min.	
10x PCR-Puffer	3,0 µl				
dNTPs (10 mM)	0,6 µl	Denaturierung	95°C	30 sec.	x30- 35 Zyklen
forward-Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl	Anhealing	57°C	30 sec.	
reverse-Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl	Elongation	72°C	20-120 sec.	
Polymerase (5U/µl)	0,3 µl			(1min./1kb)	
ddH ₂ O	23,1µl	Elongation	72°C	5 min.	
	<u>Σ 30 µl</u>				

In dieser Arbeit wurde das virale Genom von PFV durch das Einfügen von definierten DNA-Fragmenten mutiert. Diese DNA-Fragmente wurden mittels der oben aufgeführten Standard-PCR synthetisiert. Die jeweiligen Primer wurden im Ergebnisteil erwähnt. Bei einer Amplifikatlänge von unter 1000 Basen wurde die „AmpliTaQGold® DNA-Polymerase“ verwendet. Bei einer Amplifikatlänge von über 1000 Basen wurde, aufgrund der geringeren Fehlerrate (siehe Herstellerangaben), die „PfuUltra DNA-Polymerase“ (Agilent Technologies) verwendet. Nach Abschluss des PCR-Programms, wurden die Fragmente mittels Gelelektrophorese (siehe Punkt 2.2.1.4) auf die korrekte Fragmentgröße geprüft. Im Anschluss wurde das PCR-Produkt entweder mit dem „GeneJET PCR Purification DNA-Insolations Kit“ oder dem „GeneJET Gel Extraction Kit“ extrahiert und aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte laut Herstellerangaben. Neben der Synthese von

definierten DNA-Fragmenten für die Insertationsmutagenese wurde die PCR zur Sequenzanalyse von ausgewählten DNA-Abschnitten und zum spezifischen DNA-Nachweis angewendet.

Fusion-PCR:

Die klassische Fusions-PCR beschreibt eine *in vitro* Methode zur Synthese von DNA-Sequenzen. Dabei werden partiell überlappende Oligonukleoidprimer ohne den Einsatz eines *template* durch die Polymerase fusioniert, um dann in einer nachfolgenden PCR als *template* zu fungieren. In dieser Arbeit wurden im Zuge des Austauschs der PFV-5'LTR durch einen CMV-Promotor zwei DNA-Fragmente fusioniert. Dazu wurden zwei PCR-Produkte generiert, welche die genetische Information des CMV-Promotors sowie Teile der PFV-5'LTR und der nachfolgenden *gag*-Sequenz beinhalteten. Dabei enthielten die beiden PCR-Produkte zueinander komplementäre 3' bzw. 5' DNA-Enden, welche den CMP-Promotor mit der U5-Region der PFV-LTR verbindet. Beide Amplifikate wurden mittels des „GeneJET PCR Purification DNA-Insolations Kits“ isoliert und in einem PCR-Reaktionsansatz vereinigt. Es folgte eine initiale Denaturierung (95°C, 3 min.), *anealing* (57°C, 1 min.) und Elongationsphase (72°C, 5 min.), in der die PCR-Produkte fusioniert wurden. Anschließend folgte eine Standard-PCR-Reaktion (siehe Seite 32). Die verwendeten Primer-Paare Nr. 13/14 & 15/16 sind im Anhang (S. XV) aufgelistet. Die genetische Grundlage für die Fusion eines CMV-Promotors mit der U5-LTR Region eines Retrovirus, wurde der Publikation Soneoka et al. (1995) entnommen.

Kolonie-PCR:

Die Kolonie-PCR ist eine schnelle und einfache Methode zum Nachweis von Plasmid-positiven Bakterien-Klonen nach der Transformation. Dafür wurden von einer Selektionsnährboden-Agarplatte einzelne Kolonien ausgewählt und in ein flüssiges Selektionsmedium überführt. Nach 16h Inkubation bei 37°C wurden alle Klone mittels PCR auf das enthaltende Plasmid getestet. Dabei wurde als Probe ein minimales Volumen (ca. 0,3 µl) der Suspensionskultur zugegeben. Nach einer 10 minütigen initialen Denaturierungsphase zum Zellaufschluss folgte ein Standard-PCR-Programm mit 35 Zyklen (siehe Seite 32). Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels Gelelektrophorese.

2.2.1.2 Quantitative real-time PCR zum Nachweis von viraler DNA

Als real-time PCR (qPCR) beschreibt man eine PCR-basierte Methode zur Quantifizierung von spezifischen DNA-Fragmenten in einer Probe unter Verwendung eines DNA-konzentrations-abhängigen Signalgebers. In dieser Arbeit wurde das System der spezifischen „TaqMan-Sonde“

angewandt. Als Messwert der qPCR wird der „*Threshold Cycle*“ oder C_T -Wert angegeben. Der C_T -Wert beschreibt denjenigen PCR-Zyklus, an dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz überschreitet. Quantifiziert wurde PFV-DNA in verschiedenen Proben. Die Nachweis-PCR wurden durch vorangegangene Arbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe etabliert (Müllers *et al.*, 2011). Die foamyvirale Sonde bindet in einem hoch konservierten Bereich der CASII des *pol*-Gens der Foamyviren. Die Sonde wurde mit einem 5'-6-FAM-phosphoramidit Reporterfarbstoff und einem „3'-BlackHole™ *Quencher* II“ synthetisiert. In Abb. 4 ist ein Sequenzvergleich vieler bekannter SFV Subtypen sowie der ferner verwandten Subtypen BFV, EFV und FFV in dem relevanten Bereich dargestellt. Die Hybridisierungsstelle der generischen Foamyvirus-Sonde ist ebenfalls markiert. Für den spezifischen Nachweis der PFV-Subtypen wurden speziell an diesen Bereich angepasste Primer synthetisiert. Die Sequenz der Sonde (Nr. 1) sowie der subtypspezifischen Primer (PFV: Nr. 2 & 3) sind in Tabelle 1 aufgeführt.

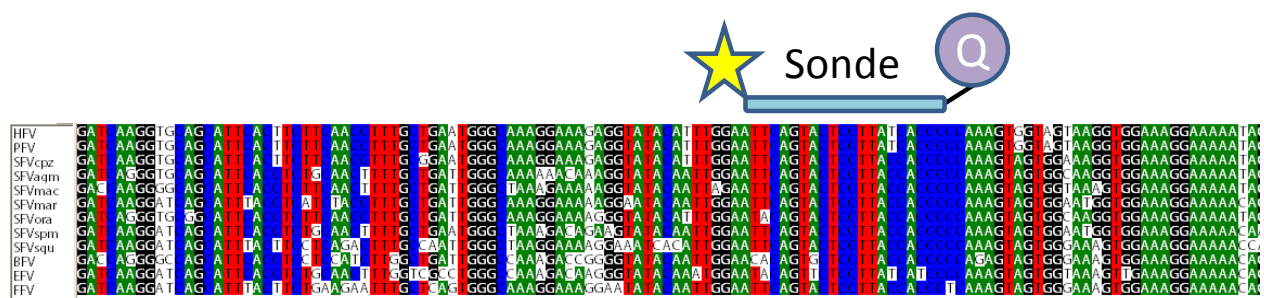


Abb. 4: Sequenzvergleich des *pol* Gens von verschiedenen Foamyvirus-Subtypen und Lage der generischen Sonde

In dem Sequenz-Alignment wurden die Sequenzen von HFV, PFV, SFVcpz, SFVvqm, SFVmac, SFVmar, SFVvora, SFVspm, SFVsqu, BFV, EFV und FFV im hoch konservierten Bereich der CASII-Region des *pol*-Gens verglichen. Die farbigen Markierungen kennzeichnen die Sequenzhomologien. Über den Sequenzen wurde die Lage der generischen Foamyvirus-Sonde markiert.

Die Messung erfolgte im Thermocycler „Mx3000P® Multiplex Quantitative PCR-System“ der Firma Stratagene. Die Messdaten wurden durch die dazugehörige Software des Herstellers erfasst. Die Proben wurden in Duplikaten gemessen. Ausgewertet wurden die Daten mit der Software des Herstellers und mit dem Programm „Microsoft Excel 2010“. Für die relative Quantifizierung der viralen DNA-Menge wurde die $\Delta\Delta C_T$ -Methode angewandt, welche unter Punkt 2.2.1.2 erläutert wurde. Nachfolgend sind der Reaktionsansatz und die Reaktionsbedingungen aufgeführt:

Reaktionsansatz:		Thermo-Cycler-Programm:			
Probe	2,0 μ l	Denaturierung	95°C	10 min.	x50 Zyklen
10x PCR-Puffer	2,5 μ l				
dNTPs (10 mM)	0,6 μ l	Denaturierung	95°C	30 sec.	
forward-Primer (10 pmol/ μ l)	0,5 μ l	Anhealing	57°C	30 sec.	
reverse-Primer (10 pmol/ μ l)	0,5 μ l	Elongation	72°C	20 sec.	
FV-Sonde (10 pmol/ μ l)	0,5 μ l				
ROX (0.0625 μ M)	1,0 μ l				
Polymerase (5U/ μ l)	0,2 μ l				
ddH ₂ O	17,2 μ l				
	Σ 25 μ l				

Die relative Quantifizierung mittels der $\Delta\Delta C_T$ -Methode erforderte die Bestimmung eines Referenz-Messwertes zur Normalisierung der eingesetzten DNA-Menge. Dazu wurde das *housekeeping*-Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) gewählt. Da alle virologischen Nachweise in der Zelllinie BHK-21 durchgeführt wurden, erfolgte die Etablierung eines qPCR-Nachweissystems für die Hamster-GAPDH. Die Sequenzen der „GAPDH-TaqMan-Sonde“ (Nr. 6) und der GAPDH-Primer (Nr. 7 & 8) sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Sonde wurde mit dem 5'-6-HEX-phosphoramidit Reporterfarbstoff und einem „3'-BlackHole™ Quencher II“ synthetisiert. Die Reaktionsbedingungen entsprachen ebenfalls den zuvor aufgeführten Werten.

Nested-PCR zum sensitiven Nachweis von viraler DNA in Organproben:

Die *nested*-PCR beschreibt eine Erweiterung der klassischen PCR, bei der durch eine „Verschachtelung“ zweier PCRs die Sensitivität der Nachweismethode erheblich gesteigert wird. In der hier vorliegenden Arbeit sollte die Anwesenheit von viraler DNA in ausgewählten Organproben von PFV-infizierten Hamstern und Mäusen untersucht werden. Aus diesem Grund wurde ein PFV-DNA-*nested*-PCR-Nachweissystem entwickelt, um die PFV-Infektion *in vivo* genauer charakterisieren zu können. Dabei wurde die *nested*-PCR mit dem bereits etablierten qPCR-PFV-System kombiniert. Die *nested*-PCR-Primer wurden an den umliegenden Sequenzbereich des PFV-qPCR-Systems angepasst, wodurch das PCR-Amplifikat der PFV-qPCR von dem PFV-*nested*-Primerpaar umschlossen wurde. Die Sequenzen des PFV-*nested*-Primerpaars (Nr. 4 & 5) sind in Tabelle 1 aufgelistet. Um falschpositive Ergebnisse durch DNA-Kontaminationen zu vermeiden, wurden die Aufarbeitung der Organproben und die eigentliche PCR-Analyse unter diagnostischen Bedingungen durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde genomische DNA von BHK-

21-Zellen mit einer sehr geringen Konzentration des Plasmids pHSRV2/13 versetzt. Von jeder Probe wurde 1 µg genomische DNA dem *nested*-PCR-Ansatz zugegeben. Nachfolgend sind der Reaktionsansatz und die Reaktionsbedingungen für den 1. *nested*-PCR Schritt aufgeführt:

Reaktionsansatz:		Thermo-Cycler-Programm:			
Probe (gen. DNA)	1 µg	Denaturierung	94°C	10 min.	
10x PCR-Puffer	5 µl				
dNTPs (10 mM)	1 µl	Denaturierung	94°C	30 sec.	x25 Zyklen
forward-Primer (10 pmol/µl)	1 µl	Anhealing	67°C	30 sec.	
reverse-Primer (10 pmol/µl)	1 µl	Elongation	72°C	40 sec.	
Polymerase (5U/µl)	0,3 µl				
ddH ₂ O	ad50 µl				
	Σ 50 µl				

Nach Abschluss des PCR-Programms wurden 5 µl des ersten Reaktionsansatzes in den auf Seite 35 genannten qPCR-Ansatz überführt. Es folgte der zweite *nested*-PCR-Schritt mit dem PFV-qPCR Nachweissystem im Thermocycler „Mx3000P®“. Die Reaktionsbedingungen entsprachen den auf Seite 35 aufgeführten Werten. Mit diesem PFV-Nachweisverfahren sollte lediglich eine ja/nein-Aussage generiert werden. Deshalb wurde auf die Quantifizierung der enthaltenen PFV-DNA-Mengen verzichtet. Die DNA-Aufarbeitung aus den entnommenen Organproben wurde unter Punkt 2.2.1.5 erläutert.

Tabelle 1: Primertabelle für die qPCR zum Nachweis von viraler DNA von PFV

Nr.	Bezeichnung	qPCR-Primer / Sonden-Sequenz 5' ▶ 3'
1	FV - Sonde	[6FAM] TTGGAATTCAGTACTCCTTATCACCC [BHQ1]
2	PFV-F1 For	CTTCAACCTTTGCTGAATG
3	PFV-R3 Rev	TAATACAGGGCTATAGGTGT
4	1Nes-F17 For	GGTTATACCCCACTAAGGCTCCTTCTACTAGCGC
5	1Nes-R18 Rev	GGAACGAGAGGAGGCTGGAGGGGTGGATGG
6	GAPDH - Sonde	[6HEX] ACTGGCATGGCCTTCCGTGTTCCCTA [BHQ1]
7	GAPDH For	GTCATCCAGAGCTGAACG
8	GAPDH Rev	AAGTTGTCATTGAGAGCAATGC

2.2.1.3 Relative Quantifizierung der DNA-Menge mittels der $\Delta\Delta C_T$ -Methode nach Pfaffl [2001]

Bei dieser Methode misst man das Verhältnis des zu bestimmenden DNA-Fragments zu der konstanten Menge eines Referenz-Gens (*housekeeping*-Gen) in unterschiedlichen Proben. Der gemessene C_T -Wert des zu bestimmenden DNA-Fragments wurde dann gegen den C_T -Wert des Referenz-Gens abgeglichen (ΔC_T -Wert) und so eine relative Quantifizierung zueinander ermöglicht. Für die Quantifizierung mittels der $\Delta\Delta C_T$ -Methode müssten beide PCR-Reaktionen mit der gleichen Effizienz ablaufen, was im Vorfeld sichergestellt wurde. Dabei wurde eine Verdopplung der *template* Menge/ C_T angenommen. Die Formel für die Berechnung des ΔC_T -Wertes ist nachfolgend aufgeführt:

Bestimmung des normalisierten ΔC_T -Wertes für die Kalibrator-Probe $t = 0$

Formel 1:

$$\Delta C_{T,q} = C_{T,Xq} - C_{T,cq}$$

$\Delta C_{T,q}$ = normalisierter C_T für die Kalibrator-Probe $t = 0$
 $C_{T,Xq}$ = C_T des Zielfragments in der Probe
 $C_{T,Rq}$ = C_T der Referenz in der Probe

Um die relative Zunahme der Menge einer Ziel-DNA im zeitlichen Verlauf ermitteln zu können, wurde der C_T -Wert zum Zeitpunkt „Null“ bestimmt. In den darauffolgenden Proben wurde der C_T -Wert zum Zeitpunkt „X“ ermittelt und die Veränderung auf den Anfangswert bezogen. Die verwendeten Formeln zur Berechnung der Ratio der DNA-Zunahme sind nachfolgend aufgeführt.

Berechnung des normalisierten ΔC_T -Wertes für eine Probe $t = x$

Formel 2:

$$\Delta C_{T,cb} = C_{T,Xcb} - C_{T,ccb}$$

$\Delta C_{T,cb}$ = normalisierter C_T für die Probe $t = x$
 $C_{T,Xcb}$ = C_T des Zielfragments in der Probe
 $C_{T,Rcb}$ = C_T der Referenz in der Probe

Berechnung der Ratio der DNA-Zunahme in einer Probe $t = x$, in Bezug auf $\Delta C_T t = 0$

Formel 3:

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

mit $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb}$

Der Ratio-Wert ist ein Faktor, der das relative Verhältnis zur Kalibrator-Probe angibt. Beim Zeitpunkt „Null“ ist dieser Wert „Eins“. „Eins“ entspricht der Ausgangsmenge an DNA, die sich am

Anfang des Experiments in der Probe befindet. Im Laufe des Experiments veränderte sich dieser Wert in Bezug auf den Ausgangswert. Der Ratio-Wert gibt also an, um welchen Faktor sich die DNA-Menge in Bezug zum Ausgangswert „Eins“ verändert. Die Bestimmung der relativen Zunahme der DNA-Menge im zeitlichen Verlauf wurde in den Experimenten zur Bestimmung der Virusreplikation unter Abschnitt 2.2.4.2 angewandt.

2.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Trennung von DNA-Fragmenten anhand der Größe. Dabei bewegen sich die DNA-Fragmente im angelegten elektrischen Feld zur Anode, bedingt durch ihre natürliche negative Ladung. Die Gelelektrophoresen wurden mit 1%igen Agarosegelen gelöst in 1 x TAE-Puffer durchgeführt. Alle Proben wurden mit einem glycerin-haltigen Ladepuffer versetzt. Die angelegte Spannung variierte zwischen 70 und 100 V. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde durch das Mitführen eines DNA-Markers (Gene Ruler™ 1 kb; 100 bp) der Firma Fermentas ermöglicht. Als DNA-markierender Fluoreszenzfarbstoff wurde „GelRed™“ der Firma Biotium verwendet, welches zuvor der flüssigen Agaroselösung (Verdünnung 1:10.000) beigemischt wurde. Dieser Farbstoff trägt keine Ladung und verbleibt somit im Gel, wodurch ein nachträgliches Anfärben vermieden werden konnte. Sichtbar gemacht wurden die DNA-Banden unter einem herkömmlichen Transilluminator bei einer Anregungswellenlänge von 312 nm.

2.2.1.5 Isolation von genomischer DNA aus Organproben mittels Phenol/Chloroform-Extraktion

Im Rahmen dieser Dissertation wurden *in vivo* Infektionsexperimente mit PFV mit Hamstern und Mäusen durchgeführt. Nach Beendigung der Tierversuche erfolgte eine Obduktion der Versuchstiere, bei der ausgewählte Organe entnommen wurden. In diesen Organen sollte virale DNA mittels PCR nachgewiesen werden. Dazu erfolgte die Extraktion der genomischen DNA aus dem Gewebe. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mittels Frier/Tau-Zellyse und Proteinase K- Verdau. Die Aufreinigung und Isolation der genomischen DNA erfolgte mittels Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion und Ethanolpräzipitation unter Standardbedingungen (Sambrook *et al.*, 1989). Das Pellet wurde getrocknet und in 50 µl nukleasefreiem ddH₂O gelöst und bei 4°C gelagert. Die Bestimmung der Menge und der Reinheit erfolgte photometrisch bei 260 nm und 280 nm. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung von viraler DNA mittels *nested*-PCR und qPCR.

2.2.1.6 Klonierungs-Methoden

Um gezielte genetische Modifikationen an dem viralen Genom pHSRV2 (PFV) vorzunehmen, wurden künstlich generierte PCR-Fragmente über passende Restriktionsschnittstellen inkloniert. Dazu wurden den PCR-Amplifikaten entsprechende Restriktionsschnittstellen mittels überhängender 5'-Primerenden angefügt. Nach Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte der Restriktionsverdau der DNA-Fragmente und des Vektors. Die für den Verdau verwendeten Restriktionsenzyme (RE) wurden im Ergebnisteil erwähnt. Der Verdau richtete sich nach den Bedingungen der jeweiligen Enzyme. Im Falle von gleichwertigen Reaktionsbedingungen (Puffer, Temperatur) zweier Enzyme wurde ein Doppelverdau vorgenommen. Der Doppelverdau von *KpnI* und *AgeI* wurde beispielsweise in einem Reaktionsvolumen von 30 µl durchgeführt, unter Zugabe von max. 20 µl PCR-Produkt, 3 µl NEB Puffer 1, je 1 µl RE und ad30 µl ddH₂O. Der Vektor wurde gleichermaßen unter Zugabe von 3 µg DNA und 1,5 µl je RE verdaut. Die Reaktion dauerte 2 h bei 37°C. Im Falle von ungleichmäßigen Reaktionsbedingungen wurde entweder ein partieller Verdau vorgenommen oder es wurden die Reaktionsbedingungen kombiniert. Dies erfolgte beispielsweise durch Mischen der Puffersysteme oder partiellem Temperaturprofil. Nach dem enzymatischen Verdau folgte die enzymatische Dephosphorylierung der 5'-Enden des geschnittenen Vektor *backbones*, um Vektor Re-Ligationsereignisse zu minimieren. Zu diesem Zweck erfolgte die Zugabe von 1 µl einer alkalischen Phosphatase (FastAP; Fermentas) zu dem Reaktionsansatz des Vektorverdaus. Das gewählte Enzym ist laut Hersteller in vielen Puffersystemen enzymatisch aktiv, wodurch auf ein Umpuffern des Reaktionsansatzes verzichtet werden konnte. Der Ansatz wurde für weitere 10 min. bei 37°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Hitzeinaktivierung für 10 min. bei 75°C. Nach dem Verdau wurden die PCR-Fragmente durch Verwendung des „DNA-Insolations Kits GeneJET PCR Purification“ aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte laut Herstellerangaben. Der Vektorverdau wurde durch Gelelektrophorese, Ausschneiden der entsprechenden Bande und anschließender Verwendung des „GeneJET Gel Extractions Kits“ extrahiert und aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte laut Herstellerangaben. Die so geschnittenen und aufgereinigten DNA-Fragmente wurden im Anschluss ligiert. Dies erfolgte unter Verwendung einer T4 Ligase von Fermentas. Die jeweiligen Reaktionsbedingungen richteten sich nach Art der Ligation. Dabei wurde in *sticky end*, *blund end* und *sticky/blund end* Ligation unterschieden. Die Reaktion wurde in 20 µl unter Zugabe von 2 µl 10 x T4 Ligase-Puffer und 1 µl T4 Ligase durchgeführt. Bei einer *blund end* Ligation wurde zusätzlich 2 µl PEG4000 hinzugefügt. Das eingesetzte Konzentrationsverhältnis der

DNA-Fragmente wurde mittels der Formel 4 berechnet. Das molekulare Verhältnis *insert*/Vektor betrug dabei 3-5/1. Die eingesetzte Masse des Vektorbackbones betrug bei allen Ligationen 100 ng.

Formel 4:

$$\mu\text{g}_I = x \times \mu\text{g}_V \times \frac{n_{\text{bp Insert}}}{n_{\text{bp Vektor}}}$$

μg_I = Masse *insert*

x = Molekulares Verhältnis

μg_V = Masse Vektor

$n_{\text{bp Insert}}$ = Zahl der bp *insert*

$n_{\text{bp Vektor}}$ = Zahl der bp Vektor

Im Falle einer *sticky end* Ligation erfolgte zunächst die Vereinigung des geschnittenen Vektors und des Inserts ohne die Zugabe des Puffers und der Ligase. Die DNA wurde anschließend eine min. auf 50°C erhitzt und auf 22°C abgekühlt. Dies sollte theoretisch eine eventuelle Fehlpaarung oder Aggregation der Überhängenden DNA-Einzelstränge lösen und durch das Abkühlen korrekt zusammenführen. Danach erfolgte die Zugabe des Puffers plus Ligase. Bei *blund end* Klonierungen wurde auf diesen Schritt verzichtet. Im Anschluss erfolgte ein Temperaturprogramm, welches mit absteigender Temperatur die Paarung der Schnittstellen begünstigen sollte. Bei *blund end* Klonierungen wurde dieses Temperaturprogramm in Zyklen programmiert. Dies sollte theoretisch die Wahrscheinlichkeit der zufälligen Zusammenführung der DNA-Enden durch alternierende Wärme- und Kältephasen erhöhen. In Tabelle 2 wurden die Temperaturprogramme aufgeführt. Nach der Hitzeinaktivierung der Ligase (bei 65°C für 20 min.) erfolgte die Elektortransformation der Ligationsansätze in *E.coli*.

Tabelle 2: Temperatur-Profile von *sticky*, *blund* und *sticky/blund end* Ligationen

<i>sticky end</i> Ligation	<i>blund end</i> Ligation	<i>sticky/blund end</i> Ligation
50°C 1 min	22°C 30 min	50°C 1 min
zugabe von	16°C 30 min	zugabe von
T4 Ligase/Puffer	10°C 30 min	T4 Ligase/Puffer
22°C 30 min	8°C 30 min	22°C 30 min
16°C 30 min	↓ 65°C 20 min	16°C 30 min
10°C 30 min		10°C 30 min
8°C ∞		8°C 30 min
↓ 65°C 20 min		↓ 65°C 20 min

x10
Zyklen

Neben den klassischen Klonierungsstrategien wurde auch ein kommerzielles Klonierungs-Kit der Firma Invitrogen verwendet. Das „Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit for Sequencing“ wurde bei PCR-Fragmenten angewendet, welche im Anschluss sequenziert werden sollten. Der zu sequenzierende DNA-Abschnitt wurde aufgrund der geringen Fehlerrate mittels der „PfuUltra DNA-Polymerase“ synthetisiert. Die Ligation erfolgte laut Herstellerangaben. Nach der Ligation erfolgte die Transformation in *E.coli*.

2.2.1.7 Sequenzierung von Plasmiden

Die Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Die Erfassung der Sequenzierungsdaten wurde vom hausinternen Sequenzierungslabor übernommen. Die komplette Sequenzierung der in dieser Arbeit erstellten viralen PFV-Mutanten erfolgte nach Maxi-Präparation des entsprechenden Konstrukts. Die Kettenabbruchsreaktion erfolgte mit einem „BigDye® Direct Cycle Sequencing Kit“ der Firma Applied Biosystems. Reaktionsansatz und -bedingungen waren wie folgt:

	<i>forward</i>	<i>revers</i>	Thermo-Cycler-Programm:		
	Reaktion	Reaktion			
Plasmid-DNA (150-300 ng)	x µl	x µl	Denaturierung	96°C	2 min.
5x ABI-Puffer	2,0 µl	2,0 µl	Denaturierung	96°C	10 sec.
for-Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl	-	Anhealing	57°C	5 sec.
rev-Primer (10 pmol/µl)	-	0,5 µl	Elongation	60°C	4 min.
ABI BigDye 3.1	1,0 µl	1,0 µl	Chill	4°C	∞
ddH ₂ O	ad10,0 µl	ad10,0 µl			
	Σ 10 µl	Σ 10 µl			

Die Sequenzen der eingesetzten Sequenzierungs-Primer wurden im Anhang ab S. XVI (Liste III) aufgeführt. Die Auswertung des Chromatogramms erfolgte mittels der Software „LaserGene Seqman“.

2.2.1.8 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei $\lambda = 260$ nm mit dem „NanoDrop®“ der Firma preQLab. Die Messung erfolgte laut Herstellerangaben. Die Software des Herstellers ermittelte unmittelbar die DNA-Konzentration in ng/µl. Zusätzlich wird die Reinheit der Probe aus dem Quotient OD_{260} / OD_{280} angegeben. Für DNA sollte der Wert bei 1,8 liegen.

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Kultivierung und Konservierung von Bakterien

Die Kultivierung von *E.coli* erfolgte in LB-Medium im Schüttler. Die Kultivierung von Transformanten erfolgte in LB-Medium unter Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin. Alle verwendeten *E.coli* Stämme wurden bei 37°C kultiviert. Nach der Transformation von *E.coli* MDS42 mit retroviralen Vektoren erfolgte die Kultivierung bei 30°C, wodurch Rekombinationsereignisse innerhalb des viralen Genoms minimiert werden sollten (Chakiath & Esposito, 2007). *E.coli* MDS42 ist ein multipler Deletionsstamm mit einem zu 14,28% deletiertem Genom, welcher speziell für retrovirale Vektorsysteme entwickelt wurde (Pósfai *et al.*, 2006). Die Kultivierung nicht retroviraler Transformanten erfolgte in *E.coli* TOP10 bzw. DH5α bei 37°C. Für die Erstellung einer Plasmid-Maxi-Präparation erfolgte ein Ausstrich der Transformanten auf LB-Selektions-Agarplatten. Von dieser Platte wurde eine Einzelkolonie gepickt und 16 h in 5ml flüssig Selektionsmedium kultiviert. Von dieser Vorkultur wurden 150 µl in 250 ml Medium überführt. Es erfolgte eine erneute Kultivierung über max. 16 h im Schüttler. Danach wurden die Zellen für 15 min. bei 6000 x *g* sedimentiert und laut Herstellerprotokoll (Qiagen) weiterverarbeitet. Zuvor erfolgte die Entnahme von 5ml Suspensionskultur für die Kryo-Konservierung. Für die Herstellung von Glycerinkulturen wurden 850 µl dieser Anzucht mit 150 µl Glycerin (87%) versetzt und in 2 ml Kryo-Röhrchen der Firma Greiner Bio-One überführt und bei -80°C gelagert.

2.2.2.2 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Die Herstellung elektrokompetenter Bakterien erfolgte in 2YT-Medium bei 37°C im Schüttler. Dafür wurden vier Erlenmeyerkolben zu je 250 ml Kulturmedium mit ca. 50 µl einer Kryo-Kultur des gewünschten Stammes angeimpft und bis zum Erreichen einer OD ($\lambda=600\text{nm}$) von 0,5 kultiviert. Die Suspensionskulturen wurden in Zentrifugenbecher überführt, welche zuvor mit einer 0,1%igen HCL-Lösung ausgewaschen wurden. Die Zellen wurden 15 min. bei 6000 x *g* und 4°C pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 200 ml eiskaltem HEPES-Puffer resuspendiert und 20 min. bei 8000 x *g* und 4°C pelletiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Nach dem vierten Waschschritt wurden die Zellen in 10 ml eiskalter HEPES / 8% Glycerin-Puffer resuspendiert und je 50 µl auf Trockeneis aliquotiert. Die gefrorenen Zellen wurden bei - 80°C gelagert.

2.2.2.3 Elektroporation elektrokompetenter Bakterien

Für die Elektroporation von Plasmid-DNA in kompetente Zellen wurde das Gerät „Gene Pulser® II“ der Firma Bio-Rad verwendet. Zum Einsatz kamen spezielle Elektroporationsküvetten des gleichen Herstellers. Diese wurden bei 4°C vorgekühlt. Die bei -80°C gelagerten elektrokompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Erfolgte die Transformation eines Ligationsansatzes, wurden max. 2 µl in 50 µl Zellsuspension überführt und leicht mit der Pipettenspitze gerührt. Die Retransformation von Plasmiden erfolgte mit 1 µl einer vorverdünnten Plasmid-Lösung ($c = 10 \text{ pg}/\mu\text{l}$). Die 50 µl Zellsuspension wurde in die vorgekühlten Küvetten überführt. Die Elektroporation der Zellen zur Aufnahme der Plasmid-DNA erfolgte bei 2,5 kV und 25 µF und 200 Ω. Anschließend wurden sofort 250 µl vorgewärmtes SOC-Medium auf die Zellen gegeben und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Danach erfolgte eine Inkubation bei 30°C für max. 30 min. Anschließend erfolgte die Ausplattierung aller Zellen auf Selektions-LB-Agarplatten und die Inkubation bei 30°C für 16 h im Brutschrank.

2.2.2.4 Plasmid-Präparation aus *E. coli*

Von den positiven Klonen der Kolony-PCR wurden die Zellen pelletiert. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit dem „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“ der Firma Fermentas. Die Durchführung erfolgte laut Herstellerangaben. Die Elution der Plasmide erfolgte in 50 µl des mitgelieferten Elutions-Puffers. Bei einer Plasmidgröße von über 10 kb erfolgte die Elution in 50 µl Elutions-Puffer, welcher zuvor auf 65°C erwärmt wurde. Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA und die Lagerung bei 4°C bzw. -20°C.

Die Plasmidisolation im großen Maßstab (Maxi-Präparation) erfolgte mit dem „EndoFree® Plasmid Maxi Kit“ der Firma Qiagen. Die Anzucht der Transformanten wurde unter Punkt 2.2.2.1 erläutert. Der Aufschluss der Zellen und die Isolation der Plasmide erfolgte laut Herstellerangaben. Die Plasmid-DNA wurde mit Isopropanol gefällt und 60-90 min bei 14250 x *g* und 4°C pelletiert. Danach erfolgte ein Waschschrift mit 70%igen Ethanol. Das Pellet wurde getrocknet und in 500 µl Elutions-Puffer bei 4°C über Nacht gelöst. Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung und die Lagerung bei 4°C bzw. -20°C.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Kultivierung und Konservierung von eukaryotischen Zelllinien

Das Kultivieren von adhärennten immortalisierten Zelllinien erfolgte in Zellkulturflaschen (T25, T75, T150 Hersteller: Midwest Scientific) bei 37°C, 100% Luftfeuchte und einem CO₂-Gehalt von 5%. Die BHK-21-Zelllinie wurde in DMEM (10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin (10.000 U/10.000 mg/ml)) kultiviert. Die Zelllinie „MRC-5“ wurde in E-MEM (10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin (10.000 U/10.000 µg/µl), 1% L-Glutamine (100 mM)) kultiviert. Das Passagieren der Zellen erfolgte alle vier Tage. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mittels einer gebrauchsfertigen Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Bei einer Probenahme zur Proteinanalyse wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden gelöst. Die gelösten Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert. Zum Erhalt der Kultur wurden die Zellen nach der Vereinzelnung im Verhältnis 1:5 (MRC-5) oder 1:10 (BHK-21) gesplittet, in eine Kulturflasche überführt und mit frischem Medium aufgefüllt. Die restlichen Zellen wurden einmal in PBS gewaschen und als Probe bei -20°C gelagert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte durch den „Coulter Counter Z2“ der Firma Beckman Coulter. Die Zählung erfolgte laut Herstellerangaben.

Um die Kulturen auf Dauer zu erhalten, wurde eine Kryo-Konservierung der Zelllinien vorgenommen. Dazu wurden die Zellen einer konfluenten Kultur (T150) vom Boden gelöst, bei 5 min. und 200 x *g* pelletiert und einmal in PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen in 10 ml vorgekühltem serum-freien Kryo-Medium der Firma Provitro resuspendiert und zu je 1 ml in Kryo-Röhren aliquotiert. Die Aliquots wurden in einem speziellen Gefriercontainer (Mr. Freeze der Firma Nalgen) bei -80°C tiefgefroren. Anschließend erfolgte die Lagerung der Zellen bei -196°C in flüssigem Stickstoff. Die Reaktivierung der Zellen erfolgte zügig. Dazu wurden die gefrorenen Aliquots in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, in eine Kulturflasche überführt, mit frischem Medium versehen und im Brutschrank inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium gewechselt.

2.2.3.2 Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen

In dieser Arbeit erfolgte die Transfektion von viralen Vektoren, um die Replikation der Viren einzuleiten. Die Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen erfolgte mittels Polyethylenimin (PEI)-Transfektion. Dazu wurden 5x10⁴ Zellen in eine 6-Kavitäten-Platte in 2 ml Medium ausgesät und für 16 h inkubiert. Beim Erreichen einer 80%igen Konfluenz erfolgte die

Transfektion. Der Transfektionsansatz beinhaltete in der Regel 0,5 µg Plasmid-DNA, 1 µl PEI (1 g/l) und 200 µl einer sterilen 150 mM NaCl-Lösung. Der Ansatz wurde 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz tropfweise dem Medium zugefügt und die Zellen wurden 24 h transfiziert. Nach dieser Zeit erfolgte das Umsetzen in eine neue Zellkulturflasche.

2.2.3.3 Zelllyse eukaryotischer Zellen

Die Art des Zellaufschlussverfahrens richtete sich nach den nachfolgenden Arbeitsschritten. Für die Durchführung einer anschließenden PCR-Analyse erfolgte der Zellaufschluss mittels frier/tau-Lyse und anschließendem Proteinase K-Verdau. Das Zellpellet wurde dreimal eingefroren und aufgetaut. Anschließend wurde das Zellpellet in 200 µl Proteinase K-Lysepuffer resuspendiert. Es erfolgte der enzymatische Verdau bei 65°C für 16 h. Im Anschluss erfolgte die Hitzeinaktivierung bei 95°C für 30 min. Die so generierten PCR-Proben wurden bei -20°C gelagert.

Zur Bestimmung des Proteingehalts der Zellen erfolgte der Zellaufschluss mittels RIPA-Lyse. Je nach Größe des Zellpellets wurden die Zellen in 100-500 µl eiskaltem RIPA-Lysepuffer aufgenommen. Es erfolgte eine Inkubation für 10 min. auf Eis. Anschließend wurde der Ansatz 10 min. bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die so gewonnenen Zelllysate wurden für immunologische Nachweismethoden verwendet.

2.2.3.4 Zellmorphologische Dokumentation mittels Licht-/Fluoreszenzmikroskopie

Die foamyvirale Infektion kennzeichnet sich durch typische zytopathische Effekte *in vitro*, welche unter dem Lichtmikroskop sichtbar wurden. Die Sichtung der infizierten Zellen erfolgte vor jeder Zellpassage. Dabei wurde die Verbreitung der Synzytienbildung unter den einzelnen PFV-Mutanten verglichen und dokumentiert. Im Falle der GFP-Hybridviren erfolgte zusätzlich die optische Detektion von GFP-exprimierenden Zellen. Das verwendete Lichtmikroskop „Eclipse TS10“ der Firma Nikon verfügte zusätzlich über eine Vollspektrum-Lichtquelle in dessen Strahlengang ein Lichtfilter eingeschoben werden konnte, um eine GFP-spezifische Anregungswellenlänge von $\lambda = 485$ nm zu emittieren. Die Fotodokumentation erfolgte mittels des Fluoreszenzmikroskops „Axiovert 100M“ der Firma Zeiss und einer an den PC angeschlossenen Kamera. Durch Ein- und Ausblenden des Fluoreszenzfilters konnten Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen eines Sichtfeldes erfasst werden. Das Zusammenlegen beider Aufnahmen erfolgte mit der Software Cell* von Olympus. Mikroskopiert wurde bei einer 200-, 400- und 800-fachen optischen Vergrößerung.

2.2.4 Virologische Methoden

2.2.4.1 Virustitration von Zellkulturüberständen

Die Bestimmung des Virustiters von Zellkulturüberständen erfolgte über die Berechnung der TCID₅₀/ml (*tissue culture infectious dose 50/ml*). Dieser Wert wurde mittels eines Endpunkt-Verdünnungs-Assays ermittelt und bestimmt die erforderliche Virusmenge, die zur 50%igen Infektion einer Zellkultur benötigt werden. Das Endpunkt-Verdünnungs-Assay wurde mit BHK-21-Zellen (2x10⁴ Zellen/Kavität) in einer 96-Kavitäten-Platte durchgeführt. Dabei wurde eine Verdünnungsreihe der Virusüberstände angefertigt und auf die Zellen übertragen. Die infizierten Zellen wurden drei Tage im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurde die Infektionsrate mittels PCR-Nachweis bestimmt. Dazu wurden die Zellen aufgeschlossen und die Anwesenheit von viraler DNA mittels qPCR gemessen. Jede Verdünnungsstufe wurde als Triplikat gemessen. Es erfolgte die Bestimmung der ersten Verdünnungsstufe, bei der keine virale DNA in den Zellen nachgewiesen werden konnte. Mit der nachfolgenden Formel 5 wurde der TCID₅₀ berechnet.

Formel 5:

$$\text{TCID}_{50}/\text{ml} = \frac{D_s^{\frac{x}{\text{Reps}} + 0,5}}{\frac{1}{D_0} \times D_s \times \frac{V}{1000}}$$

Ds = Verdünnungsstufen

X = Zahl der infizierten Kavitäten

Reps = Zahl der Replikate

D0 = erste Verdünnung

V = Volumen in µl/Kavität

2.2.4.2 Vergleich der Replikationskompetenz der erstellten PFV-Mutanten zum PFVwt *in vitro*

Um die Replikationskompetenz und –geschwindigkeit der modifizierten viralen PFV-Mutanten zu bestimmen und untereinander zu vergleichen, wurde eine definierte Menge an Plasmid-DNA in BHK-21-Zellen transfiziert (siehe Punkt 2.2.3.2). Für die Transfektion wurden jeweils 0,5 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Die Replikationsgeschwindigkeit von PFVwt diente dabei als Referenzwert. Als Negativkontrolle diente eine replikationsinkompetente PFV-Deletionsmutante (PFVdel; Vektorkarte siehe Anhang S. III) Diese Mutante wurde zufällig erzeugt und umfasste eine weitreichende Deletion des C-terminalen Bet-Genoms des 3'PPT und den Anfang der U3-Region der 3'LTR, wodurch die Replikationskompetenz komplett verloren ging. Diese Mutante induzierte nach Transfektion keine zytopathischen Effekte *in vitro*. Nach der Infektion wurden die Zellen passagiert, bis deutliche zytopathische Effekte unter dem Mikroskop sichtbar wurden. Es folgte der Transfer von jeweils 2 ml zellfreiem Zellkulturüberstand auf naive BHK-21-Zellen. Die neu-

infizierten Zellen wurden passagiert, bis erneut zytopathische Effekte sichtbar wurden und ein erneuter Übertrag auf naive Zellen folgte. Dieser Zyklus wurde bis zu fünfmal wiederholt. Die Zellpassagen erfolgen alle vier Tage. In den ersten Passagen wurde jeweils ein Zellpellet entnommen und eingefroren. In diesen Proben wurde nach Versuchsende die enthaltene virale PFV-DNA mittels qPCR quantifiziert (siehe $\Delta\Delta C_T$ -Methode, Abschnitt 2.2.1.2). Dabei diente der C_T -Wert der PFV-Probe zu Versuchsbeginn als Kalibrator-Probe $t = 0$. Somit konnte ermittelt werden, in welchem Maße sich die virale DNA-Menge der jeweiligen PFV-Mutanten im Vergleich zur DNA-Menge PFVwt veränderte. Dieses Verhältnis lieferte Rückschlüsse auf die Replikationskompetenz und -geschwindigkeit der einzelnen Mutanten in Bezug auf den PFVwt.

2.2.4.3 Ko-Kultivierung von primären Gewebszellen und Speichel für den Virus-Nachweis

Die Bestimmung der Virusreplikation in den Organen experimentell infizierter Tiere erfolgte mittels Ko-Kultivierung von infizierten Primärzellen mit einer heterologen Zelllinie (Falcone et al., 1999b). Für Hamster- und Mäusezellen wurden humane MRC-5-Zellen verwendet. Die zuvor frisch entnommenen, aufgearbeiteten und vereinzelt Gewebszellen wurden in komplettem RPMI Medium + 40 $\mu\text{g/ml}$ Phytohaemagglutinin (PHA) resuspendiert und mit den MRC-5-Zellen ko-kultiviert. Die Zugabe von PHA diente zur Stimulation der Primärzellen. Je Organ wurden ca. 1×10^6 Primärzellen in einer T75-Zellkulturflasche kultiviert. Die Ko-Kultivierung der Primärzellen erfolgte fünf bis sieben Tage. Nach dieser Zeit wurden die Primärzellen entfernt und es folgte die Kultivierung der MRC-5-Zellen für weitere zwei bis drei Wochen. Neben dem Virusreplikationsnachweis in ausgewählten Organproben sollte die Freisetzung von viralen Partikeln im Speichel der Versuchstiere untersucht werden. Zur Gewinnung einer Speichelprobe erfolgte das Ausspülen des Rachenraumes mit 2 ml PBS. Die Speichelproben wurden zentrifugiert und mit MRC-5-Zellen ko-kultiviert. Die Kultivierung erfolgte ebenfalls in komplettem RPMI-Medium (ohne PHA) unter Zugabe von 5 $\mu\text{g/ml}$ Ciprofloxacin, um der Kontaminationen mit Bakterien vorzubeugen. Die Zellen wurden drei Wochen kultiviert. Von allen MRC-5-Zellen der Ko-Kultur wurden DNA-Proben generiert. Der Nachweis von Virus-DNA erfolgte mittels qPCR.

2.2.5 Immunologische Methoden

2.2.5.1 Immunologischer Nachweis von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot (WB)

Zum Nachweis von viralen und 2F5-Epitope markierten Proteinen wurde die SDS-PAGE mit der Western Blot-Methode kombiniert. Die SDS-PAGE erfolgte in einer „Mini-PROTEAN® 3 Cell“ der Firma Bio-Rad laut Herstellangaben unter Standardbedingungen mit einem 5%igen Sammelgel und einem 12%igen Trenngel unter Verwendung der in Punkt 2.1.1 genannten Puffersysteme. Der Proteingehalt der Zellysate infizierter Zellen wurde mittels des „BCA Protein Assays“ der Firma Thermo Fischer Scientific bestimmt. Die Durchführung erfolgte laut Herstellerangaben. In der SDS-PAGE wurden jeweils gleiche Proteinmengen eingesetzt. Der anschließend durchgeführte WB erfolgte auf einer PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran in einer „*semi dry blotting* Kammer“ der Firma Bio-Rad unter Standardbedingungen mit unter Punkt 2.1.1 genannten Puffersystemen. Für den Nachweis von foamyviralen Proteinen wurde ein Immunsereum von einem PFV infizierten Hamster verwendet. Das Serum wurde 1:750 in Blockingpuffer (BP) verdünnt. Die Inkubationszeit des Primärantikörpers betrug 16 h bei 4°C. Die Detektion der gebundenen Hamster-Antikörper (AK) erfolgte durch einen polyklonalen <anti-Hamster-IgG> der Firma Acris Antibodies, konjugiert mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) (Verdünnung 1:10.000 in BP). Die Inkubationszeit des Sekundärantikörpers betrug 1 h bei RT. Der 2F5-Epitope-Nachweis erfolgte mit dem Primärantikörper mAb2F5, Verdünnung 1:10.000 in BP, 16 h bei 4°C und einem Sekundärantikörper <anti-Human-IgG>, konjugiert mit HRP (Firma Sigma Aldrich), in einer Verdünnung 1:5000 in BP, 1h bei RT. Als Chemolumineszenz-Substrat wurde eine gebrauchsfertige Zwei-Komponenten-ECL-Lösung der Firma GE Healthcare verwendet. Die Entwicklung des Western Blots erfolgte mit einem Film (BioMax MR) und Entwicklermaschine von Kodak. Die Belichtungszeit richtete sich nach der Intensität des Signals zwischen 1 und 30 min.

2.2.5.2 *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA)

Der immunologische Nachweis und die Quantifizierung einer gebildeten humoralen Immunantwort gegen die virale Infektion in den einzelnen Versuchstiergruppen erfolgte mittels eines in der Arbeitsgruppe etablierten, klassischen ELISAs (Perkovic *et al.*, 2010). Als Antigen wurde ein Zellysat von PFV-infizierten BHK-21-Zellen verwendet, 1:300 verdünnt in Karbonat-Puffer. Die Adsorptionszeit an die Oberfläche der ELISA-Platten (Maxisorb™ von Nunc) betrug 16 h bei 4°C.

Die Immunsereen der Versuchstiere wurden 2 h bei RT inkubiert. Der Nachweis der spezifisch gebundenen Antikörper erfolgte mittels eines HRP-gekoppelten sekundären Antikörpers gegen Hamster-IgG (Acris Antibodies) bzw. Maus-IgG (Sigma Aldrich). Die Erfassung der Messdaten erfolgte nach Perkovic *et al.*, (2010). Die <anti-PFV-IgG> Titer Bestimmung erfolgte mittels einer Serumverdünnungsreihe von 1:20 bis 1:43.740 in BP, in Triplikaten. Als IgG-Titer wurde diejenige Verdünnungsstufe angenommen, bei der unmittelbar vor der Nachweisgrenze des ELISAs ein Signal gemessen wurde. Die relative Quantifizierung des <anti-PFV-IgG>-Gehalts der Immunsereen erfolgte mittels gleichbleibender Serumverdünnung (1:100 in BP) und erreichter optischen Dichte ($OD_{495/620nm}$).

Neben dem klassischen ELISA wurde ein ebenfalls in der Arbeitsgruppe etablierter Peptid-ELISA durchgeführt. Dabei wurden Peptid-Pools des HIV-CTL-Epitope-Peptid-Sets angefertigt und an die ELISA-Platte adsorbiert (je Pool 50 μ l). Die Pools setzten sich aus fünf Peptiden des Peptidsets mit einer Endkonzentration von 0,1 μ g/ μ l zusammen. Somit enthielt jede Kavität eine Einzel-Peptid-Konzentration von 1,2 μ g/50 μ l. Die Zusammensetzung der jeweiligen Peptid-Pools wurde im Anhang ab S. XVII aufgeführt. Die zu testenden Immunsereen wurden in BP 1:50 verdünnt und 2 h bei RT inkubiert. Die Erfassung der gebundenen AK erfolgte mit einem HRP gekoppelten Sekundärantikörpers und der Messung der erreichten $OD_{495/620nm}$.

2.2.5.3 *Enzyme linked immunosorbent spot* (ELISPOT) Assay

Das ELISOPT Assay wurde in dieser Arbeit verwendet, um die IFN- γ -Sekretion von zytotoxischen T-Zellen der Maus nach *in vitro* Peptidstimulation nachzuweisen. Dazu wurden Mausmilzzellen von immunisierten Mäusen isoliert (Punkt 2.2.6.2) und mit je einem definierten Peptid-Set stimuliert (siehe Anhang ab S. XVII Liste IV). Zuvor wurden spezielle „Immobilon-P“ PVDF-Membran-Mikrotiterplatten der Firma Millipore laut Herstellerangaben aktiviert und es erfolgte die Beschichtung der Membran mit einem mAb <anti-maus IFN- γ -IgG> „AN18“ der Firma Mabtech (0,5 μ g/Kavität) für 16 h bei 4°C. Anschließend wurden die Platten gründlich (5x) in PBS-T (0,1% Tween20) gespült. Es folgte das Blockieren der Membran mit komplettem RPMI-Medium für 30 min. bei RT. Anschließend wurden die einzelnen Peptide des HIV-CTL-Epitop-Peptid-Sets in die Mikrotiterplatten vorgelegt (250 ng/Kavität). Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten. Es folgte die Zugabe der frisch isolierten Maus-Spleenozyten ($2,5 \times 10^4$ /Kavität). Dabei diente die Stimulation mit Pokeweed Mitogen (PWM) als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle diente komplettes RPMI-

Medium. Die Zellen wurden 18-20 h im 5% CO₂-Inkubator bei 37°C inkubiert. Dabei sollten Erschütterungen des Standorts vermieden werden. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen entfernt und die Platte wurde gründlich mit PBS-T gespült. Es folgte die Detektion des sekretierten gebundenen IFN- γ mittels eines zweiten Biotin-gekoppelten mAb <anti-maus-IFN- γ -IgG> und einem Avidin-Phosphatase-Konjugat der Firma Mabtech, laut Herstellerangaben. Zwischen den Inkubationsschritten wurden die Platten jedes Mal gründlich (5x) mit PBS-T gespült. Nach dem letzten Waschschrift erfolgte das Anfärben der Spots mittels einer gebrauchsfertigen „NBT-BCIP-Substratlösung“ der Firma BioRad laut Herstellerangaben. Die HRP-vermittelte Farbreaktion wurde durch Spülen mit Leitungswasser gestoppt. Die Platten wurden getrocknet und es folgte die computergestützte Erfassung der Spots mittels eines ELISPOT Reader der Firma AID unter Standardeinstellungen.

2.2.6 Tierexperimente

2.2.6.1 Serumgewinnung und Isolation von peripheren Blutzellen

Die regelmäßigen Blutentnahmen von den Versuchstiergruppen wurden vom hauseigenen Tierstallpersonal durchgeführt. Die frischen Blutproben wurden 24 h bei 4°C gelagert. Anschließend erfolgte die Trennung des Serums von den festen Blutbestandteilen. Dazu wurden die Proben 15 min. bei 4°C und 8500 x *g* zentrifugiert. Es folgte die vorsichtige Abnahme des Serums. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

Für die Gewinnung der peripheren Blutzellen wurde dem frisch entnommenen Blut eine Na-Citrat-Lösung (129 mM) zugefügt und die Blutprobe bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Es folgte die Trennung der Blutbestandteile mittels Zentrifugation unter Verwendung eines Polysaccharose-Gradienten. Dabei wurde eine gebrauchsfertige Polysaccharose-Lösung (Histopaque®-1077) der Firma Sigma Aldrich verwendet. Das frische Blut wurde auf die Polysaccharose-Lösung überschichtet. Es folgte die Zentrifugation bei 200 x *g*, 20 min., ohne Bremse. Nach der Zentrifugation wurde das Plasma und der PBMC-Ring entfernt und erneut bei 200 x *g* 20 min. zentrifugiert. Das Plasma wurde entnommen und bei -20°C gelagert. Die separierten PBMCs wurden in 50 ml PBS überführt und es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 250 x *g* für 10 min. Das Zellpellet wurde in komplettem RPMI-Medium resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und bis zur weiteren Verwendung im Brutschrank gelagert.

2.2.6.2 Entnahme und Aufarbeitung von Organproben

Die in dieser Dissertation durchgeführten Tierversuche wurden durch Euthanasie der Tiere beendet. Dazu wurde das Tier einer Überdosis „Isofluran“ der Firma CP-Pharma ausgesetzt. Im Anschluss erfolgte die Obduktion unter aseptischen Bedingungen. Das zu untersuchende Gewebe wurde entnommen und auf Eis in PBS bis zur weiteren Verarbeitung gekühlt. Die einzelnen Gewebe zur DNA-Isolation wurden unbehandelt bei -20°C gelagert. Von den Organen Lunge und Milz sollten die Gewebszellen aus dem Zellverband gelöst und vereinzelt werden. Dazu wurde ein „gentalMACS™ Dissociator“ der Firma Miltenyi Biotec verwendet. Die Lungen- und Milzproben wurden in ein C-Tube der gleichen Firma überführt und in serumfreien RPMI-Medium zerkleinert und die Zellen vereinzelt. Dieser Arbeitsschritt erfolgte automatisch mit Hilfe des „gentalMACS™“. Die entstandene Zellsuspension wurde über ein Zellsieb gegossen und in 50 ml PBS verdünnt. Die Zellsuspension wurde 10 min. bei $250 \times g$ zentrifugiert. Das Zellpellet wurde ein weiteres Mal in PBS gewaschen und anschließend in komplettem RPMI-Medium resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und bis zur weiteren Verarbeitung im Brutschrank gelagert.

2.2.6.3 Herstellung der Gene Gun-Munition

In der hier vorliegenden Dissertation erfolgte die Infektion der Versuchstiere durch ballistische Applikation der viralen Impfvektoren in die oberen Hautschichten des Abdomens. Dazu wurde das virale Plasmid an Goldpartikel gebunden und in einen Tefzel-Schlauch eingelagert, welcher als Munition für die Gene Gun eingesetzt wurde. Dazu wurden 25 mg Goldpartikel (Größe ca. $\text{\O} 1 \mu\text{m}$) in 100 μl einer 0,05 M Spermidin-Lösung aufgenommen und 5 s im Ultraschallbad geschwenkt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 μg Plasmid-DNA und eine erneute Behandlung im Ultraschallbad. Um die DNA zu fällen und an die Goldpartikel zu binden erfolgte die tropfenweise Zugabe von 100 μl einer 1 M CaCl_2 -Lösung, unter ständiger Bewegung. Die Suspension wurde 10 min. bei RT inkubiert. Es folgte das dreimalige Waschen der Goldpartikel mit 100% Ethanol, um das Wasser zu entfernen. In dieser Zeit erfolgte gleichzeitig das Begasen des Tefzel-Schlauchs mit N_2 , um ebenfalls Wasserrückstände zu entfernen. Das in Ethanol getrocknete DNA-Goldpellet wurde in 3 ml einer 0,025 mg/ml Polyvinylpyrrolidon in 100% Ethanol aufgenommen und erneut durch eine 5 s Beschallung im Ultraschallbad vereinzelt. Die Goldpartikelsuspension wurde in den begasten Tefzel-Schlauch gleichmäßig aufgezogen und in die „Tubing Prep Station“ von BioRad eingespannt. Die Adsorption der Goldpartikel an den Tefzel-Schlauch erfolgte laut Hersteller-

angaben. Der mit Goldpartikeln beschichtete Schlauch wurde in 1 cm lange Stücke geschnitten und bei 4°C im Exsikkator gelagert. Mit jeder Präparation können ca. 45 Munitionsstücke generiert werden, mit einem durchschnittlichen Plasmid-DNA Gehalt von 1 µg pro Schuss.

2.2.6.4 Applikation von viralen Vektoren durch die „Helios® Gene Gun“

Die Applikation der viralen Vektoren erfolgte durch die „Helios® Gene Gun“ der Firma BioRad. Dazu wurde die Apparatur an einer Helium-Druckgasflasche angeschlossen und mittels eines Manometers auf einen Arbeitsdruck von 300 psi eingestellt. Es folgte die Bestückung des Magazins mit den zuvor erstellten Munitionsstücken der jeweiligen viralen Vektoren. Die Gene Gun wurde geladen. Den Hamstern und Mäusen wurde das Fell abdominal entfernt und die Tiere wurden für den Beschuss fixiert. Der an der Gene Gun befestigte Abstandshalter wurde auf den Abdomen des Tieres aufgesetzt und es folgte der dreimalige Goldpartikelbeschuss pro Versuchstier. Durch den Druck wurden die Partikel aus dem Munitionsschlauch gelöst und in das obere Hautepithel der Tiere geschossen. Durch den dabei entstehenden lauten Knall wurden die Tiere in eine Art Schockzustand versetzt, wodurch auf eine Narkotisierung verzichtet werden konnte. Das Verfahren ist dabei minimal invasiv. Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurden die Munitionsmagazine gewechselt und es erfolgten zwei Leerschüsse, um den Lauf der Gene Gun vom verbliebenen Goldstaub zu befreien. Dadurch sollte eine Vermischung der DNA-Vektoren vermieden werden. Nach der Applikation wurden die Tiere in ihre Käfige gesetzt und es erfolgte eine optische Kontrolle des Applikationsbereichs nach 24 h.

2.2.6.5 Versuchsplan Phase I und Phase II

In der hier vorliegenden Dissertation wurden zwei chronologisch aufeinander folgende Tierversuche mit Hamstern und Mäusen durchgeführt. Die gewonnenen Erkenntnisse aus dem ersten Tierversuch ermöglichten die Optimierung der bis dahin erzeugten viralen Mutanten, wodurch eine zweite Generation von optimierten viralen Vektoren generiert werden konnte, welche im Anschluss auf ihre Funktionsfähigkeit *in vivo* getestet wurden. Dadurch ergab sich eine Einteilung der Tierversuche in eine erste und zweite Phase. Nachfolgend wurde der zeitliche Verlauf beider Versuche jeweils in einem Zeitstrahl dargestellt. Dabei wurde in Hamster- und Mausgruppen unterschieden. Die waagerechten Striche kennzeichnen die Blutungstermine. Zusätzlich wurden weitere Informationen zu den Versuchen in Tabellenform aufgelistet.

GG = Gene Gun; H = Hamster; M = Maus

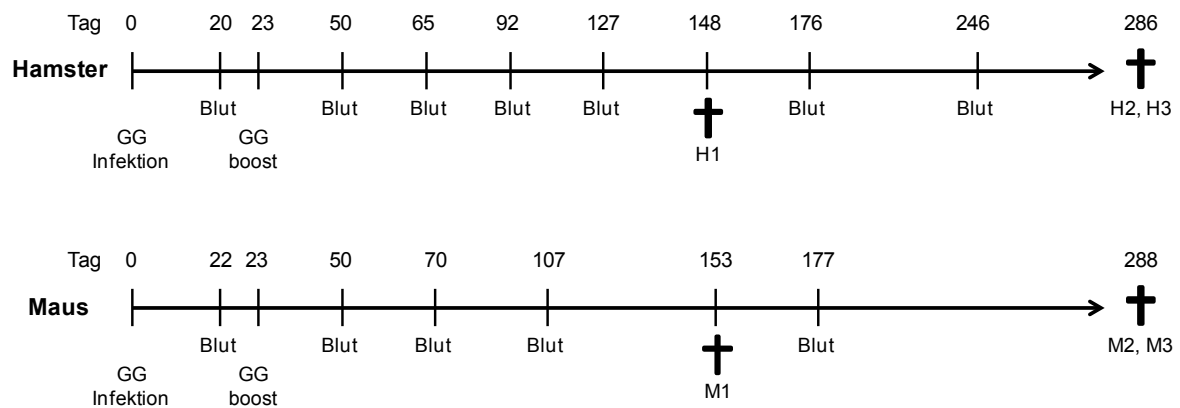
Versuchsplan Phase I:

Tabelle 3: Gruppenverteilung Phase I

Gruppen Nr. Hamster	Anzahl der Tiere	Gruppen Nr. Maus	Anzahl der Tiere	Applikation	viraler Vektor
H1	4	M1	5	2x Gene Gun	PFVwt
H2	4	M2	5	2x Gene Gun	PFVmcs
H3	4	M3	5	2x Gene Gun	PFV Δ bet
H4	4	-	-	2x Gene Gun	PFVdel

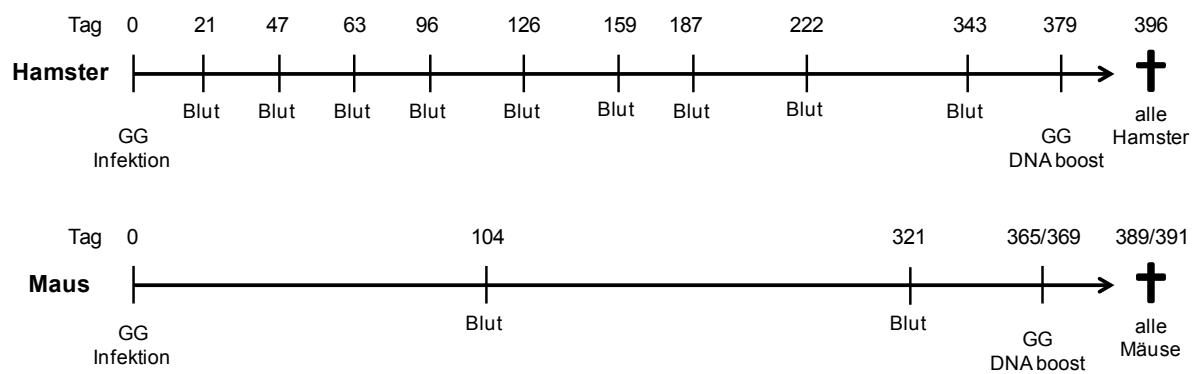
Versuchsplan Phase II:

Tabelle 4: Gruppenverteilung Phase II

Gruppen Nr. Hamster	Anzahl der Tiere	Gruppen Nr. Maus	Anzahl der Tiere	Applikation	viraler Vektor	Antigen
H5	3	M5	2	1x Gene Gun	PFcV-T0	leer
H6	3	-	-	1x Gene Gun	PFcV-T0a	leer
H7	3	-	-	1x Gene Gun	PFhV-T0<PSCA>	hPSCA
H8	3	M6	4	1x Gene Gun	PFhV-T0<CTL>	HIV-CTL
H9	3	M7	4	1x Gene Gun	PFhV-T0a<CTL>	HIV-CTL
H10	3	M5	2	1x Gene Gun	PFcV-T1	leer
H11	3	M8	4	1x Gene Gun	PFhV-T1<CTL>	HIV-CTL
H12	3	M9	4	1x Gene Gun	PFhV-T1a<CTL>	HIV-CTL
H13	4	-	-	1x Gene Gun	PFcV-T0del / PFhV-T0<CTL>del	NK

3. Ergebnisse

3.1 Konstruktion von replizierenden viralen Vektoren auf Basis von PFV

Die Aufgabenstellung der hier vorliegenden Dissertation ist die Konstruktion eines replizierenden viralen Vektorsystems auf PFV-Basis für die spätere Anwendungen als neue Vakzinierungsmethode *in vivo*. Dazu war es erforderlich, das vorliegende Foamyvirus PFV (siehe Abb. 5) genetisch zu modifizieren. In das Plasmid pHSRV2/13 (Rethwilm *et al.*, 1990, Löchelt *et al.*, 199; Vektorkarte siehe Angang S. I) wurde eine „Multiple Cloning Site“ (MCS) an Base 10300 des viralen Genoms eingefügt. Dies erfolgte über PCR-Synthese eines DNA-Fragments mit den Primern Nr. 11/12 (Anhang S. XV; Liste II) und der anschließenden Klonierung des PCR-Fragments in den viralen Vektor. Das Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen *SanDI* und *SaII* einkloniert. Die Durchführung wurde unter Punkt 2.2.1.6 erläutert. Bei der Konstruktion der „MCS1“ wurde darauf geachtet, dass alle relevanten offenen Leserahmen erhalten blieben, wodurch das virale Genom nur geringfügig modifiziert wurde. Die Sequenz der eingefügten MCS1 wurde im Anhang S. XIV aufgeführt. Das so generierte Plasmid erhielt die Kennzeichnung pPFVmcs (Vektorkarte siehe Angang S. III). In Abb. 5 ist eine schematische Darstellung des modifizierten viralen Genoms aufgeführt. Im Laufe der Klonierungsarbeiten traten häufig vektorinterne Rekombinationsereignisse auf, welche durch die im Plasmid enthaltenden repetitiven LTR-Sequenzen verursacht wurden. Um diese zu minimieren wurde die 5'LTR durch einen CMV-Promotor ersetzt. Dieser Austausch erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *EagI* und *PasI* des Vektors pPFVmcs. Das CMV/PFV-U5gag-hybrid-Fragment wurde mittels einer Fusions-PCR erzeugt. Die Durchführung wurde unter Punkt 2.2.1.1 erläutert. Das so modifizierte Virusgenom erhielt die Kennzeichnung PFV *basic* und diente als Basis-Vektor für die folgenden Arbeitsschritte. Eine schematische Darstellung der vorgenommenen genetischen Modifikation ist ebenfalls in Abb. 5 aufgeführt (Vektorkarte siehe Angang S. IV). Wie bereits in der Einleitung erwähnt, gibt es Hinweise darauf, dass bei degenerativer Modifikation des *bet*-Leserahmens die Replikationsfähigkeit von SFV erhalten bleibt (Yu & Lineal 1993; Schmidt & Rethwilm 1995; Mergia *et al.*, 1998). Diese Besonderheit bei der viralen Replikation von simianen Foamyviren sollte genutzt werden, um die Verpackungskapazität des viralen Vektorsystems zu erweitern. Deshalb wurde die C-terminale *bet*-Sequenz zwischen dem *tas*-Leserahmen und der 3'LTR aus dem Vektor pPFV *basic* entfernt. Über die Restriktionsschnitt-

stellen *XhoI* und *SaII* wurde der Teil der *bet*-Sequenz entfernt und durch ein reduziertes PCR-synthetisiertes DNA-Fragment ersetzt. Dieses Fragment beinhaltete die komplette 3'LTR und den zur Replikation essentiellen 3'Polypurintrakt (PPT). Die PCR-Synthese des DNA-Fragments erfolgte über das Primerpaar Nr. 12/19 (siehe Anhang S. XV) und den Vektor pHSRV2/13 als PCR-*template*. Die so generierte PFV Δ Bet-Deletionsmutante erhielt die Kennzeichnung PFV Δ bet (Vektorkarte siehe Anhang S. V). Der schematische Aufbau dieser Mutanten ist ebenfalls in der nachfolgenden Abb. 5 aufgeführt.

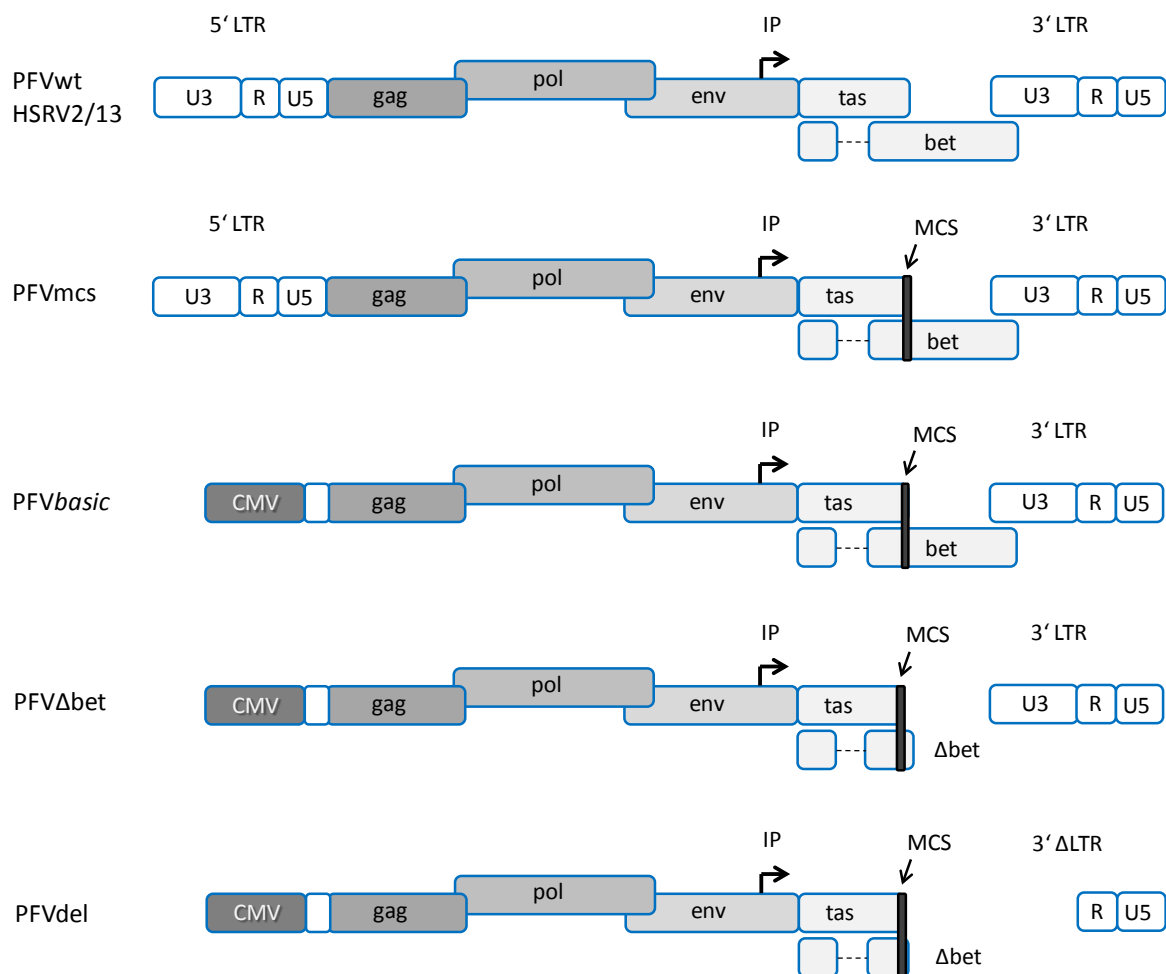


Abb. 5: Schematische Darstellung von PFVwt, PFVmcs, PFVbasic, PFV Δ bet und PFVdel

Gezeigt ist eine schematische Darstellung des genetischen Aufbaus von PFVwt, PFVmcs, PFVbasic, PFV Δ bet und PFVdel. Das Foamyvirusgenom wird von den Long Terminal Repeats (LTR) beidseitig flankiert. Zwischen den LTRs befinden sich die viralen Gene *gag*, *pol* und *env*. Der interne Promotor wurde mit IP markiert. Nachfolgend befinden sich die akzessorischen foamyviralen Gene *tas* und *bet*. Der dunkel markierte Balken kennzeichnet die Lage der MCS innerhalb der PFV-Mutanten. Bei der Mutante PFVbasic und den daraus resultierenden Mutanten ist die 5'LTR durch einen CMV-Promotor ersetzt. Auf Basis der Mutanten PFVbasic wurde die Δ Bet-Mutante PFV Δ bet erstellt. Das verkürzte Genom von *bet* wurde mit Δ bet markiert. Dabei endet der Δ bet-Leserahmen innerhalb der 3'LTR. Um jedoch die Deletion der *bet*-

Sequenz zu veranschaulichen, wurde in der Grafik zwischen dem Ende des *bet*-Leserahmens und der 3'LTR eine Lücke eingefügt. Die Lücke zwischen der MCS und der 3'LTR bei PFV Δ del kennzeichnet ebenfalls die Lage der Deletion innerhalb der LTR-Deletionsmutante.

Zwischen den einzelnen Klonierungsschritten zu den jeweiligen PFV-Mutanten wurden die generierten viralen Vektoren vollständig sequenziert (Sequenzierungsprimer siehe Anhang S. XVI, Liste III). Der Sequenzabgleich ergab jeweils eine 100%ige Übereinstimmung mit der Sollsequenz. Des Weiteren erfolgte die Transfektion der PFV-Mutanten in BHK-21-Zellen, um den Erhalt der Replikationskompetenz der viralen Konstrukte zu prüfen. Nach Transfektion konnte bei allen erzeugten PFV-Mutanten ein für Foamyviren typischer CPE (siehe Abb. 1) beobachtet werden. Während der Klonierungsarbeiten zu PFV Δ bet wurde zufällig eine 3'LTR Deletionsmutante generiert. Die aufgetretene Deletion umfasste den C-terminalen Teil des Bet-Genoms, den 3'PPT und den Anfang der U3-Region der 3'LTR, wodurch die Replikationskompetenz des Vektors verloren ging. Diese PFV-Deletionsmutante induzierte nach Transfektion keine zytopathischen Effekte *in vitro*. Auch nach mehreren Zellpassagen konnte keine Degeneration der Zellstrukturen beobachtet werden, während die Mutanten PFV mcs , PFV $basic$ und PFV Δ bet deutliche zytopathische Effekte induzierten. Diese ersten Ergebnisse lieferten einen Hinweis auf den Erhalt der viralen Replikation der generierten PFV-Mutanten. In den nachfolgenden Experimenten konnte der Erhalt der Virusreplikation mittels qPCR bestätigt werden. Die Ergebnisse hierzu sind im nachfolgenden Abschnitt aufgeführt. Die LTR-Deletionsmutante erhielt die Kennzeichnung PFV Δ del und wurde in den folgenden Experimenten als replikationsinkompetente Negativkontrolle mitgeführt. In Abb. 5 ist der schematische Aufbau der Mutanten PFV Δ del mitaufgeführt. Die Vektorkarte befindet sich im Anhang S. II.

3.2 PCR-basierter Replikationsnachweis der PFV-Mutanten *in vitro*

Nach Abschluss der Klonierungsarbeiten zu den bisher erstellten PFV-Mutanten PFV mcs , PFV $basic$ und PFV Δ bet sollte der Erhalt der Replikationskompetenz überprüft und untereinander verglichen werden. Dazu wurden alle Vektoren parallel in BHK-21-Zellen transfiziert und der Verlauf der viralen DNA-Reproduktion mittels qPCR bestimmt. Die Durchführung dieses PCR-basierten Replikationsvergleichs wurde unter Punkt 2.2.4.2 erläutert. Die Bestimmung des viralen DNA-Gehaltes mittels qPCR sowie die Auswertung der PCR-Daten ist unter den Punkten 2.2.1.2 &

2.2.1.3 beschrieben. Zeitgleich sollte geprüft werden, ob die generierten PFV-Mutanten funktionale Viruspartikel in das Zellkulturmedium freisetzen. Dazu wurde ein Übertrag von virulentem Zellkulturmedium auf naive Zellen durchgeführt. Nach der parallelen Transfektion aller Mutanten konnten bereits nach sieben Tagen erste zytopathische Effekte in den PFVwt-, PFVmcs- und PFVbasic-infizierten Zellkulturen beobachtet werden. Dagegen zeigten die infizierten Zellen der Mutante PFV Δ bet erst nach der ersten Zellpassage und 20 Tage nach Transfektion vergleichbare zytopathische Effekte. Die PFVdel-transfizierten Zellen zeigten über den Zeitraum des Replikationstests keine zellmorphologischen Veränderungen. Die mittels qPCR gemessenen Daten zur Bestimmung der viralen DNA-Reproduktion sind in der nachfolgenden Abb. 6 aufgeführt. Die Y-Achse repräsentiert einen relativen DNA-Reproduktions-Faktor in Bezug auf die Ausgangs-DNA-Menge von PFVwt nach Transfektion. Dabei wurde eine logarithmische Skalierung zur Basis 2 verwendet. Dies ergibt sich aus der Brechung der Ergebnisse mit der Formel 3 (Seite 37). Die X-Achse zeigt die Tage nach Transfektion.

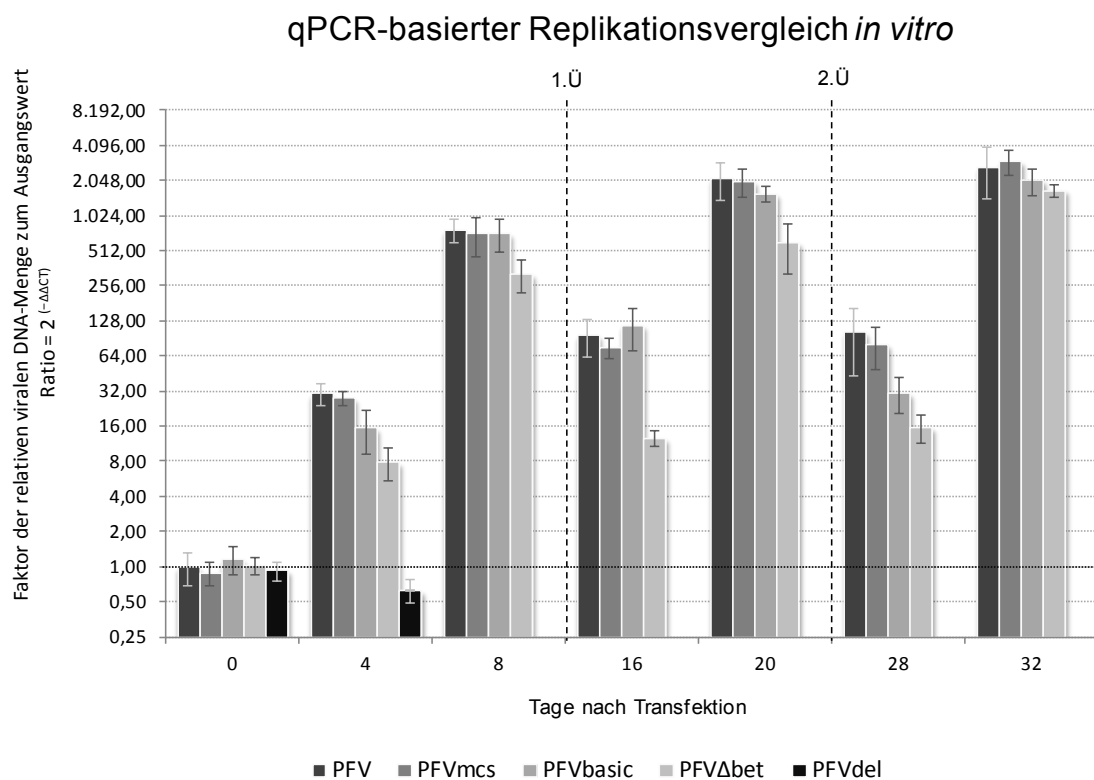


Abb. 6: Auswertung der Messergebnisse der qPCR des *in vitro* Replikationsvergleich von PFV mit den Mutanten PFVmcs, PFVbasic, PFV Δ bet und PFVdel

Das Balkendiagramm zeigt die ausgewerteten Messdaten der qPCR des *in vitro* Replikationsvergleich von PFV mit den PFV-Mutanten PFV*mcs*, PFV *basic*, PFV Δ bet und PFVdel. Die Y-Achse zeigt den relativen DNA Reproduktions-Faktor in Bezug auf die anfängliche DNA-Menge von PFVwt in der Probe nach Transfektion (t=0). Die dabei enthaltene DNA-Menge wird durch den Wert „Eins“ repräsentiert. Dieser wurde durch die waagerechte, gestrichelte Linie markiert. Die logarithmische Einteilung zur Basis 2 der Y-Achse ergibt sich durch die Auswertung der Messreihe mit der Formel $\text{Ratio}=2^{(-\Delta\Delta\text{CT})}$, welche in Folge logarithmische Messdaten produziert. Die X-Achse zeigt die Tage nach Transfektion. Die Balken eines Messdatums entsprechen der Bezeichnung, Farbe und Reihenfolge der Legende. Die mit „1Ü“ und „2Ü“ gekennzeichneten, senkrechten, gestrichelten Linien markierten den Zeitpunkt des Übertrags des infizierten Kulturmediums auf naive BHK-21-Zellen.

Das Diagramm zeigt die relative virale DNA-Menge in einer Probe in Bezug auf die anfängliche DNA-Menge von PFVwt zum Zeitpunkt „Null“. Zu Beginn des Experiments waren nur wenige Kopien in der Probe enthalten. Durch die Replikation der Viren vermehrte sich diese DNA-Menge im Verhältnis zur Effektivität der Replikation. Somit konnte die Reproduktion der viralen DNA-Menge der jeweiligen Mutanten im Laufe des Experiments untereinander verglichen werden. Dabei war es möglich, Rückschlüsse auf die Replikationsgeschwindigkeit der einzelnen Mutanten zu gewinnen. Acht Tage nach Transfektion hatten sich die DNA-Mengen von PFVwt, PFV*mcs* und PFV *basic* durchschnittlich um den Faktor 600 gleichermaßen erhöht. Die Mutante PFV Δ bet zeigte dagegen eine geringere Reproduktion der DNA-Menge, um den Faktor 321. Nach Übertrag des zellfreien Mediums von infizierten Zellen auf naive Zellen konnte erneut eine produktive Infektion in den Zielzellen etabliert werden. Dies konnte durch den Anstieg der viralen DNA in den darauffolgenden Proben nach dem ersten und zweiten Übertrag (1.Ü, 2.Ü) gezeigt werden. Lediglich in der Kultur der Negativkontrolle PFVdel wurde ein Abfall der viralen DNA-Menge gemessen, welche nach dem ersten Übertrag unter die Nachweisgrenze sank. Dies spricht eindeutig für den Verlust der Replikationskompetenz dieser Deletionsmutante. Dagegen zeigten die Mutanten PFV*mcs* und PFV *basic* wiederum eine vergleichbare Reproduktion der DNA-Menge hinsichtlich der DNA-Reproduktion des PFV-Wildtyps. Die Bet-Deletionsmutante zeigte wiederum einen moderaten Anstieg, welcher mit den vorherigen Messungen vergleichbar war. Dieses Muster setzte sich nach dem zweiten Übertrag fort. Durch dieses Experiment konnte der Erhalt der Replikationskompetenz *in vitro* und die Fähigkeit zur Freisetzung von funktionalen viralen Partikeln durch die Mutanten PFV*mcs*, PFV *basic* und PFV Δ bet bewiesen werden.

3.3 Infektionsversuch von Hamstern und Mäusen mit PFV und den PFV-Mutanten

Da die hier vorliegende Arbeit die Induktion einer gezielten und langanhaltenden Immunantwort durch foamyvirale Vektorsysteme als Zielsetzung beinhaltet, sollte im Anschluss die prinzipielle Induktion einer vektorspezifischen Immunantwort durch die generierte PFV- Δ Bet-Deletionsmutante in einer ersten Tierversuchsphase untersucht werden. Im Vorfeld dieser Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe bereits ein PFV-Infektionsversuch in syrischen Goldhamstern durchgeführt. Die dabei erzielten Ergebnisse zeigten die Induktion einer permanenten PFV-spezifischen Immunantwort über einen Zeitraum von über 200 Tagen (Daten nicht veröffentlicht). Durch die dabei angewandte Infektionsmethode war es möglich, reproduzierbare PFV-Immunantworten im Hamstermodell zu induzieren. Dabei könnte eine permanente PFV-gerichtete Immunantwort über einen Zeitraum von über 200 Tagen für die Replikation des Virus im Hamstermodell sprechen. Deshalb schien das Modell geeignet, die Replikation der PFV-Mutanten sowie die dadurch induzierte Immunantwort über einen längeren Zeitraum zu untersuchen. Um die Ergebnisse mit einem bereits publizierten Tiermodell vergleichen zu können, wurden Labormäuse des Stammes C57BL/6 in den Versuchsaufbau mit einbezogen (Brown *et al.*, 1982; Schmidt *et al.*, 1997b). Dadurch erweiterte sich gleichzeitig das Spektrum an immunologischen Nachweismethoden. Die Applikation der PFV-Mutanten erfolgte mittels der „Helios® Gene Gun“ der Firma Bio Rad. Dabei wurden mit viraler Vektor-DNA (PFV-Mutanten) beschichtete Goldpartikel in das obere Hautepithel der Tiere geschossen. Diese Methode bot gegenüber der klassischen intraperitonealen (i.p.) Applikation von definierten viralen Zellkulturüberständen eine Reihe von Vorteilen, welche in der Diskussion näher erläutert werden. Die Durchführung der Infektion wurde unter Punkt 2.2.6.4 beschrieben. Die Hamster und Mäuse wurden mit den Plasmiden pHSRV2/13, pPFVmcs, pPFV Δ bet und pPFVdel (Negativkontrolle) infiziert. In regelmäßigen Abständen wurde den Tieren eine Blutprobe entnommen (siehe Versuchsplan S. 53) und das Serum daraus gewonnen. Die Versuchsdauer wurde vorerst auf 150 Tage festgelegt. Nach 148 Tagen wurden zunächst die PFVwt-infizierten Tiere euthanasiert. Es folgte eine Bestimmung von PFV-spezifischen IgGs in allen Seren der PFVwt-infizierten Gruppen mittels ELISA. Die Durchführung des PFV-ELISAs wurde unter dem Punkt 2.2.5.2 beschrieben. Die Ergebnisse sind nachfolgend aufgeführt.

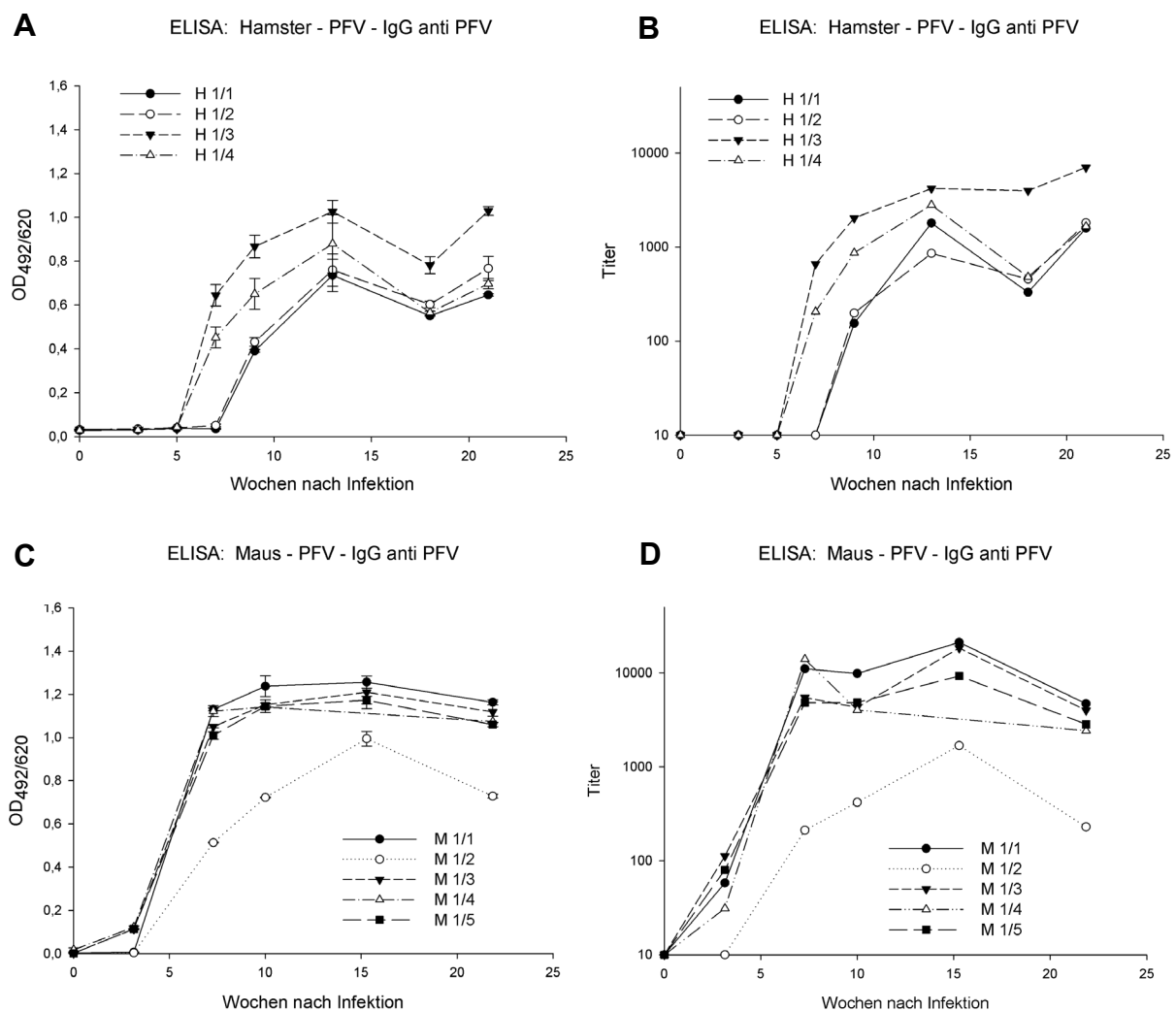


Abb. 7: ELISA-Messergebnisse zu dem Infektionsversuch von Hamstern und Mäusen mit dem PFVwt

Die Diagramme zeigen den zeitlichen Verlauf der IgG-Immunantwort gegen virale PFV-Proteine im ELISA von PFVwt-infizierten Hamstern und Mäusen. Als Antigen wurde ein PFV infiziertes BHK-21-Zellysate verwendet. Der Versuchszeitraum erstreckte sich über 148 Tage. Auf den X-Achsen wurden die Wochen nach Infektion aufgetragen. Diagramm A zeigt die relative IgG-Konzentration bei einer $OD_{492nm/620nm}$ der infizierten Hamstergruppe H1 (Serumverdünnung 1:100). Diagramm B zeigt den absoluten <anti-PFV-IgG> Titer der Immunsere der Hamstergruppe H1. Diagramm C zeigt die relative IgG-Konzentration bei einer $OD_{492nm/620nm}$ der infizierten Mausgruppe M1 (Serumverdünnung 1:100). Diagramm D zeigt wiederum den absoluten IgG-Titer der Mausseren gegen virale Antigene.

Abb. 7A und C zeigen jeweils die erreichte relative Optische Dichte ($OD_{492nm/620nm}$) durch <anti-PFV-IgG> in den Seren der PFVwt-Gruppen H1 und M1. Während in Abb. 7B und D der absolute <anti-PFV-IgG>-Titer der gleichen Hamster- und Mausseren gezeigt wird. Beide Bestimmungsmethoden weisen vergleichbare Messergebnisse auf. Deshalb wurden in den darauffolgenden Experimenten auf die umfangreichere und kostenintensivere IgG-Titer-Bestimmung verzichtet und es erfolgte lediglich die Bestimmung der relativen Optischen Dichte durch die Blutseren.

In Abb. 7A und B zeigen 50 Tage nach Infektion lediglich zwei der Tiere eine erste humorale Immunantwort gegen PFV. Wohingegen bei den Tieren H1/1 und H1/2 erst nach 65 Tagen erste Antikörper nachgewiesen werden konnten. Dies könnte auf eine schwächere Startinfektion hindeuten. Alle Seren wiesen bis zu Tag 92 einen Anstieg der Antikörperkonzentration auf. In den darauffolgenden Probenahmen konnte eine Konzentrationsabnahme verzeichnet werden. Der darauffolgende erneute Anstieg der Antikörperkonzentration am Tag 148 weist auf eine Art „Peak-Phase“ der PFV-gerichteten humoralen Immunantwort hin. Bei den Mäusen konnte ein variabler Verlauf der induzierten humoralen Immunantwort verzeichnet werden. Die Ergebnisse hierzu sind in Abb. 7C und D aufgeführt. Bereits nach 20 Tagen konnte in vier von fünf Tieren eine erste Immunantwort nachgewiesen werden. In den darauffolgenden Abnahmen zeigten die Mäuse eine starke, aber relativ konstante Antikörperantwort gegen PFV. Erst nach 153 Tagen wurde ein signifikanter Abfall der Immunantwort verzeichnet.

Um weiterführende Informationen über die PFV-Infektion in Hamstern und Mäusen zu erhalten, wurden beide Gruppen nach 148 Tagen obduziert. Bis zu diesem Zeitpunkt zeigten die Tiere keine pathologischen Befunde. Den Tieren der Gruppe H1 und M1 wurden die Organe Milz, Lunge, Darm, Zunge, Niere und Leber entnommen. Zusätzlich wurden aus dem Blut der Tiere die peripheren Blutzellen gewonnen. Von allen Geweben wurde die genomische DNA isoliert und mittels *nested* PCR auf die Anwesenheit von Pro-Viren getestet. Zusätzlich wurden die Zellen der Organe Milz und Lunge mit MRC-5-Zellen ko-kultiviert, um eine virale Replikation in den Organen nachzuweisen. Dabei war es nicht möglich, Viren oder Pro-Viren in den einzelnen Geweben nachzuweisen. Auch wurde von allen Tieren eine Speichelprobe gewonnen und mit MRC-5-Zellen ko-kultiviert, um eine eventuelle Freisetzung von PFV im oralen Raum der Tiere zu untersuchen, wie dies auch in anderen Arbeiten gezeigt werden konnte (Falcone *et al.*, 1999a; Murray *et al.*, 2006). Dabei konnten ebenfalls keine freien Viruspartikel im Speichel der Tiere nachgewiesen werden.

Da in den Tieren der PFVwt-Gruppen keine Virusreplikation nachgewiesen werden konnte, erschien der Replikationsnachweis in den Gruppen der PFV-Mutanten als eher unwahrscheinlich. Deshalb wurde der Versuch weitergeführt, um die für die Arbeit wichtigeren Langzeiteffekte der Infektion beobachten zu können. In dieser Zeit wurden weitere Blutproben von den restlichen Gruppen (PFVmcs, PFV Δ bet und PFVdel) entnommen (siehe Versuchsplan S. 53). Nach 286 bzw. 288 Tagen wurde der Versuch beendet. Anschließend erfolgte die IgG-Bestimmung gegen PFV in allen gewonnenen Seren mittels ELISA. Die Ergebnisse sind nachfolgend in Abb. 8 aufgeführt.

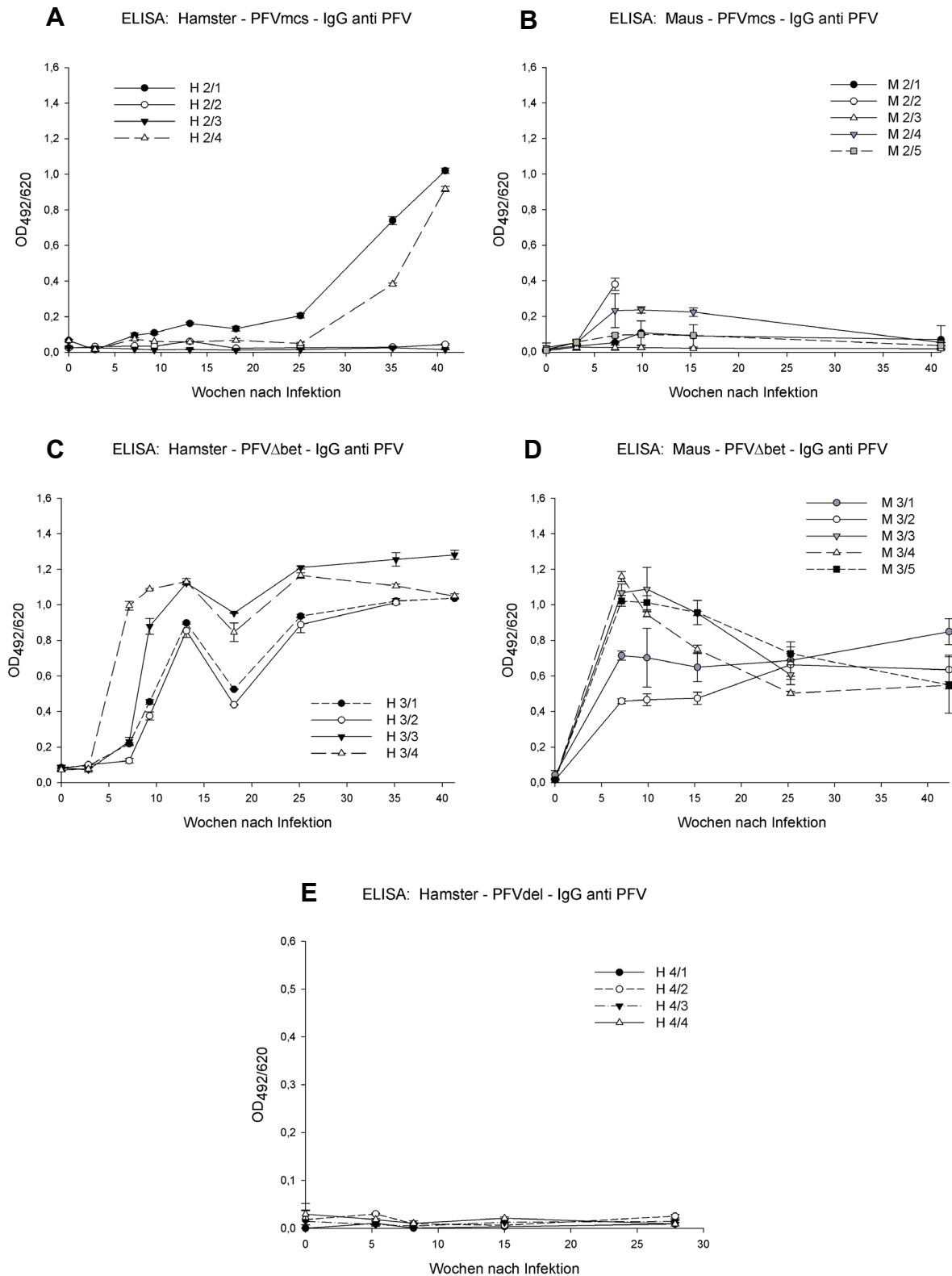


Abb. 8: ELISA-Messergebnisse zu dem Infektionsversuch von Hamstern und Mäusen mit PFVmcs, PFV Δ bet und PFVdel

Die Diagramme zeigen den zeitlichen Verlauf der IgG-Immunantwort gegen virale PFV-Proteine im ELISA von infizierten Hamstern und Mäusen. Als Antigen wurde ein PFV-infiziertes BHK-21-Zelllysate verwendet. Die

Serumverdünnung betrug bei allen Seren 1:100. Der Versuchszeitraum erstreckte sich über 286(H) bzw. 288(M) Tage. Auf den X-Achsen wurden die Wochen nach Infektion aufgetragen und auf den Y-Achsen die erreichte OD_{492nm/620nm} der jeweiligen Serumproben. Diagramm A und B zeigen die humorale Immunantwort der mit PFVmcs-inokulierten Gruppen H2 und M2. Die Diagramme C und D zeigen die humorale Immunantwort der Δ Bet-Mutanten PFV Δ bet inokulierten Gruppen H3 und M3. Die Diagramme E zeigt die Messergebnisse der Negativkontrollgruppe H4.

Abb. 8A und B zeigen die PFV-spezifischen IgG-Antikörperantworten der Gruppen H2 und M2 im zeitlichen Verlauf, welche durch die Applikation des Klons PFVmcs induziert wurden. Zwei der vier Hamster zeigten im gesamten Versuchszeitraum keine Reaktion gegen PFV. Die anderen zwei zeigten einen allmählichen schwachen Anstieg der PFV-spezifischen IgG-Konzentration. Die Mäuse zeigten eine noch schwächere Reaktion im ELISA. Tier 2/2 verstarb bei der zweiten Blutung. Zu diesem Zeitpunkt zeigte das Tier eine schwache Immunantwort. In drei Tieren der Gruppe wurde eine ähnliche schwache Sekretion von <anti-PFV-IgGs> über den Versuchszeitraum detektiert. Zu Versuchsende wurden keine Antikörper gegen PFV in der Mausgruppe gemessen. Hinsichtlich der Messwerte der anderen Gruppen dieses Tierversuchs sprechen diese Daten eher für eine stark beeinträchtigte Replikationskompetenz der Mutanten PFVmcs *in vivo*, während die *in vitro* Daten eher auf eine PFVwt-vergleichbare Replikationskompetenz hinweisen.

In Abb. 8C und D ist die Immunantwort der mit PFV Δ bet inokulierten Tiere aufgeführt. Sieben Wochen nach Applikation wurde bei allen Tieren der PFV Δ bet-Versuchsgruppen H3 und M3 ein Anstieg der IgG-Konzentration beobachtet. Bei den Hamstern konnte zwischen der siebten und 18. Woche erneut eine Art „Peak-Phase“ verzeichnet werden, welche mit der Immunantwort der Gruppe H1 vergleichbar ist. 25 Wochen nach Infektion wurde ein erneuter Anstieg der IgG-Konzentration gemessen, welcher bis Versuchsende weiterhin leicht ansteigt. Nur ein Tier zeigte einen Abfall des Antikörpertiters. Diese Daten könnten auf eine *in vivo* Replikation der PFV- Δ Bet-Deletionsmutanten hindeuten. Im Vergleich zu den Hamstern zeigten die Mäuse ein variables Muster der Immunantwort. Alle Mäuse der Gruppe M4 zeigten erneut einen sprunghaften Anstieg der IgG-Konzentration nach sieben Wochen, welcher bei drei Tieren im Laufe des Versuchs abnahm. Zwei Tiere zeigten nach sieben Wochen eher einen konstant leicht ansteigenden Verlauf der Immunreaktion gegen PFV. Diese Daten könnten ebenfalls für eine Replikation der Δ Bet-Mutante in Mäusen sprechen. In Abb. 8E wurden die Messdaten der PFVdel-Negativkontrollgruppe H4 aufgeführt. Über den Zeitraum des Versuchs konnte in keinem der Hamster eine PFV-spezifische IgG-Antwort gemessen werden. Dies deutet darauf hin, dass die PFV-spezifische Immunreaktion in den Gruppen der anderen PFV-Mutanten durch Replikation der Viren induziert wurde.

Nach Versuchsende wurden alle Tiere obduziert. Über den Zeitraum von knapp 300 Tagen konnte kein Hinweis auf eine infektionsbedingte Pathogenese gefunden werden. Der Pro-Virusnachweis mittels DNA-PCR-Analyse einzelner Organe bei PFVwt-infizierten Tieren führte zu keinem positiven Ergebnis. Die zuvor ebenfalls durchgeführte Ko-Kultivierung von Gewebszellen stellt dabei eine weitaus sensitivere Nachweismethode für die virale Replikation in Geweben da. Deshalb wurde in diesem Fall auf die erneute Aufarbeitung sämtlicher Organe verzichtet und lediglich bei der Obduktion die Milz und ein Lungenflügel entnommen, um die virale Replikation der Mutanten mittels Ko-Kultivierung zu untersuchen. In diesen Organen konnte in früheren Publikationen eine Wildtyp-Virusreplikation nachgewiesen werden (Swack & Hsiung 1975; Brown *et al.*, 1982). Dabei führte auch diese Ko-Kultivierung des Milz- und Lungengewebes mit MRC-5-Zellen zu keinem Nachweis einer Virusreplikation. Jedoch konnte eine permanente Sezernierung von PFV-spezifischen Antikörpern über den Zeitraum von knapp 300 Tagen durch Applikation der PFV-Vektoren stimuliert werden. Dies könnte wiederum auf eine persistente Replikation der Mutanten hindeuten. Nähere Erläuterungen zu dieser Annahme wurden im Diskussionsteil formuliert.

3.4 Genetische Optimierung der PFV- Δ Bet-Vektoren

Die durchgeführten *in vivo* Experimente haben gezeigt, dass die bisher erstellten PFV-Mutanten über einen Zeitraum von rund 300 Tagen eine dauerhaft starke Immunantwort in Hamstern und Mäusen induzieren konnten. Dabei zeigte sich jedoch, dass die zuvor *in vitro* replizierende PFVmcs-Mutante *in vivo* eine schwache Stimulation des Immunsystems induzierte. Dagegen konnte bei der Mutanten PFV Δ bet eine mit dem PFV-Wildtyp vergleichbare Stimulation des Immunsystems beobachtet werden. Bei der Klonierung der Mutante PFVmcs wurde in die natürliche *SanDI*-Schnittstelle eine MCS eingefügt. Dabei wurden zehn Aminosäuren von Tas und Bet durch die Sequenz der MCS modifiziert. Diese Mutation lokalisierte sich am C-terminalen Ende von Tas bzw. im mittleren Bereich der Bet-Sequenz, wobei der *bet*-Leserahmen offen blieb. Da diese Modifikation die einzige genetische Veränderung des PFV-Genoms darstellte, musste diese Mutation die Beeinträchtigung der *in vivo* hervorrufen. In der Mutanten PFV Δ bet ist diese Mutation des *tas*-Leserahmens ebenfalls enthalten. Jedoch führte diese Substitution der Aminosäuren im Vergleich zum Wildtyp zu keiner Veränderung der stimulierten Immunantwort. Welche Mechanismen hinter diesen gegensätzlichen Beobachtungen stehen, konnte nicht hinreichend

geklärt werden. Es ist jedoch anzunehmen, dass die C-terminale Deletion im *bet*-Leserahmen mit der Aufrechterhaltung der Immunantwort in Zusammenhang steht. Nähere Ausführungen zu dieser These wurden im Diskussionsteil erläutert.

Die Ergebnisse des Tierversuchs deuten demnach darauf hin, dass die Substitution der letzten zehn Aminosäuren von Tas möglicherweise die Replikationskompetenz der PFV-Mutanten beeinträchtigt. Deshalb sollte die „naive Form“ von Tas rekonstruiert werden. Um die Sequenz von Tas wieder herzustellen, wurde zwischen den MCS-Schnittstellen *SanDI* und *KpnI* des Klonen pPFV Δ bet ein hybridisiertes Oligomer eingefügt (siehe Anhang S. XV; Oligomere Nr. o1 & o2), welche die natürliche Nukleinsäuresequenz von Tas rekonstruierte. Die Sequenzierung des resultierenden Vektors entsprach den theoretischen Vorgaben. Bei der Rekonstruktion von Tas wurde die MCS um wenige Basen strangabwärts verschoben. Somit lokalisierte sich die MCS direkt hinter dem Stoppsignal der *tas*-Sequenz. Der Aufbau der Nukleinsäuresequenz dieses modifizierten Bereichs ist in Abb. 9 illustriert. Die so modifizierte „MCS2“ wurde im Anhang S. XIV genauer dargestellt. Das optimierte Konstrukt erhielt die Kennzeichnung pPFcV-T0 (Vektorkarte siehe Anhang S. VII). Dabei steht „PFcV“ für *prototype foamy carrier virus* und „T0“ für Tas-naive.

Aufgrund der Ergebnisse der Infektionsversuche mit PFV Δ bet sollte der Austausch der Aminosäuren am Tas-Ende in den kommenden Versuchen erhalten bleiben, um eventuelle Unterschiede zwischen beiden Tas-Varianten experimentell untersuchen zu können. Problematisch war, dass die Klonierung eines Antigens in die MCS eine neue Aminosäuresequenz des mutierten Tas-Endes verursachen würde. Um diese Variable zu beseitigen, wurde die MCS erneut um wenige Basen strangabwärts verschoben. Dabei sollte jedoch die Sequenz des modifizierten Tas-Endes erhalten bleiben. Dies wurde über eine alternative Nukleotidsequenz bewerkstelligt, welche die Aminosäureabfolge des künstlich modifizierten Tas-Proteins unverändert rekonstruierte. Dafür wurde erneut über die MCS-Schnittstellen *SanDI* und *KpnI* ein Oligonukleotid-Fragment über die Oligomere Nr. o3 & o4 (Sequenz siehe Anhang S. XV) in das Plasmid pPFV Δ bet inkloniert. Die Sequenzierung des neuen Klons entsprach den theoretischen Vorgaben. Dieses neu generierte Konstrukt erhielt die Kennzeichnung pPFcV-T1 (Vektorkarte siehe Anhang S. VIII). Das in diesem Vektor enthaltene modifizierte Tas-Protein erhielt die Kennzeichnung „T1“ (*Tasm1*). In der nachfolgenden Abb. 9 sind die genetischen Modifikationen von pPFcV-T0 und pPFcV-T1 veranschaulicht.

10293 pb PFVwt; 10200 bp PFCV

| **SanDI**

1 PFVwt TTTGGGTCCCCCTCTGGGTCAGGTGAACATTCAGTTTTATAAGAATTATCAGATTCTAACTTGCTGTGCTCAGGCTGTAGACCCATTT
Tas L G P P S G S G E H S V L .

2 PFVmcs TTTGGGT-----CCC GGGTACCGCGTTCGAACCGGTCTCGAGTAAGAATTATCAG
Tasm1 L G ----- P G Y R V R T G L E .

3 PFVΔbet TTTGGGT-----CCC GGGTACCGCGTTCGAACCGGTCTCGAGTAAGCAGCTATGG
Tasm1 L G ----- P G Y R V R T G L E .

4 PFCV-T0 TTTGGGTCCCCCTCTGGGTCAGGTGAACATTCAGTTTTATAACCCGGGTACCGCGTTCGAACCGGTCTCGAGTAAGCAGCTATGG
Tas L G P P S G S G E H S V L .

5 PFCV-T1 TTTGGGTCCCGGTTATAGAGTTAGAACAGGACTGGAGTAA---CCC GGGTACCGCGTTCGAACCGGTCTCGAGTAAGCAGCTATGG
Tasm1 L G P G Y R V R T G L E .

6 PFCV-T2a TTTGGGTCCCCCTCTGGGTCAGGTGAACATTCAGTTTTACCCGGG CAGCTGTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACG
Tas2a L G P P S G S G E H S V L P G Q L L N F D L L K L A G D
 TCGAGTCCAACCCCTGGGCCCGGTACCGCGTTCGAACCGGTCTCGAGTAAGCAGCTATGG
 V E S N P G | P G T A F E P V S S K Q L W
 p2A cut

Abb. 9: Veranschaulichung der genetischen Optimierung der *Tas*-Sequenz der Mutanten PFCV-T0, -T1 und -T2a

Sequenz 1 zeigt die Nukleotidsequenz von PFVwt zwischen den Basen 10293 und 10378. In diesem Bereich befindet sich die natürliche *SanDI*-Schnittstelle (rot) und die letzten 42 Basen der *tas*-Sequenz. Unter dieser Sequenz wurden die entsprechenden letzten 13 AS des naiven *Tas*-Proteins aufgeführt. Sequenz 2 und 3 zeigen die Nukleotidsequenz von PFVmcs und PFVΔbet zwischen den Basen 10200 und 10250. In diesem Bereich wurde eine MCS (grau unterlegt) eingefügt. Darunter befindet sich die AS-Sequenz des jeweiligen *Tas*-Proteins. Die Sequenzen 4 bis 6 veranschaulichen die genetische Optimierung auf Nukleotid-Ebene der Vektoren pPFCV-T0, pPFCV-T1 und PFCV-T2a, im Bereich der MCS. Der grau unterlegte Bereich kennzeichnet die Lage der MCS innerhalb der PFCV-Mutanten. Unter der Nukleotidsequenz wurde die Aminosäuresequenz der jeweiligen *Tas*-Mutante aufgeführt. Der hervorgehobene Bereich in der *Tas2a* Sequenz markiert das 2A-Peptid des Maul- und Klauenseuche-Virus. Der senkrechte Strich markiert die Schnittstelle des 2A-Peptids.

Des Weiteren sollte in die beiden PFCV-Mutanten eine autokatalytische Peptidsequenz des Maul- und Klauenseuche-Virus (2A-Peptid) in den *bet*-Leserahmen eingefügt werden (Ryan *et al.*, 1991). Diese genetische Veränderung sollte die proteaseunabhängige Spaltung des Fusionsproteins „Bet-heterologes Antigen“ katalysieren. Dabei sollte untersucht werden, ob durch die Abspaltung des N-terminalen Teils von Bet unterschiedliche Immunreaktionen erzielt werden können. Diese Technik der proteaseunabhängigen Spaltung von Proteinen wurde bereits in früheren Publikationen beschrieben (Ryan & Drew, 1994; Schmidt & Rethwilm, 1995). Die Sequenz des 2A-Peptids wurde in die Klone pPFCV-T0 und pPFCV-T1 eingefügt. Dazu wurden erneut zwei

synthetisierte Oligonukleotidstränge Nr. o5 & o6 (Sequenz siehe Anhang S. XIV) hybridisiert und über die Schnittstellen *XmaI* und *KpnI* der MCS in den *bet*-Leserahmen eingefügt. Die Konstrukte erhielten die Kennzeichnungen pPFcV-T0a und pPFcV-T1a (Vektorkarten siehe Anhang S. IX, X). Durch das Einfügen der 2A-Sequenz wurde die verwendete MCS1 erneut modifiziert. Die modifizierte „MCS2A“ wurde im Anhang S. XIV genauer erläutert. Zusätzlich wurde ein weiteres Konstrukt erstellt, in dem das 2A-Peptid an den Leserahmen von *tas* angegliedert wurde. Hierfür wurden zwei weitere Oligonukleotidstränge Nr. o7 & o8 (Sequenz siehe Anhang S. XV) synthetisiert und zwischen die Schnittstellen *SanDI* und *KpnI* des Klons pPFcV-T0 eingesetzt. So wurde eine weitere Mutante generiert, welche theoretisch unter der Verwendung des *tas*-Leserahmens ein „Tas-2A-Antigen-Fusionsprotein“ synthetisieren sollte. Das so synthetisierte Tas-2A-Antigen-Fusionsprotein sollte theoretisch direkt bei der Translation durch die 2A-Schnittstelle prozessiert werden und die Quartärstruktur von Tas freigeben, wodurch die Funktion des Proteins theoretisch erhalten bleiben sollte. Dabei bleibt ein Teil des 2A-Peptids am Ende von Tas erhalten, wodurch das C-terminale Ende erneut modifiziert wurde (*Tas2a*). Dieses Konstrukt erhielt die Kennzeichnung pPFcV-T2a (Vektorkarte siehe Anhang S. XI). In Abb. 9 ist der Aufbau des modifizierten *Tas2a*-Proteins genauer erläutert. In der nachfolgenden Abb. 10 sind alle optimierten PFcV-Mutanten der sogenannten „zweiten Generation“ schematisch dargestellt.

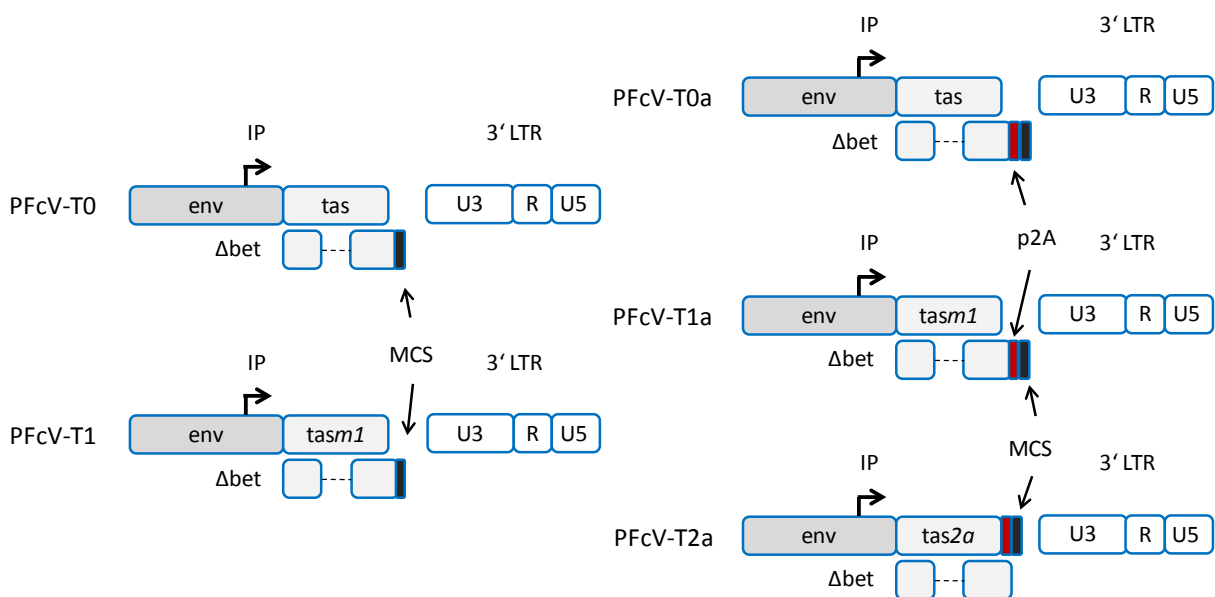


Abb. 10: Schematische Darstellung der genetisch optimierten PFcV-Mutanten PFcV-T0, -T1, -T0a, -T1a und -T2a

Diese schematische Darstellung zeigt den genetischen Aufbau der PFcV-Mutanten PFcV-T0, -T1, -T0a, -T1a und -T2a im Bereich zwischen dem *env*-Gen und der 3'LTR. Die Sequenzen im 5'Bereich des viralen Genoms blieben unverändert und

entsprechen dem Aufbau der Mutanten PFV Δ bet. Die Mutanten PFcV-T0 und -T1 unterscheiden sich lediglich durch die letzten 10 AS von Tas. Die Mutante PFcV-T0 beinhaltet die „naive Form“ des Tas-Proteins und die Mutante PFcV-T1 beinhaltet die mutierte *TasmI*-Variante (von PFV Δ mcs). Der dunkle Balken zeigt die Lage der MCS innerhalb der PFcV-Mutanten. In die Mutanten PFcV-T0 und -T1 wurde eine autokatalytische 2A-Peptid-Sequenz eingefügt. Daraus resultieren die Mutanten PFcV-T0a bis -T2a. Dabei kennzeichnet der rote Balken die Lage des 2A-Peptids innerhalb der PFcV-Mutanten. Bei der Mutante PFcV-T2a wurde die 2A-Sequenz in den Leserahmen von Tas eingefügt, wodurch ein Tas2A-Fusionsprotein synthetisiert werden soll.

Nach Abschluss der Klonierungsarbeiten erfolgte der qPCR-basierte Replikationsvergleich *in vitro* aller optimierten PFcV-Mutanten der „zweiten Generation“ (siehe Abb. 10). Dazu wurden erneut jeweils gleiche Mengen Plasmid-DNA in BHK-21-Zellen transfiziert. Zusätzlich erfolgte die Transfektion von PFVwt als Positivkontrolle (PK) oder Referenzvirus und PFV Δ del als Negativkontrolle (NK). Die Ergebnisse der qPCR sind in der nachfolgenden Abb. 11 aufgeführt.

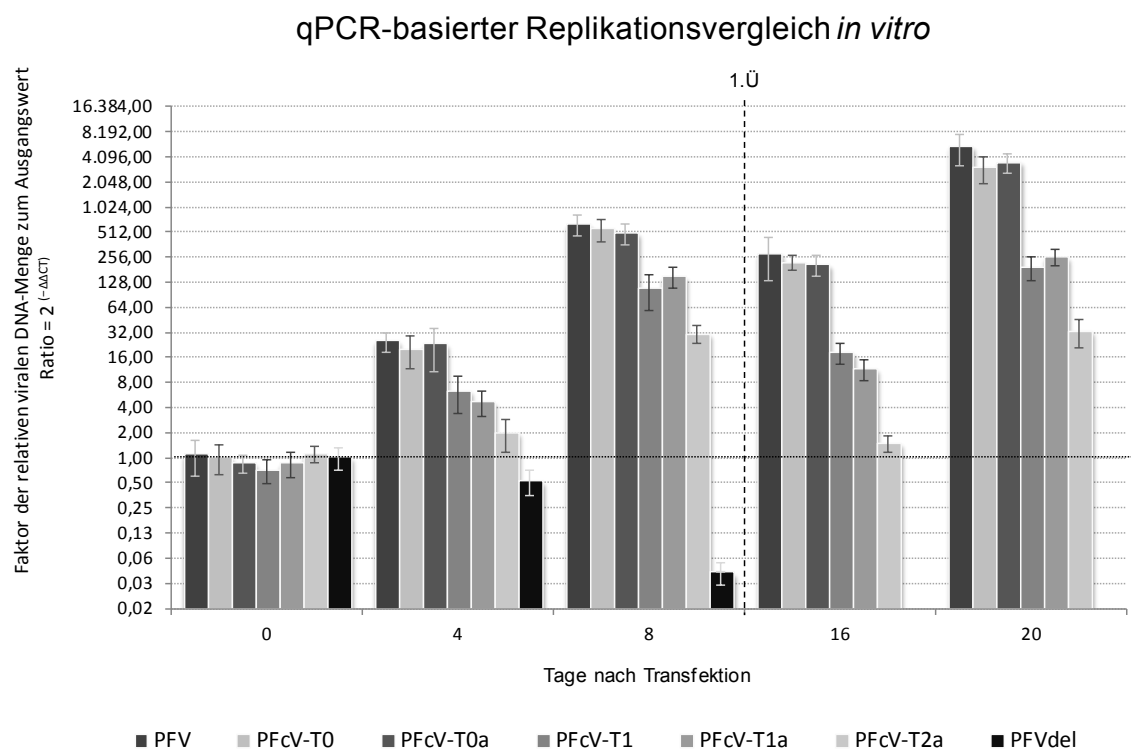


Abb. 11: Auswertung der Messergebnisse der qPCR des *in vitro* Replikationsvergleich von PFV mit den PFcV-Mutanten PFcV-T0, -T0a, -T1, -T1a und -T2a

Das Balkendiagramm zeigt die ausgewerteten Messdaten der qPCR des *in vitro* Replikationsvergleich von PFV mit den PFcV-Mutanten PFcV-T0, -T0a, -T1, -T1a und -T2a. Die Y-Achse zeigt den relativen DNA-Reproduktions-Faktor in Bezug auf die anfängliche DNA-Menge von PFVwt in der Probe nach Transfektion (t=0). Die dabei enthaltene DNA-Menge wird durch den Wert „Eins“ repräsentiert markiert durch eine waagerechte gestrichelte Linie. Die logarithmische Einteilung zur Basis 2 der Y-Achse, ergibt sich durch die Auswertung der Messreihe mit der Formel $\text{Ratio} = 2^{(-\Delta\Delta\text{CT})}$, welche in Folge logarithmische Messdaten produziert. Die X-Achse zeigt die Tage nach Transfektion. Die Balken eines Messdatums entsprechen der Bezeichnung, Farbe und Reihenfolge der Legende. Die mit „1Ü“ gekennzeichnete senkrechte gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt des Übertrags des infizierten Kulturmediums auf naive BHK-21-Zellen.

Das Diagramm zeigt die relative virale DNA-Menge in einer Probe in Bezug auf die anfängliche DNA-Menge von PFVwt zum Zeitpunkt „Null“. Im Laufe des Versuchs vermehrte sich die virale DNA-Menge der jeweiligen Mutanten im Verhältnis zur Effektivität der Replikation. Acht Tage nach Transfektion vermehrten sich die viralen DNA-Mengen von PFVwt, PFCV-T0 und PFCV-T0a durchschnittlich um den Faktor 560. Dagegen zeigten die Mutanten der *TasmI*-Variante (PFCV-T1 & PFCV-T1a) eine geringere Reproduktion der viralen DNA-Menge von durchschnittlich 130 Einheiten. Diese Messergebnisse bestätigen, dass durch die Rekonstruktion der naiven Tas-Variante die Replikationsgeschwindigkeit der entsprechenden PFCV-Mutanten optimiert werden konnte. Das Einfügen der autokatalytischen 2A-Peptidsequenz hatte keinen Einfluss auf die Replikationsgeschwindigkeit der Mutanten PFCV-T0 und -T1. Anders verhielt es sich bei der Mutanten PFCV-T2a, bei der das C-terminale Ende der Tas-Sequenz durch das Einfügen der 2A-Peptidsequenz erneut modifiziert wurde. Acht Tage nach Transfektion hatte sich die virale DNA-Menge der Mutante PFCV-T2a um den Faktor 31 erhöht. Diese Messdaten zeigen, dass durch die Modifikation des Tas-Proteins die Replikationsgeschwindigkeit deutlich reduziert wurde. Jedoch konnte durch Übertrag von zellfreien Kulturüberständen auf naive Zellen erneut eine Infektion durch die Mutanten in den Zellen etabliert werden. Dies spricht für den Erhalt einer funktionalen viralen Replikation. Bei den anderen optimierten PFCV-Mutanten konnte dies ebenfalls gezeigt werden. Somit konnten fünf replikationskompetente foamyvirale Vektoren mit unterschiedlichen Replikations- und Expressionseigenschaften generiert werden.

3.5 Nachweis der Hybridvirus-gesteuerten Antigen-Expression mittels GFP

Wie durch Schmidt & Rethwilm (1995) beschrieben, ist es möglich, durch gezielte genetische Modifikationen des Vektors pHSRV2 die Expression von Foamyvirus-fremden Proteinen unter der Kontrolle der viralen Replikation von PFV einzuleiten. In den nachfolgenden Experimenten sollte diese Funktionsweise der generierten replikationskompetenten PFCV-Vektoren untersucht werden. Die prinzipielle Funktionalität der Expression des Fremdanagens durch die generierten Mutanten sollte zunächst mit einer einfachen optischen Nachweismethode geprüft werden. Zu diesem Zweck wurde das grün-fluoreszierende Protein (GFP) der Seefedern Art *Renilla reniformis* in die MCS der PFCV-Vektoren eingefügt (Chalfie et al., 1994). Dabei wurden zunächst die drei Vektoren verwendet, welche eine autokatalytische 2A-Schnittstelle enthielten, wodurch die ungehinderte

Faltung des GFP-Proteins gewährleistet werden sollte. Gleichzeitig konnte die Funktionalität der 2A-Peptid-Prozessierung untersucht werden. In die Vektoren PFcV-T0a, T1a und T2a wurde unter Verwendung der MCS-Schnittstellen *KpnI* und *AgeI* ein PCR-synthetisiertes Genfragment eines speziell für Säugerzellen *codon*-optimiertes EGFP (*enhanced green fluorescent proteine*; Cormack et al., 1996) inkloniert. Für die PCR wurden die Primer Nr. 20 & 21 (siehe Anhang S. XV) verwendet. Zusätzlich wurde dem EGFP-Protein die Erkennungssequenz des monoklonalen 2F5-Antikörpers (ELDKWAS) N-terminalen angegliedert, um den Nachweis der Fremdgenexpression auch durch immunologische Methoden zu ermöglichen. Die erzeugten Hybridviren erhielten die Kennzeichnung „PFhV“ (*prototype foamy hybrid virus*). Nach Sequenzierung der Mutanten erhielten die GFP-Hybridviren die Kennzeichnung PFhV-T0a<GFP>, PFhV-T1a<GFP> und PFhV-T2a<GFP>. Um die variablen Expressionseigenschaften der PFhV-Vektoren zu veranschaulichen, ist die theoretische GFP-Expression der Vektoren in der nachfolgenden Abb. 12 schematisch dargestellt.

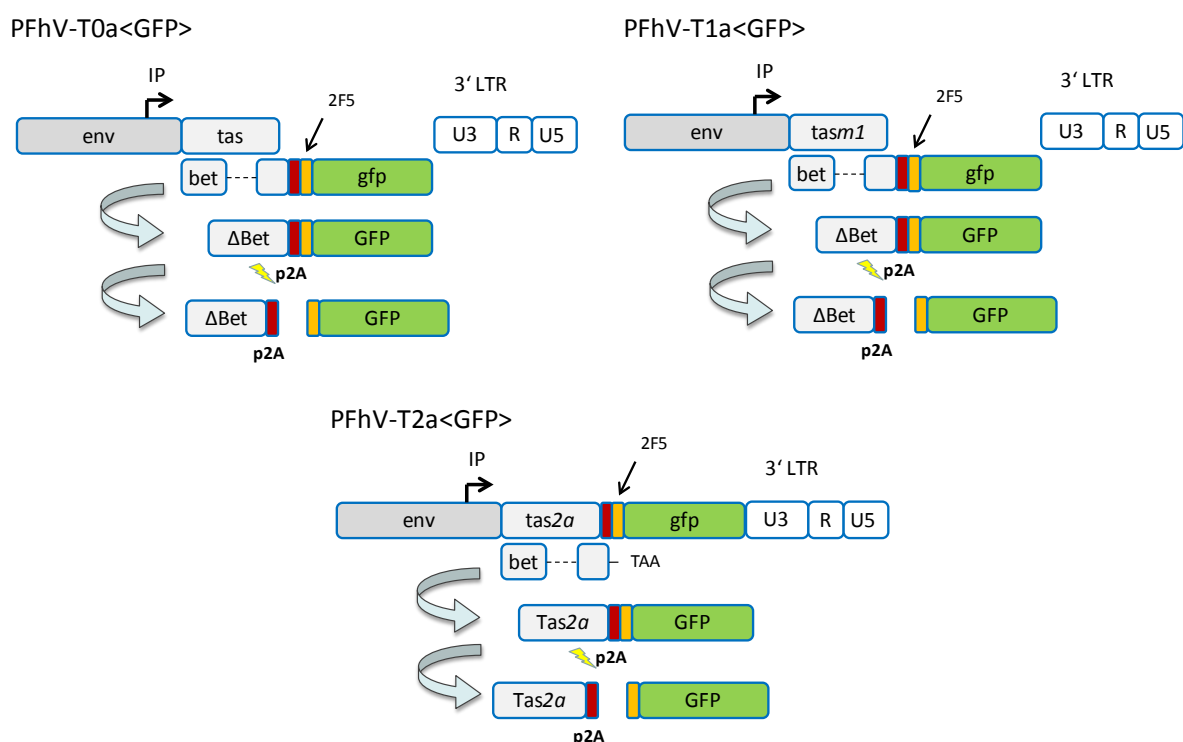


Abb. 12: Schematische Darstellung der Expression und post-translationalen Prozessierung von GFP durch die optimierten PFV-GFP-Hybridviren PFhV-T0a<GFP>, PFhV-T1a<GFP> und PFhV-T2a<GFP>

Zu sehen ist der genetische Aufbau der PFV-GFP-Hybridviren PFhV-T0a<GFP>, PFhV-T1a<GFP> und PFhV-T2a<GFP>, zwischen dem *env*-Gen und der 3'LTR. Der rote Balken markiert die Lage des 2A-Peptids im Genom der Hybridviren. Der gelbe Balken kennzeichnet die Lage des an das Antigen angegliederte 2F5-Epitops. Das *gfp*-Gen wurde grün gekennzeichnet. Der erste geschwungene Pfeil symbolisiert die Translation von viraler mRNA, wodurch das Fusionsprotein $\Delta\text{Bet-2A-2F5-GFP}$ synthetisiert wird. Der zweite Pfeil symbolisiert die Prozessierung des Fusionsproteins

durch die autokatalytische 2A-Schnittstelle in Δ Bet2a und 2F5-GFP. Im Fall von PFlV-T2a<GFP> wird nach der Translation ein Tas-2A-2F5-GFP-Fusionsprotein synthetisiert, welches ebenfalls durch die 2A-Schnittstelle in Tas2a und 2F5-GFP gespalten wird.

Anschließend wurde die Replikationskompetenz und Antigenexpression der erzeugten Konstrukte untersucht. Dazu wurden die Plasmide in BHK-21-Zellen transfiziert und regelmäßig unter dem Mikroskop auf CPE der Zellen und GFP-Expression untersucht. Nach 12 Tagen konnten erste grün fluoreszierende Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Dabei zeigten die PFlV-T0a<GFP>-infizierten Zellen die ersten Anzeichen für eine GFP-Expression. Diese waren in freien globulären Zellstrukturen, welche sich vom Boden der Zellkultur Flasche gelöst hatten, erkennbar. Mit zunehmender Verbreitung der Infektion konnte auch in adhärennten Zellen eine Expression des GFP-Proteins detektiert werden. Zusätzlich wurden die typischen zellmorphologischen Veränderungen der Zellen festgestellt. Die GFP-Expression und Zellveränderungen wurden dokumentiert. In Abb. 13 ist beispielhaft eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von PFlV-T0a<GFP>-infizierten BHK-21-Zellen aufgeführt.

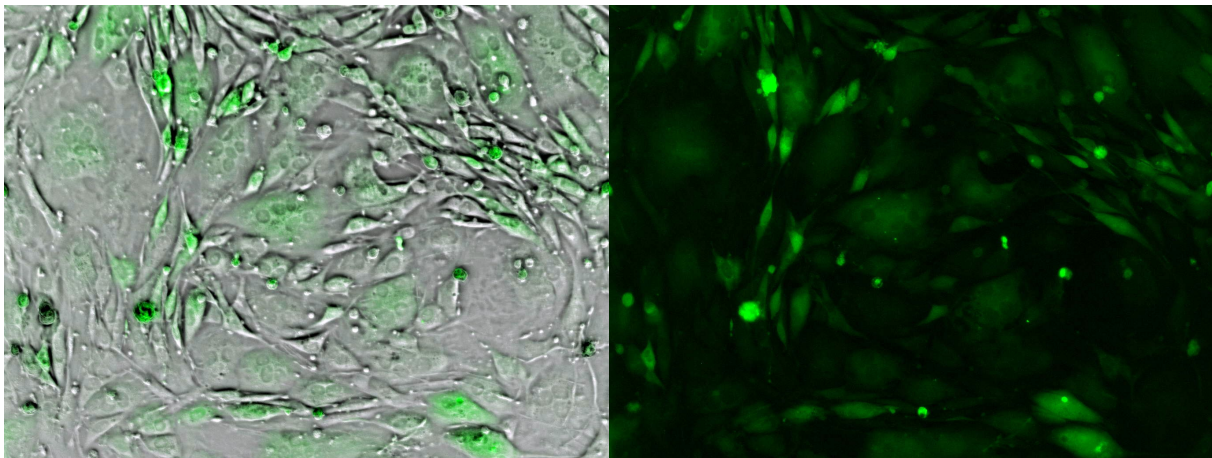


Abb. 13: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von PFlV-T0a<GFP>-infizierten BHK-21-Zellen

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (200-fache Vergrößerung) von PFlV-T0a<GFP>-infizierten BHK-21-Zellen, 20 Tage nach Infektion. Das linke Bild zeigt eine Durchlichtaufnahme, kombiniert mit der Aufnahme bei einer Anregungswellenlänge von 485nm. In dem Bild sind deutlich die infektionsbedingten Synzytien-Strukturen zu erkennen. In der Mitte befindet sich eine mehrkernige Synzytie, welche grün fluoresziert. Die kontrastreichen runden Strukturen in dem Zellverbund repräsentieren mehrere Zellkerne. Das rechte Bild zeigt die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des gleichen Ausschnitts.

Die Aufnahme wurde zu einem Zeitpunkt (20 Tage) durchgeführt, an dem die Infektion der Kultur sehr weit fortgeschritten war. Dies erkennt man an dem gehäuften Auftreten von Synzytien (Abb. 13 links). Gut ersichtlich ist auch, dass nahezu in jeder Zellstruktur GFP exprimiert wurde (Abb. 13

rechts). Von dieser Kultur wurde ein zellfreier Übertrag des Kulturmediums auf naive BHK-21-Zellen durchgeführt. Nach ca. zehn Tagen zeigten sich erneut die typische Degeneration der Zellstruktur sowie die Expression von GFP durch das Hybridvirus. Dadurch konnte die Freisetzung von funktionalen Viruspartikeln durch die Mutante P_{FhV}-T0a<GFP> angenommen werden.

In den P_{FhV}-T1a<GFP>-infizierten Zellen wurden vergleichbare Veränderungen festgestellt. Jedoch traten in diesem Versuch erst ca. 16 Tage nach Infektion erste grünfluoreszierende Zellstrukturen auf. In Abb. 14 sind P_{FhV}-T1a<GFP>-infizierte Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop gezeigt. Diese Aufnahmen wurden zum gleichen Zeitpunkt (20 Tage) erstellt wie die Bilder der Abb. 13.

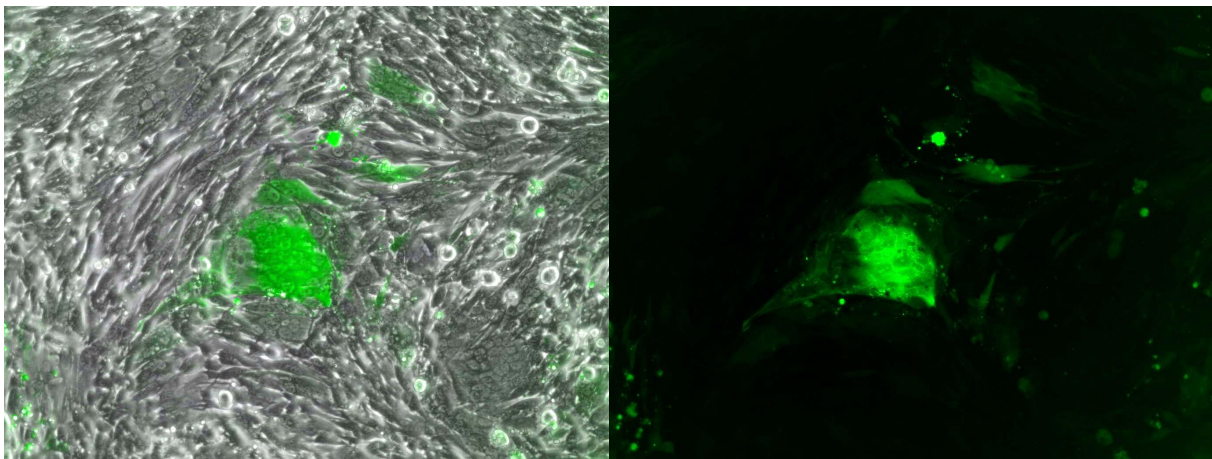


Abb. 14: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von P_{FhV}-T1a<GFP>-infizierten BHK-21-Zellen

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (200-fache Vergrößerung) von P_{FhV}-T1a<GFP>-infizierten BHK-21-Zellen, 20 Tage nach Infektion. Das linke Bild zeigt eine Durchlichtaufnahme, kombiniert mit der Aufnahme bei einer Anregungswellenlänge von 485nm. In dem Bild sind wenige infektionsbedingte Synzytien-Strukturen zu erkennen. In der Mitte und am unteren rechten Rand befinden sich mehrkernige Synzytien, wobei nur die mittlere eine Fluoreszenz aufweist. Das rechte Bild zeigt die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des gleichen Ausschnitts.

Zu diesem Zeitpunkt waren nur wenige Synzytien-Strukturen und GFP-Signale erkennbar, was auf eine verlangsamte Replikation hindeutete. In dem linken Bild kann bei der Mehrzahl der Zellen eine intakte Zellmorphologie beobachtet werden. In der Mitte dieses Bildes und am rechten unteren Rand konnten Zellverbunde gezeigt werden, welche die typische CPE-Morphologie eingenommen hatten. Dabei weist die mittlere Zellstruktur eine deutliche GFP-Expression auf. In dem rechten Bild sind weitere GFP-exprimierende Zellen deutlicher zu erkennen. Diese Kultur zeigte nach einigen weiteren Zellpassagen ähnliche Formationen, wie sie in Abb. 13 aufgeführt sind. Zu diesem Zeitpunkt wurde ein ebenfalls zellfreier Übertrag des Kulturmediums auf naive

Zellen überführt, um die Virulenz des Überstands zu prüfen. Auch diese Mutante war in der Lage, durch den Übertrag naive Zellen zu infizieren. Es konnte nach 14 Tagen erneut die Expression von GFP detektiert werden.

Die PFhV-T2a<GFP>-infizierte Kultur zeigte im Gegensatz zu PFhV-T1a<GFP> eine stark eingeschränkte Replikation. In dieser Kultur konnten erst ca. 20 Tage nach Infektion erste Hinweise auf eine GFP-Expression festgestellt werden. Auch diese Kultur zeigte nach zwei weiteren Zellpassagen eine weitgehende Durchseuchung der Kultur, welche durch eine verbreitete GFP-Expression angenommen wurde. Dabei konnte eine auffällige Veränderung bei der Lokalisation der GFP-Moleküle in den Zellen festgestellt werden. Einige infizierte Zellen zeigten im Vergleich zum Zellplasma eine konzentriertere Anhäufung von GFP-Molekülen in den Zellkernen. In Abb. 15 ist diese Beobachtung illustriert.

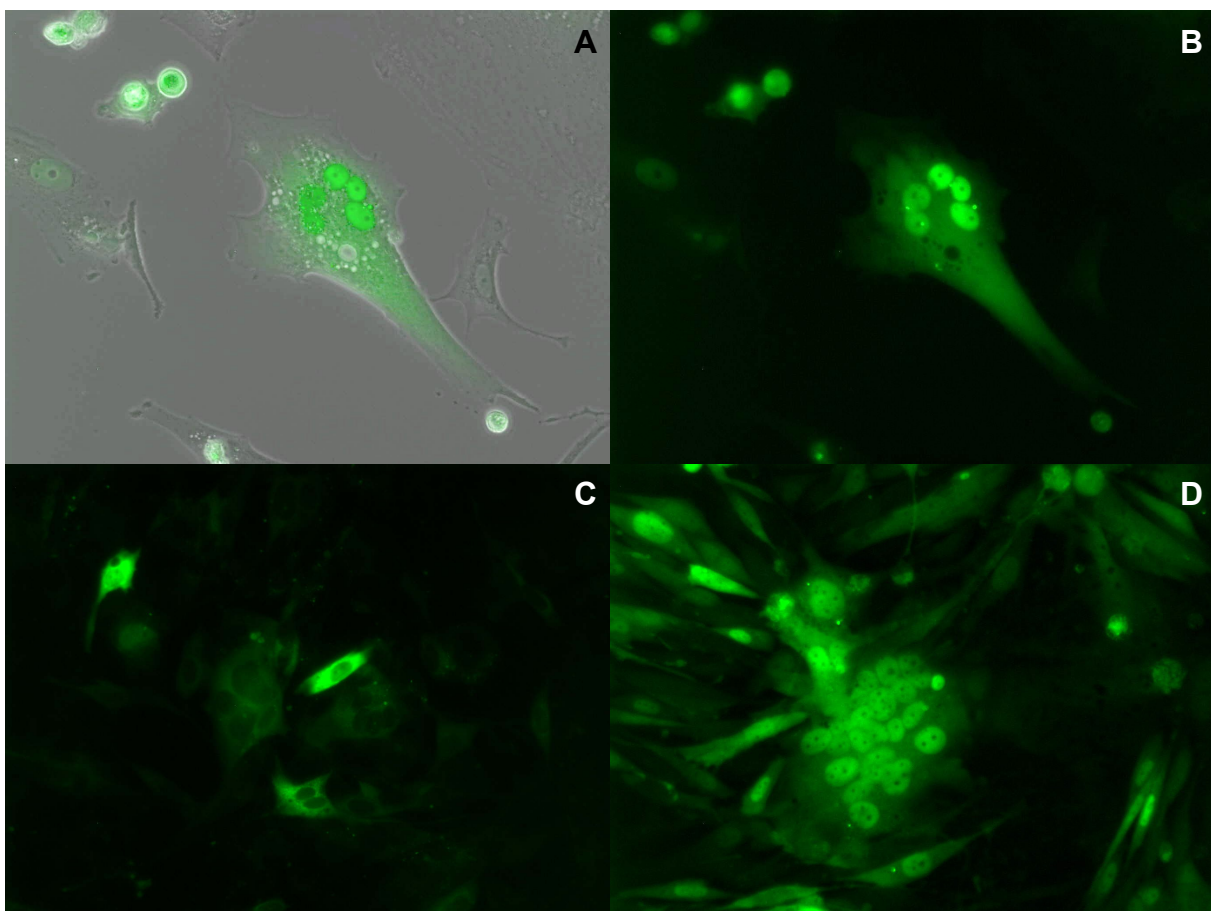


Abb. 15: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von PFhV-T2a<GFP>-infizierten BHK-21-Zellen

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (400-fache Vergrößerung) A, B und D zeigen PFhV-T2a<GFP>-infizierte BHK-21-Zellen. Aufnahme C zeigt die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (400-fache Vergrößerung) von PFhV-T0a<GFP>-infizierten Zellen. Aufnahme A zeigt eine Durchlichtaufnahme, kombiniert mit der Aufnahme B. Es ist eine mehrkernige Synzytie dargestellt, die durch die Fusion von fünf infizierten BHK-Zellen entstanden ist. In der Aufnahme

B und D ist zu erkennen, dass in PFhV-T2a<GFP>-infizierten Zellen das GFP hauptsächlich in den Zellkernen lokalisiert ist. Im Vergleich dazu zeigten PFhV-T0a<GFP>-infizierte Zellen eher eine zytoplasmatische GFP-Lokalisation (C).

In Abb. 15A und B ist eine mehrkernige Synzytie einer PFhV-T2a<GFP>-infizierten Kultur aufgeführt. Abb. 15A zeigt eine Durchlichtaufnahme, kombiniert mit der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme B desselben Sichtfeldes. Innerhalb der Zellkerne ist im Vergleich zum umliegenden Plasma ein deutlich verstärktes GFP-Signal zu erkennen. Diese Kernlokalisierung der GFP-Moleküle konnte nur bei PFhV-T2a<GFP>-infizierten Zellen beobachtet werden. Abb. 15D zeigt ebenfalls PFhV-T2a<GFP>-infizierte Zellen mit stark fluoreszierenden Zellkernen. Dagegen lokalisierten sich die GFP-Moleküle in PFhV-T0a<GFP>- und PFhV-T1a<GFP>-infizierten Zellen vorwiegend im zytoplasmatischen Teil der Zellen. In den Zellkernen dagegen konnte kaum ein Signal detektiert werden (dunkle Flecken innerhalb der grünen Zellstrukturen in Abb. 15C). Der offensichtlich virusvermittelte Kerntransport der GFP-Moleküle könnte auf die Tas-abhängige GFP-Expression von PFhV-T2a<GFP> zurückgeführt werden. Welche Mechanismen die Kernlokalisierung der GFP-Moleküle verursacht haben könnten wurde im Diskussionsteil näher erörtert. Anschließend sollte die Freisetzung von funktionalen Viruspartikeln durch die Mutante PFhV-T2a<GFP> überprüft werden. Dazu wurde abermals ein zellfreier Übertrag des infektiösen Zellkulturüberstands auf naive BHK-21-Zellen durchgeführt. Nach einigen Zellpassagen konnte auch in dieser Kultur die Expression von GFP und die Deformierung der Zellstrukturen induziert werden. Somit konnte die Funktionalität der Virionen von Mutante PFhV-T2a<GFP> gezeigt werden.

Die GFP-Expression durch das replizierende Vektor-Expressions-System sollte durch eine zweite Methode verifiziert werden. Dabei sollte das virusfremde Protein mittels Western Blot in den Zelllysaten von infizierten Zellen nachgewiesen werden. Über das angegliederte 2F5-Epitop aus dem HIV-Protein gp41TM, sollte das modifizierte 2F5-GFP durch den monoklonalen 2F5-Antikörper immunologisch nachweisbar sein. In allen GFP-positiven Zellproben konnte der immunologische Nachweis der GFP-Expression über das angegliederte 2F5-Epitop geführt werden. Gleichzeitig konnten mittels eines mit PFVwt-infizierten Hamsterserums virale PFV-Proteine in den infizierten Zelllysaten nachgewiesen werden. In der nachfolgenden Abb. 16 ist exemplarisch ein Western Blot zum Nachweis von 2F5-GFP und viraler PFV-Proteine aufgeführt.

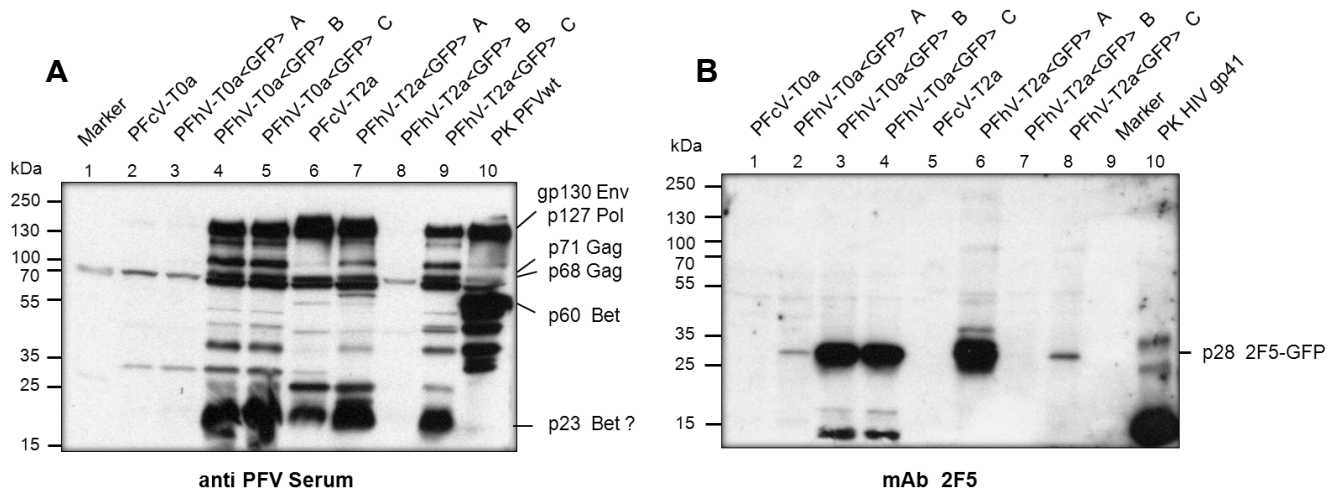


Abb. 16: Western Blot zum Nachweis von viralen PFV-Proteinen und 2F5-GFP in PfhV-T0a<GFP>- und PfhV-T2a<GFP>-infizierten BHK-21-Zellen

Aufnahme A und B zeigt den Western Blot von PfhV-T0a<GFP>- und T2a<GFP>-infizierten BHK-21-Zelllysaten. Der Probenauftrag wurde in der Abbildung aufgeführt. Die Probenmarkierungen A, B, C indizieren verschiedene Zeitpunkte nach Infektion. Alle Proben enthielten dieselbe Proteinmenge. Abb. A zeigt den immunologischen Nachweis foamy-viraler Proteine mit einem Immunsereum eines PFV-infizierten Hamsters in der Verdünnung 1:750. Anhand der Markerbanden (links) wurden die Proteinbanden gp130 Env, p127 Pol, p71/68 Gag und p60 Bet der PFVwt-Kontrolle (Spur 10) markiert. Die markierte p23Bet-Bande in Spur 4, 5, 6, 7 und 9 repräsentiert vermutlich das verkürzte Δ Bet-Protein der PFCv-Mutanten. Abb. B zeigt den immunologischen Nachweis des 2F5-Epitopes in den zu Abb. A äquivalenten Zelllysaten. Dabei konnte das 2F5-GFP-Protein in einzelnen Zelllysaten nachgewiesen werden. Die Bande wurde rechts markiert. Spur 10 zeigt die 2F5-Positivkontrolle gp41 HIV.

In Abb. 16A wurden verschiedene Zelllysate von PfhV-T0a<GFP>- und PfhV-T2a<GFP>-infizierten Zellen auf die Anwesenheit von viralen PFV-Proteinen getestet. Zum Vergleich wurden Zelllysate der Basis-Viren PFCv-T0a und PfhV-T2a sowie eine PFVwt-PK mitgeführt. Das PFVwt-Zelllysate befindet sich in Spur 10. Das Bandenmuster wurde nach Lindemann & Göpfert (2003) markiert. Vermutlich konnten die Proteine gp130 Env, p127 Pol, p71/68 Gag und p60 Bet detektiert werden. Die mit p23 Bet markierte Bande repräsentiert vermutlich das verkürzte Δ Bet-Protein der PFCv-Mutanten. Für einen spezifischen Nachweis standen jedoch keine Antikörper zur Verfügung. Es wurden Proben zu verschiedenen Infektionsphasen gewählt, um die Spezifität des Immunsereums zu zeigen. Die Bande in Spur 1 stellt vermutlich eine Kreuzreaktion des Immunsereums gegen das 70 kDa-Markerprotein dar. In Spur 2 und 3 wurden Zelllysate der gekennzeichneten Mutanten zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion aufgetragen. Nur wenige virale Proteine wurden gebildet. Die 71 kDa-Bande repräsentiert vermutlich das Vorläufer-Gag-Protein. Spur 4 zeigt PfhV-T0a<GFP>-infizierte BHK-21-Zellen zu einer späten Phase der Infektion. Es konnten eine Reihe von viralen Proteinen nachgewiesen werden. Spur 5 zeigt infizierte Zellen zu einer späten Phase der

Infektion nach dem ersten zellfreien Virusübertrag. Es sind identische Bandenmuster zu erkennen. Spur 6 zeigt das Bandenmuster des Basis-Vektors PFCV-T2a zu einer späten Phase der Infektion. Spur 7-9 zeigt die *Tas2a*-Mutante PFhV-T2a<GFP> zu einer frühen und späten Infektionsphase. Dabei zeigen Spur 8 und 9 infizierte Zellen zu einer frühen und späten Infektionsphase nach dem ersten zellfreien Virusübertrag. In allen Proben konnten PFV-Proteine detektiert werden.

In dem WB Abb. 16B wurden die gleichen Zelllysate auf die Anwesenheit von 2F5-GFP getestet. Der Auftrag erfolgte in gleicher Reihenfolge. Zur Detektion wurde der monoklonale 2F5-Antikörper verwendet. Als Positivkontrolle wurde in Spur 10 das Protein gp41TM von HIV-1 aufgetragen. In den Zelllysaten der Basis-Vektoren (Spur 1 & 5) konnte keine Bindung des 2F5-AK gezeigt werden. Dadurch konnte die Spezifität des 2F5-AK bewiesen werden. In den Spuren 2, 3, 4, 6 und 8 konnte eine Bindung des 2F5-AK an das 2F5-GFP gezeigt werden. Diese Ergebnisse haben eindeutig bewiesen, dass die virusvermittelte Fremdgenexpression durch die optimierten PFCV-Mutanten induziert und kontrolliert wurde. Dabei konnte der Übertrag von virulentem Zellkulturüberstand auf naive Zellen eine erneute Expression von GFP *in vitro* einleiten, wodurch die Bildung von funktionalen Virionen und die horizontale Weitergabe der heterologen Erbinformation durch Infektion bewiesen werden konnte.

3.6 Konstruktion von HIV- und Prostata-Antigen-exprimierenden PFV-Vakzinen

In den nachfolgenden Experimenten sollte das Prostata-Stammzell-Antigen hPSCA (Reiter *et al.*, 1997) und ein HIV-CTL-multi-Epitop-String (H-Protein) - welcher von T. Hanke entwickelt wurde (Hanke *et al.*, 1998a) - in die erstellten Basisviren PFCV-T0, -T1, -T0a und -T1a eingefügt werden, um das entwickelte PFV-Vektor-Expressions-System auf seine Anwendbarkeit als Immunstimulator zu prüfen. Die Mutante PFCV-T2a erschien aufgrund ihrer stark eingeschränkten Replikationsgeschwindigkeit für spätere Tierversuchsexperimente nicht geeignet. Deshalb wurde diese Mutante in die folgenden Experimente nicht miteinbezogen. Die DNA-Sequenzen der Antigene hPSCA und „H-Protein“ wurden unter Verwendung der PCR-Primerpaare Nr. 17/18 und 22/23 (siehe Anhang S. XV) sowie des entsprechendem *templates* mittels Standard-PCR synthetisiert und nachfolgend aufgereinigt. Anschließend erfolgte die Klonierung der DNA-Fragmente in den Δbet -Leserahmen der Basisviren PFCV-T0 & PFCV-T1 über die MCS-Schnittstellen *KpnI/AgeI* (hPSCA) und *XmaI/XhoI* (H-Protein). Dabei wurde den Antigensequenzen erneut ein 2F5-Epitop N-terminal

angegliedert, um den immunologischen Nachweis zu vereinfachen. Anschließend wurden die Vektoren sequenziert und erhielten die Kennzeichnungen pPFhV-T0<PSCA>, pPFhV-T0<CTL> (Vektorkarte im Anhang S. XII), pPFhV-T1<PSCA> und pPFhV-T1<CTL>. In Abb. 17 ist eine schematische Darstellung der erzeugten Hybridviren aufgeführt.

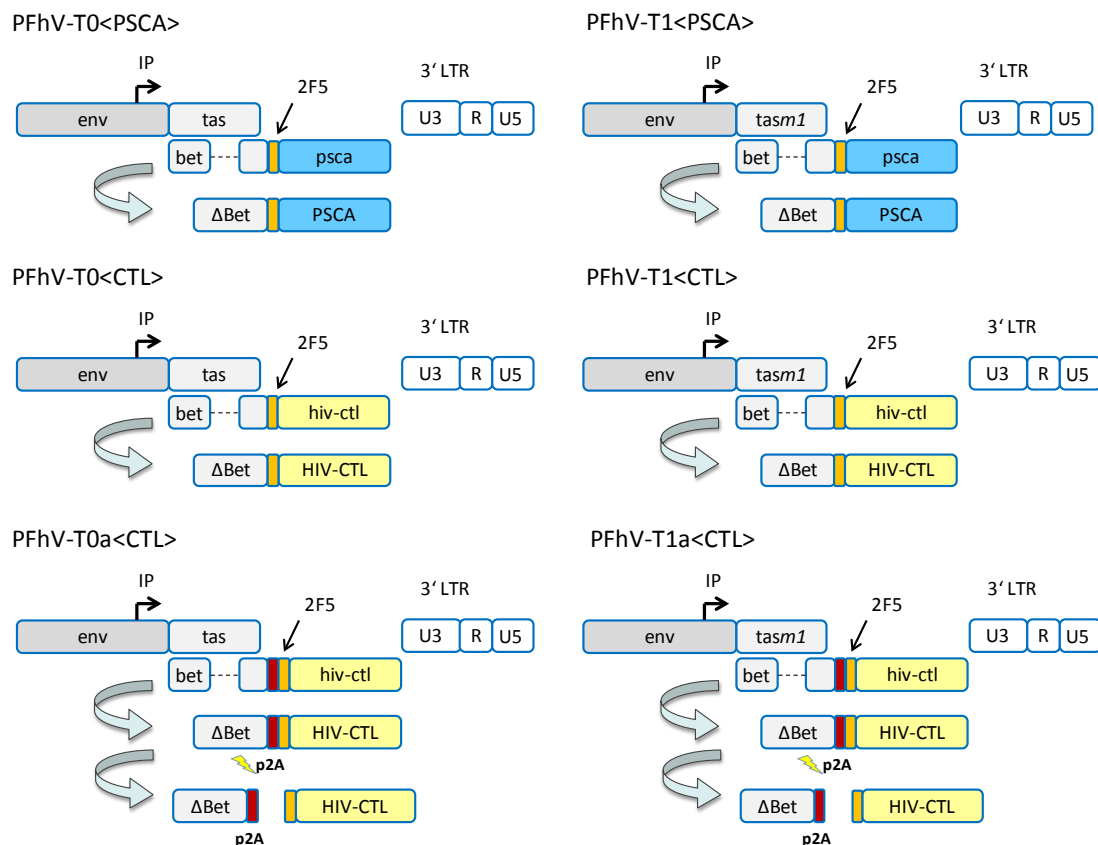


Abb. 17: Schematische Darstellung der Antigenexpression durch die PSCA- und HIV-CTL-PFV-Hybridviren

Die Darstellung zeigt schematisch den genetischen Aufbau der PSCA- und HIV-CTL-PFV-Hybridviren. Gleichzeitig wurde die virusvermittelte Expression und 2A-Prozessierung der Antigene hPSCA (blau) und HIV-CTL (hell gelb) schematisch dargestellt. Allen Antigenen wurde ein 2F5-Epitop (gelb) N-terminal angegliedert. Bei den ersten vier Mutanten führt die Translation der viralen mRNA zur Bildung eines Δ Bet-2F5-PSCA- bzw. Δ Bet-2F5-H-Protein-Fusionsproteins (symbolisiert durch den geschwungenen Pfeil). Die Mutanten PFhV-T0a<CTL> und PFhV-T1a<CTL> resultieren aus den Basisvektoren PFcV-T0a und PFcV-T1a. Der erste geschwungene Pfeil symbolisiert die Translation von viraler mRNA, wodurch das Fusionsprotein Δ Bet-2A-2F5-Antigen synthetisiert wird. Der zweite Pfeil symbolisiert die Prozessierung der 2A-Schnittstelle (rot), wodurch das Fusionsprotein in die Teile Bet-2A und 2F5-Antigen gespalten wird.

Die erstellten Hybridviren wurden in BHK-21-Zellen transfiziert, um die Replikationsfähigkeit und Antigenexpression der viralen Vektoren zu prüfen. Es konnte erneut durch alle Vektoren typische CPE *in vitro* induziert werden. Von den infizierten Zellen wurden Proteinproben gewonnen und mittels Western Blot auf die Anwesenheit eines 2F5-Epitops untersucht. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die HIV-CTL-Epitop-Hybridviren ein Fusionsprotein Δ Bet-2F5-H-Protein in den

infizierten Zellen exprimieren konnten. Jedoch zeigten die mit PSCA modifizierten Mutanten keine Expression eines 2F5-Epitops, was auf eine fehlerhafte Antigenexpression hindeutete. Auch die mehrfache Abnahme von Zellproben zu verschiedenen Infektionsstadien führte zu keinem Nachweis der Antigenexpression durch die PSCA-Hybridviren. Dadurch wurde angenommen, dass die Expression des Prostata-Stammzell-Antigens durch das entwickelte Vektorsystem nicht möglich war. Deshalb wurde von der weiteren Verwendung des PSCA-Antigens in den folgenden Klonierungsschritten abgesehen. Nähere Erläuterungen hierzu wurden im Diskussionsteil aufgeführt. Nachdem die funktionelle Antigenexpression der Hybridviren PFhV-T0<CTL> und PFhV-T1<CTL> gezeigt werden konnte, erfolgte die Klonierung dieses H-Proteins in die 2A-Peptid-Basisviren PFcV-T0a und PFcV-T1a. Hierfür wurde über eine PCR (Primerpaar Nr. 24/23; Anhang S. XV) die Schnittstellen *ApaI/XhoI* sowie ein 2F5-Epitope an die Sequenz des Antigens angefügt und in den *Δbet2a*-Leserahmen der Basisviren inkloniert. Die Sequenzierung der Mutanten ergaben eine 100%ige Übereinstimmung mit der Sollsequenz. Die so erzeugten Vektoren erhielten die Kennzeichnung pPFhV-T0a<CTL> und pPFhV-T1a<CTL> (schematische Darstellung siehe Abb. 17).

Nachdem die Klonierungsarbeiten zu den Antigen-exprimierenden Hybridviren abgeschlossen waren, sollte die genetische Stabilität der Vektoren und die damit in Verbindung stehende Antigenexpression über mehrere zellfreie Passagen von Virusüberständen im Langzeitexperiment untersucht werden. Dazu erfolgte die parallele Transfektion aller Vektoren der „zweiten Generation“ (pPFcV-T0 - pPFhV-T1a<CTL>) plus pHSRV2/13 (PK) und PFVdel (NK) in BHK-21-Zellen. Die genetische Stabilität der Vektoren sollte über einen Zeitraum von fünf zellfreien Virusüberträgen auf naive Zellen untersucht werden. Nach dem zellfreien Übertrag des Zellkulturmediums konnte bei allen Mutanten der Versuchsreihe eine Induktion von Foamyvirus-typischen zytopathischen Effekten beobachtet werden. Nach dem fünften zellfreien Virusübertrag auf naive Zellen wurde das Experiment beendet (68 Tage nach Transfektion) und es wurden Zellproben für den PCR-Nachweis und immunologischen Nachweis entnommen. Der Nachweis der genetischen Stabilität der Hybridviren erfolgte zunächst auf Pro-Virusebene. Dabei wurde lediglich der für die Antigenexpression relevante Bereich zwischen dem *tas*-Gen und der 3'LTR mittels PCR und Sequenzierung der PCR-Produkte untersucht. Mittels Standard-PCR, unter Verwendung der PCR-Primer Nr. 25 & 26 (siehe Anhang S. XV), wurden PCR-Produkte des entsprechenden Bereichs aus den Zelllysaten infizierter Zellen (68 Tage nach Transfektion) erstellt und mittels Gelelektrophorese analysiert. Die Ergebnisse dazu sind nachfolgend in Abb. 18 aufgeführt.

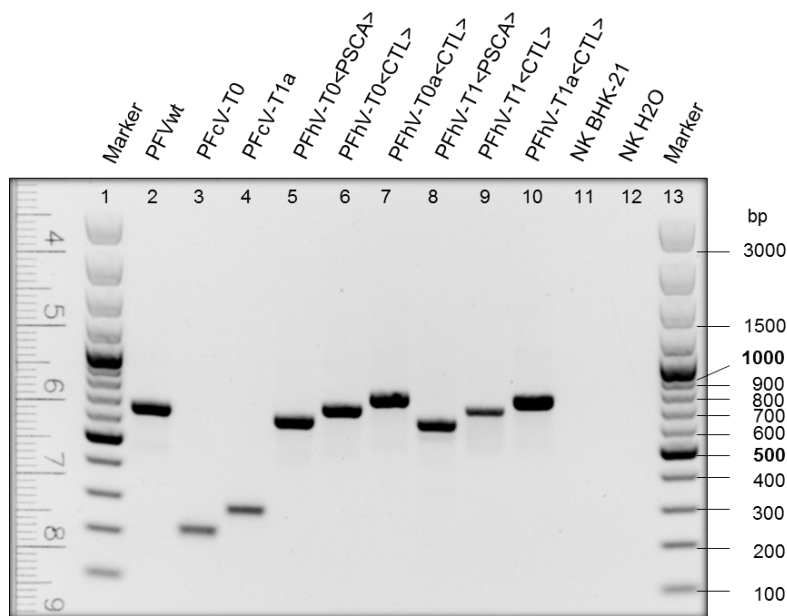


Abb. 18: PCR Nachweis der genetischen Stabilität der PSCA- und HIV-Impfvektoren

Diese Aufnahme einer Gelelektrophorese zeigt die Ergebnisse der Nachweis-PCR zur genetischen Stabilität der PFhV-Impfvektoren, 68 Tage nach Transfektion. Die einzelnen DNA-Fragmente repräsentieren den genetisch modifizierten Bereich, zwischen dem *tas*-Leserahmen und der 3'LTR der jeweiligen PFV-Mutanten, welche durch eine Nachweis PCR auf infizierten BHK-21-Zelllysaten synthetisiert wurden. Die Proben-Beladung der Geltaschen wurde über dem Bild eingetragen. Die Beschriftung der Markerbanden befindet sich rechts in der Abbildung.

Abb. 18 zeigt die Ergebnisse der Gelelektrophorese zur Nachweis-PCR der genetischen Stabilität der einzelnen PFhV-Mutanten 68 Tage nach Infektion und fünf zellfreien Virusüberträgen. Spur 2 beinhaltet das DNA-Fragment des PFVwt (616 bp). Spur 11 und 12 zeigt die PCR-Negativkontrollen BHK-21-Zelllysate und ddH₂O. Spur 3 und 4 zeigen die synthetisierten DNA-Fragmente aus den infizierten Zelllysaten der Basis-Vektoren PFcV-T0 und PFcV-T1a. Dabei ist die theoretische Größe der jeweiligen DNA-Fragmente 204 bzw. 270 bp. Der Größenunterschied der beiden Fragmente resultiert aus der eingefügten *2a*-Sequenz des Klons PFcV-T1a. Die Laufspuren 5 bis 7 beinhalten die amplifizierten PCR-Produkte aus den Zelllysaten, welche mit den Hybridviren PFhV-T0<PSCA> (588 bp), PFhV-T0<CTL> (652 bp) und PFhV-T0a<CTL> (716 bp) infiziert waren. Die Spuren 8 bis 10 beinhalten die dazu äquivalenten Amplifikate der Hybridviren des *Tasm1*-Basisvirus PFcV-T1. Die Größen der resultierenden DNA-Fragmente entsprechen den Größen der *Tas*-naiv-Hybridviren minus jeweils 3bp. Das Gel-Bandenmuster entsprach den erwarteten theoretischen Größen und lieferte somit keinen Hinweis auf eine genetische Degeneration der Erbinformation der Hybridviren nach 68 Tagen Replikation *in vitro*. Um die DNA-Fragmente auf molekularer Ebene zu untersuchen wurden die Amplifikate extrahiert und sequenziert. Die dabei erzielten Ergebnisse bestätigten die 100%ige Übereinstimmung mit der Ausgangssequenz der jeweiligen Mutanten. Somit konnte die genetische Stabilität aller Hybridviren auf Pro-Virusebene über einen Zeitraum von 68 Tagen nach fünf zellfreien Virusüberträgen bewiesen werden.

Anschließend erfolgte der Stabilitätsnachweis der Antigenexpression auf Proteinebene. Dafür wurden die Zellproben der letzten Abnahme mittels Western Blot auf die Anwesenheit eines 2F5-Epitops geprüft. Zusätzlich wurden die Zellysate mit einem PFVwt-infizierten Hamsterserum auf die Anwesenheit von foamyviralen Proteinen getestet. Die Ergebnisse des Western Blots wurden in Abb. 19 aufgeführt. Diese Ergebnisse wurden mit Hilfe von Frau Laura Schneider im Rahmen ihrer Bachelorarbeit erstellt.

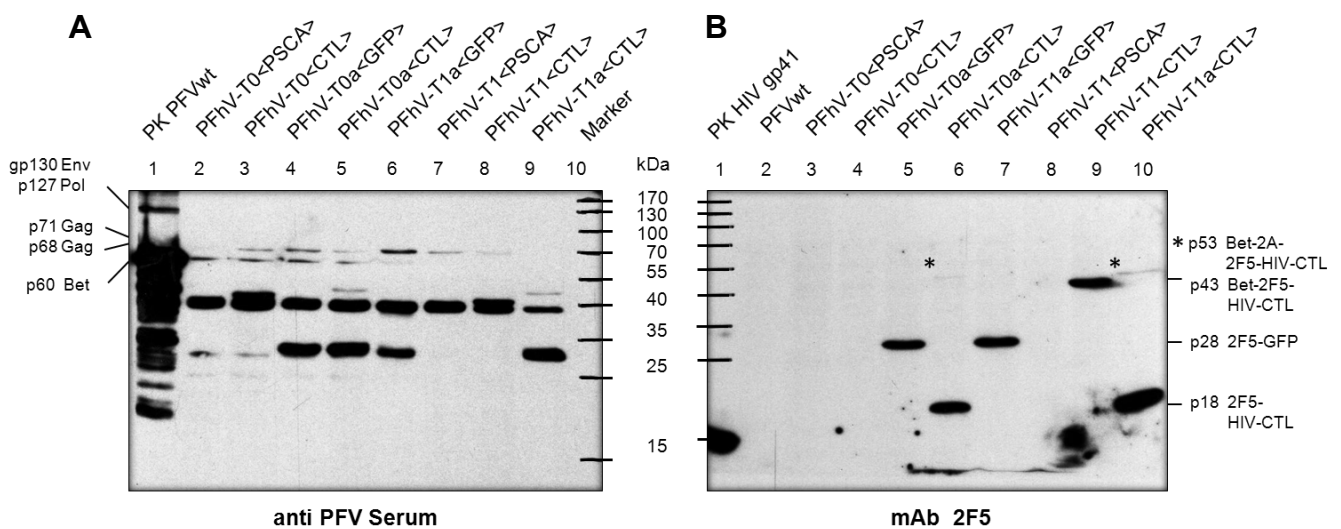


Abb. 19: Western Blot zum Nachweis von viralen PFV-Proteinen und der Antigen GFP, PSCA und HIV-CLT-Epitop in den Zellysaten infizierter BHK-21-Zellen (Quelle: Laura Schneider)

Die Aufnahmen A und B zeigen den Western Blot von BHK-21-Zellysaten, welche vor 68 Tagen mit den optimierten PFhV-Vektoren infiziert wurden. Der Probenauftrag der SDS-PAGE wurde in der Abbildung aufgeführt, wobei alle Proben die gleiche Proteinmenge aufweisen. Abb. A zeigt den immunologischen Nachweis foamyviraler Proteine mit einem Immunsereum eines PFVwt-infizierten Hamsters (Verdünnung 1:750). Anhand der Markerbanden (mitte) wurden die Proteinbanden gp130 Env, p127 Pol, p71/68 Gag und p60 Bet des PFVwt-Zellysates (Spur 1) markiert. Abb. B zeigt den immunologischen Nachweis des 2F5-Epitops mit dem mAb 2F5 in den zu A äquivalenten Zellysaten. Dabei konnte das 2F5-GFP-Protein (Spur 5 & 7), das 2F5-H-Protein (Spur 6 & 10) und dass Δ Bet-2F5-H-Protein-Fusionsprotein nachgewiesen werden. Die entsprechenden Banden wurden rechts markiert. Zusätzlich konnte eine schwache Bande in der Höhe der 55kDa-Markerbande (*) in den Spuren 6 & 10 gezeigt werden. Vermutlich handelt es sich hierbei um das unprozessierte Fusionsprotein Δ Bet-2A-2F5-H-Protein. In Spur 3 und 8 konnte keine Expression eines Δ Bet-2F5-PSCA-Proteins nachgewiesen werden. In Spur 4 konnte ebenfalls kein 2F5-Epitop nachgewiesen werden. Die Ursache hierfür konnte nicht geklärt werden. Spur 1 zeigt die 2F5-Positivkontrolle gp41 HIV.

Abb. 19A zeigt den Western Blot von infizierten Zellysaten, welche auf die Anwesenheit von foamyviralen Proteinen unter Verwendung eines Hamster-Immunsereums getestet wurden. Spur 1 zeigt ein PFVwt-infiziertes Zellysat. Es wurden die Proteinbanden gp130 Env, p127 Pol, p71/p68 Gag und p60 Bet gemäß den Ausführungen von Lindemann & Göpfert (2003) markiert. Die Spuren 2-9 repräsentieren jeweils die Zellysate der mit Hybridviren infizierten Zellen nach fünf zellfreien

Virusüberträgen (68 Tage nach Infektion). Auffällig war, dass das PFVwt-infizierte Zelllysate eine deutlich höhere Konzentration von viralen Proteinen beinhaltet. Dagegen zeigten die gewählten Zelllysate der Hybridviren nur wenige virale Proteine. Die genaue Ursache hierfür konnte nicht ermittelt werden. Die genaue Klassifizierung des viralen Proteinbandenmusters konnte aufgrund fehlender spezifischer AK nicht geführt werden. In Abb. 19B wurden die gleichen Zelllysate aus Abb. 19A auf die Anwesenheit eines 2F5-Epitops getestet. In Spur 1 wurde der Marker und das Protein gp41TM von HIV-1 als PK aufgetragen. Das Signal befindet sich auf der Höhe von 15 kDa. Wie bereits erwähnt, konnte die Expression des Δ Bet-2F2-PSCA-Antigens durch die Viren PFhV-T0<PSCA> und PFhV-T1<PSCA> in keinem der durchgeführten Western Blots gezeigt werden. In Abb. 19A wurde die Anwesenheit von viralen Proteinen gezeigt (Laufspur 2 & 7). Der Expressionsnachweis für das Antigen Δ Bet-2F2-PSCA - theoretische Größe von 37 kDa - konnte dagegen nicht geführt werden (Spur 3 & 8). Die Laufspuren 4 und 9 repräsentieren die Zelllysate der Hybridviren PFhV-T0<CTL> und PFhV-T1<CTL>. Die äquivalenten Zelllysate in Abb. 19A zeigen die Anwesenheit von foamyviralen Proteinen. Jedoch konnte in diesem Western Blot nur die Anwesenheit des Δ Bet-2F2-H-Protein-Fusionsproteins - theoretische Größe von 42,9 kDa - in der Probe des Virus PFhV-T1<CTL> gezeigt werden. Die entsprechende Bande wurde in Abb. markiert. In den weiteren Versuchen konnte jedoch die Expression des Δ Bet-2F2-H-Protein-Fusionsproteins durch das Virus PFhV-T0<CTL> ebenfalls bewiesen werden. In den Laufspuren 6 und 10 konnte die Anwesenheit des prozessierten Antigens 2F5-H-Protein (17,69 kDa), induziert durch die Infektion der Viren PFhV-T0a<CTL> und PFhV-T1a<CTL>, gezeigt werden. Die entsprechende Bande wurde markiert. Zusätzlich konnte das un-prozessierte Δ Bet-2A-2F2-H-Protein (53,1 kDa) in beiden Zelllysaten detektiert werden. Diese Bande ist in der hier aufgeführten Grafik nur schwach erkennbar. Die Lage dieser Bande wurde in der Grafik markiert (*). Auch die GFP-Hybridviren zeigten nach 68 Tagen Replikation *in vitro* eine Expression des heterologen Antigens in der passenden Größe (Laufspur 5 & 7). Dabei waren diese Hybridviren für den nachfolgenden Tierversuch nicht relevant und wurden daher nicht weiter mitgeführt. Somit konnte bewiesen werden, dass alle HIV-CTL-PFV-Hybridviren die Erbinformation für die heterologe Antigenexpression längerfristig horizontal *in vitro* übertragen können. Auch konnte die Stabilität der Antigenexpression über den Zeitraum von fünf zellfreien Virusüberträgen gezeigt werden.

3.7 PCR-basierter Replikationsvergleich der optimierten PFV-Mutanten *in vitro*

In den zuvor beschriebenen *in vitro* Transfektionsversuchen konnte die Induktion von Foamyvirus-typischen zytopathischen Effekten durch die optimierten PFV-Mutanten gezeigt werden. Dabei deutete das zeitlich versetzte Auftreten dieser zytopathischen Effekte auf eine variable Replikationsgeschwindigkeit der einzelnen Hybridviren hin. Diese unter dem Mikroskop beobachteten Unterschiede sollten durch Messdaten erfasst und bestätigt werden, um ein verändertes Replikationsverhalten durch die vorgenommenen genetischen Mutationen genauer zu analysieren. Dazu wurden alle bisher erstellten PFhV-Hybridviren in BHK-21-Zellen transfiziert und bei jeder Zellpassage erfolgte eine Probenahme für den qPCR-Nachweis von viraler DNA. Als Kontrollen wurden PFVwt, PFcV-T0, PFcV-T1 und PFVdel als NK mitgeführt. Die Durchführung, Auswertung und Darstellung entspricht den unter Punkt 3.2 beschriebenen Grundlagen. Die Probenahmen erfolgten bis 24 Tage nach Transfektion. In dieser Zeit wurde ein zellfreier Übertrag von infiziertem Kulturmedium auf naive BHK-21-Zellen vorgenommen. Die Ergebnisse dazu sind in Abb. 20 und Abb. 21 dargestellt.

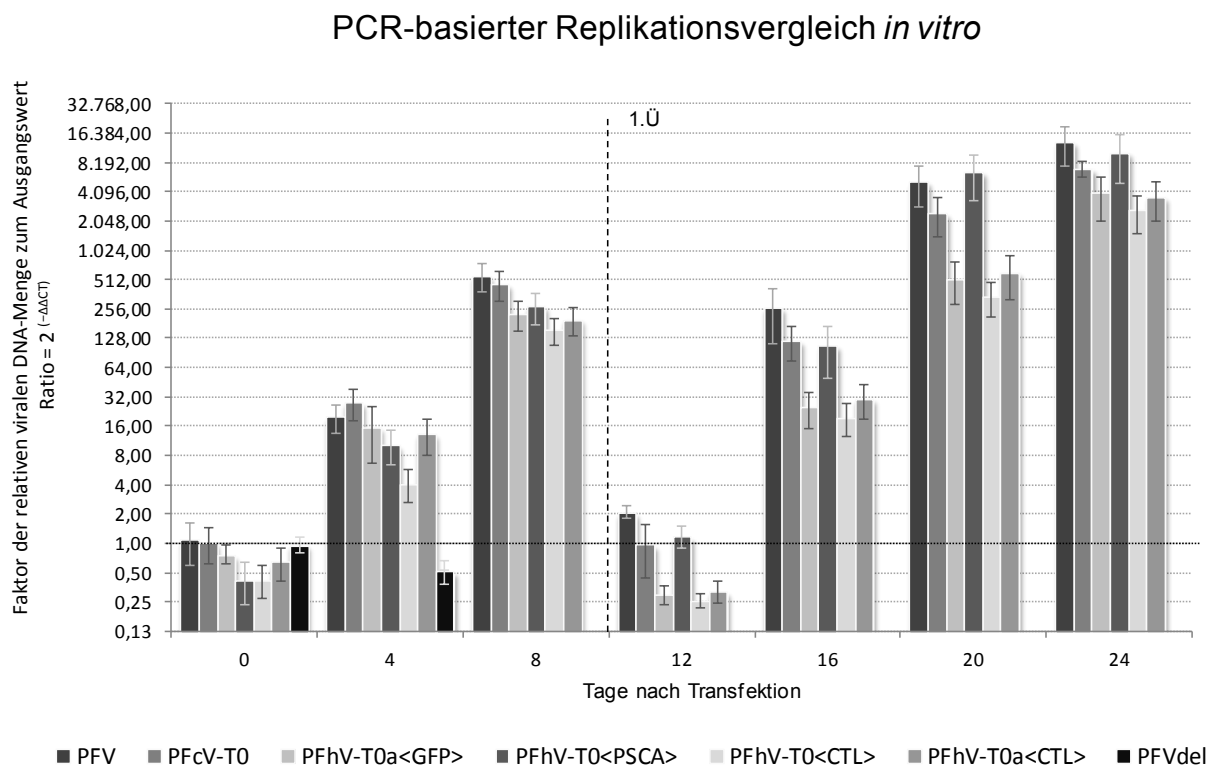


Abb. 20: Auswertung der Messergebnisse der qPCR des *in vitro* Replikationsvergleichs von PFV mit den optimierten Tass-naiven PFV-Mutanten des Basisvirus PFcV-T0

Das Balkendiagramm zeigt die ausgewerteten Messdaten der qPCR des *in vitro* Replikationsvergleichs von PFV mit den Tas-naiven PFV-Mutanten PFCV-T0, PFhV-T0a<GFP>, PFhV-T0<PSCA>, PFhV-T0<CTL>, PFhV-T0a<CTL>. Die Y-Achse repräsentiert die relative DNA-Menge in der Probe in Bezug auf den PFVwt bei t=0. Die dabei eingesetzte DNA-Menge wird repräsentiert durch den Wert Eins. Dieser wurde durch die waagerechte gestrichelte Linie markiert. Die logarithmische Einteilung zur Basis 2 der Y-Achse ergibt sich durch die Auswertung der Messergebnisse mit der Formel $\text{Ratio}=2^{(-\Delta\Delta\text{CT})}$, welche in Folge logarithmische Messwerte produziert. Die X-Achse zeigt die Tage nach Transfektion. Die Balken eines Messdatums entsprechen der Bezeichnung, Farbe und Reihenfolge der Legende. Die mit 1Ü gekennzeichnete senkrechte gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt des Übertrags des infizierten Kulturmediums auf naive BHK-21-Zellen.

Abb. 20 zeigt die Ergebnisse der Messreihe zur viralen DNA-Vervielfältigung der Mutanten des Basisvirus PFCV-T0 in Bezug auf den PFVwt. Die erste Probenahme erfolgte direkt am folgenden Tag (Tag 0) nach Transfektion. Die Verteilung der Anfangs-DNA-Menge ist bei den verschiedenen Proben unterschiedlich. Die DNA-Menge von PFVwt entspricht gleich „Eins“ und wurde durch eine waagerechte gestrichelte Linie gekennzeichnet. In den darauffolgenden Probenahmen wurde bei allen viralen Mutanten eine Reproduktion der viralen DNA-Menge verzeichnet. Wohingegen die virale DNA-Menge in der Probe des replikationsinkompetenten viralen Genoms PFVdel abnahm. Das Basis-Virus PFCV-T0 zeigte erneut eine PFVwt vergleichbare Reproduktion der viralen DNA-Menge. Im Vergleich dazu konnte in den Proben der Hybridviren PFhV-T0a<GFP>, PFhV-T0<PSCA>, PFhV-T0<CTL> und PFhV-T0a<CTL> acht Tage nach Transfektion eine geringe Reproduktion der DNA-Menge - um einen Faktor von 150-270 - verzeichnet werden. Dies spricht für eine langsamere Replikation der Hybridviren in Bezug auf PFVwt und die Basis-Mutante. Danach erfolgte der erste zellfreie Übertrag (1Ü) von infektiösem Zellkulturmedium auf naive Zellen. In der zweiten Replikationsrunde zeigten die Messwerte eine genauere Differenzierung der unterschiedlichen Replikationsgeschwindigkeiten, da der Einfluss von „nicht-biologisch-aktiver“ DNA durch unvollständige Transfektion dezimiert wurde. Es zeigt sich erneut ein Anstieg der viralen DNA-Mengen in allen Proben der infizierten Kulturen. Dies bestätigt eindeutig die Etablierung einer produktiven Infektion durch alle PFV-Mutanten über die Freisetzung funktionaler Virionen. Bei näherer Analyse der Messwerte des Basis-Virus PFCV-T0 kann eine leicht abgeschwächte DNA-Vervielfältigung im Wildtypvergleich festgestellt werden. Beispielsweise vervielfacht sich die PFVwt-DNA-Menge - 20 Tage nach Transfektion - um den Faktor 5155 bezogen auf den Ausgangswert „Eins“. Dagegen zeigte die Basis-Mutante eine Vervielfältigung um den Faktor 2464. Hierbei muss angemerkt werden, dass die DNA-Ausgangsmenge direkt nach dem Übertrag ebenfalls geringer ausfiel. Im Vergleich dazu zeigen die Antigen-exprimierenden

Hybridviren eine deutlichere Reduktion der DNA-Vervielfältigung, wie dies auch schon in den morphologischen Untersuchungen beobachtet werden konnte. 20 Tage nach Transfektion vermehrten die Hybrid-Mutanten ihre DNA-Menge durchschnittlich um den Faktor 400. Einzige Ausnahme bildet dabei die PSCA-Mutante PFhV-T0<PSCA>. Dieses Konstrukt erreicht eine Vervielfältigung der DNA-Menge um den Faktor 6543. Somit liegt dieser Wert leicht über dem Wert des PFV-Wildtyps. Eine mögliche Ursache hierfür wurde im Diskussionsteil erörtert.

Vergleicht man die Messergebnisse der PFcV-T0-Hybridviren (Tas-naiv) mit den Messergebnissen der PFcV-T1-Hybridviren (TasmI), so kann eine allgemeine Einschränkung der Replikationsgeschwindigkeit der TasmI-Mutanten festgestellt werden. Die Messergebnisse sind nachfolgend aufgeführt.

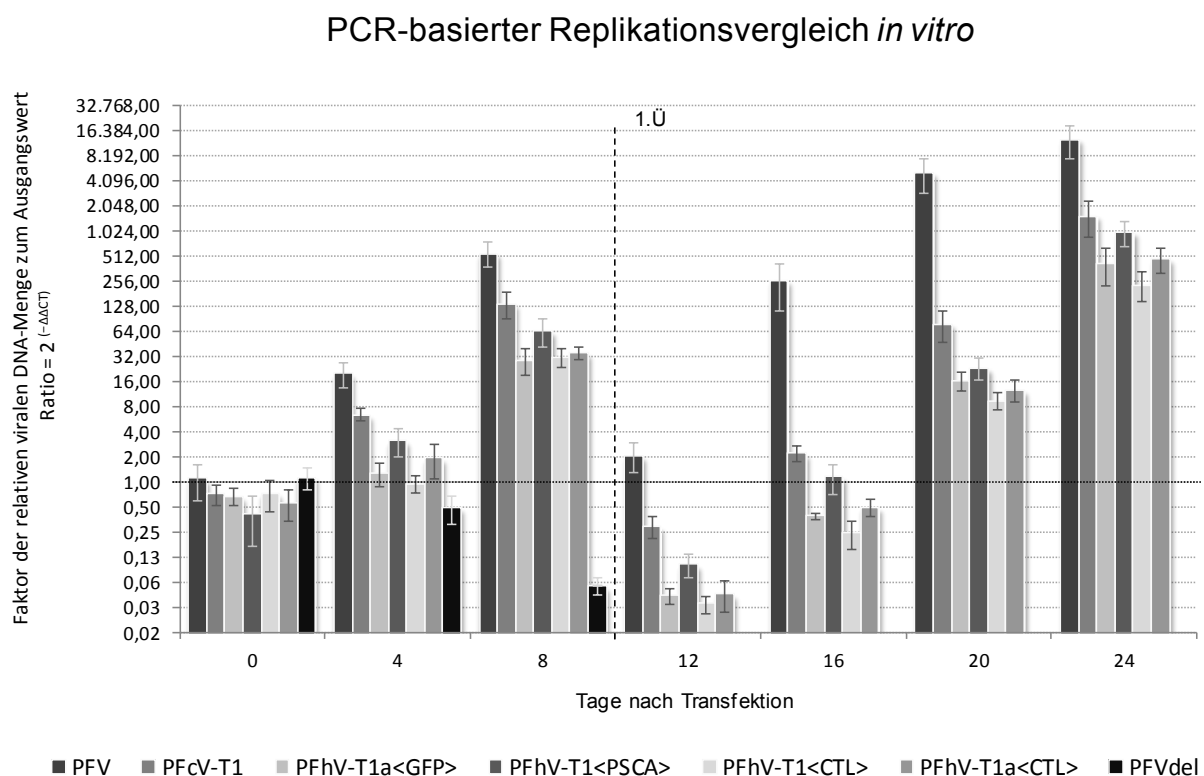


Abb. 21: Auswertung der Messergebnisse der qPCR des *in vitro* Replikationsvergleichs von PFV mit den optimierten TasmI -PFV-Mutanten des Basisvirus PFcV-T1

Das Balkendiagramm zeigt die Ergebnisse der qPCR des *in vitro* Replikationsvergleichs von PFV mit den TasmI-Mutanten PFcV-T1, PFhV-T1a<GFP>, PFhV-T1<PSCA>, PFhV-T1<CTL>, PFhV-T1a<CTL>. Die Y-Achse repräsentiert die relative DNA-Menge in Bezug auf den PFVwt bei $t = 0$. Die dabei eingesetzte DNA-Menge wird repräsentiert durch den Wert Eins. Dieser wurde durch die waagerechte gestrichelte Linie markiert. Die logarithmische Einteilung zur Basis 2 der Y-Achse, ergibt sich durch die Auswertung der Messergebnisse mit der Formel $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta CT}$, welche in Folge logarithmische Messwerte produziert. Die X-Achse zeigt die Tage nach Transfektion. Die Balken eines Messdatums entsprechen der Bezeichnung, Farbe und Reihenfolge der Legende. Die mit „1.U.“ gekennzeichnete senkrechte gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt des Übertrags des infizierten Kulturmediums auf naive BHK-21-Zellen.

Die Basis-Mutante PFcV-T1 zeigt bezüglich des PFV-Wildtyps und der Tas-naiv-Mutante PFcV-T0 acht Tage nach Transfektion erneut eine weitaus geringere Vervielfältigung der viralen DNA-Menge. Es wurde eine Vervielfältigung von durchschnittlich 120 Einheiten gemessen. Der PFV-Wildtyp liegt um das 4,6-fache höher. Auch die modifizierten *TasmI*-Hybridviren zeigen einen langsameren Anstieg im Vergleich zu den äquivalenten Tas-naiven-Hybridviren. Die Ergebnisse nach dem Übertrag (1Ü) des Zellkulturmediums auf naive Zellen deutet wiederum auf eine verminderte Replikationskompetenz der *TasmI*-Mutanten hin. Auch der darauffolgende langsamere Anstieg der DNA-Menge bestätigt die verminderte Replikationsgeschwindigkeit der *TasmI*-Vektoren. Jedoch zeigte die zu PFhV-T0<PSCA> äquivalente *TasmI*-PSCA-Hybrid-Mutante PFhV-T1<PSCA> ebenfalls eine leicht verbesserte Replikationsgeschwindigkeit bezüglich der anderen *TasmI*-Hybridviren. Die genaue Ursache für diesen Replikationsvorteil der PSCA-Hybridviren konnte nicht hinreichend ermittelt werden. Mögliche Ursachen wurden im Diskussionsteil erörtert. Aufgrund der gewonnenen Daten konnte bewiesen werden, dass die optimierten PFV-Mutanten ihre Replikationskompetenz trotz der drastischen genetischen Veränderungen beibehalten konnten. Es konnte lediglich eine Abschwächung der Replikationsgeschwindigkeit beobachtet werden, wobei gleichzeitig die Funktionalität der Virionen erhalten bleiben.

3.8 Replikationsnachweis der Antigen-exprimierenden PFV-Impfviren *in vivo*

Nach Abschluss der Klonierungsarbeiten und Charakterisierung der viralen Eigenschaften *in vitro* sollten die Antigen-exprimierenden Hybridviren auf die Anwendungsmöglichkeit als Vakzinierungsstrategie *in vivo* untersucht werden. Die Daten des zuvor durchgeführten Tierexperiments hatten gezeigt, dass durch die Applikation von modifizierten foamyviralen Vektoren dauerhafte eine Stimulation des Immunsystems gegen foamyvirale Proteine induziert werden konnte. Der endgültige Replikationsnachweis *in vivo* über Pro-Virusnachweis in Organproben oder Re-Isolation der applizierten Viren konnte dabei jedoch nicht geführt werden. Allerdings lieferte die langanhaltende Immunantwort gegen virale PFV-Proteine und der Verlauf der induzierten Antikörperantwort einen indirekten Hinweis auf eine persistierende Infektion *in vivo*. Demzufolge sollte die Stimulation einer gezielten und permanenten Immunantwort gegen die eingebrachten Antigene durch die Applikation der optimierten PFhV-Hybridviren möglich sein. Dies sollte im

zuvor beschriebenen Hamster- und Mausmodell untersucht werden. Dazu wurden ausgewählte Vektoren mittels der Gene Gun appliziert. In dem zuvor beschriebenen Tierversuch erfolgte die Infektion durch zeitlich versetzten zweimaligen Beschuss des Abdomens. Es wäre denkbar, dass durch die zeitlich versetzte zweimalige Applikation der PFV-Vektoren eine replikationsunabhängige, CMV-Promotor-vermittelte Anti-PFV-Immunantwort stimuliert werden könnte, wie dies bei Gene Gun-applizierten, nicht replizierenden DNA-Vakzinen gezeigt werden konnte (Niederstadt *et al.*, 2012; Nguyen-Hoai *et al.*, 2012). Um einen solchen eventuellen CMV-Promotor-vermittelten „Gene Gun-Effekt“ zu minimieren, erfolgte in der zweiten Tierversuchsphase nur jeweils eine einmalige Applikation der viralen Konstrukte. Sollte diese einmalige Inokulation der viralen Vektoren zu einer ähnlich langanhaltenden Immunabwehr führen, so wäre dies ein zusätzlicher indirekter Hinweis auf eine persistierende Infektion im Organismus. Nähere Erläuterungen hierzu wurden in der Diskussion aufgeführt. Als Negativkontrolle wurden replikationsinkompetente Vektoren (basierend auf PFcV-T0 und PFhV-T0<CTL>) appliziert, um einen eventuellen „Gene Gun-Effekt“ eindeutig erfassen oder ausschließen zu können. In den Vorbereitungen des zweiten Tierversuchs wurden geeignete Negativkontrollvektoren generiert. Dazu wurde aus den Vektoren pPFcV-T0 und pPFhV-T0<CTL> die 3'LTR entfernt, wodurch replikationsinkompetente virale Genome generiert wurden. Diese Vektoren wurden den Tieren der Gruppe H13 appliziert (pPFcV-T0del → H13/1 u. H13/2; pPFhV-T0<CTL>del → H13/3 u. H13/4). Im Anhang S. VII und XIII wurden Vektorkarten der Kontrollvektoren aufgeführt. Die Aufteilung der Versuchsgruppen mit den jeweilig applizierten Vektoren wurden in Tabelle 4 (S. 54) aufgeführt. Die Versuchsdauer wurde auf 400 Tage angesetzt, um eine Langzeit-Aussage über die Induktion einer effizienten und langanhaltenden Immunantwort durch einmalige Applikation der Impfvektoren treffen zu können. In regelmäßigen Abständen wurden allen Hamstern Blutproben entnommen. Die Blutentnahmen können dem Versuchsplan auf S. 53 entnommen werden. Die Blutungen der Mausgruppen wurden auf vier Eingriffe pro Tier beschränkt, um die Sterblichkeitsrate durch die Blutentnahme zu minimieren. Im Laufe des Experiments wurden einzelne Seren auf die Anwesenheit von PFV-spezifischen Antikörpern mittels PFV-ELISA getestet. Dabei konnte in einigen Tieren ein Anstieg von PFV-spezifischen IgGs gemessen werden, wobei einzelne Tiere keine Reaktion auf die Applikation der Impfvektoren zeigten (siehe Abb. 23, Abb. 24 & Abb. 25). Zusätzlich zu den Bestimmungen einer PFV-spezifischen Immunantwort wurden einzelne PFV-positive Seren der Tiere H8/2, H9/1 und H9/3 auf die Anwesenheit von HIV-CTL-Epitop-spezifischen Antikörpern

getestet. Da *in vitro* die Expression von PSCA durch die Mutante PFhV-T0<PSCA> nicht nachgewiesen werden konnte, wurde auf den Nachweis von PSCA-spezifischen Antikörpern verzichtet. Um eine HIV-CTL-Epitop-spezifische Antikörperantwort nachzuweisen, wurde ein in der Arbeitsgruppe etablierter Peptid-ELISA durchgeführt (Durchführung siehe Punkt 2.2.5.2). Während des laufenden Versuchs konnte in keinem der PFV-positiven Seren eine eindeutige humorale Immunantwort gegen das künstlich exprimierte Antigene nachgewiesen werden. In der nachfolgenden Abb. 22 ist beispielhaft das Ergebnis des Peptid-ELISAs eines PFV-positiven Serums (343 Tage nach Infektion) von Tier H8/2 aufgeführt. Zusätzlich ist die 2F5-Positivkontrolle gegenübergestellt. Wie in der Abbildung zu erkennen ist, konnte in diesem Serum keine eindeutige Antikörperreaktion gegen die HIV-CTL-Peptide detektiert werden.

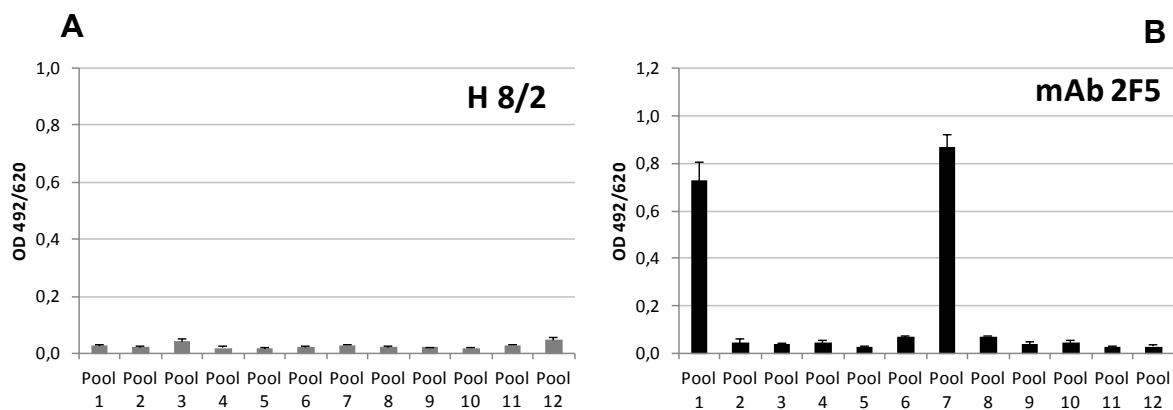
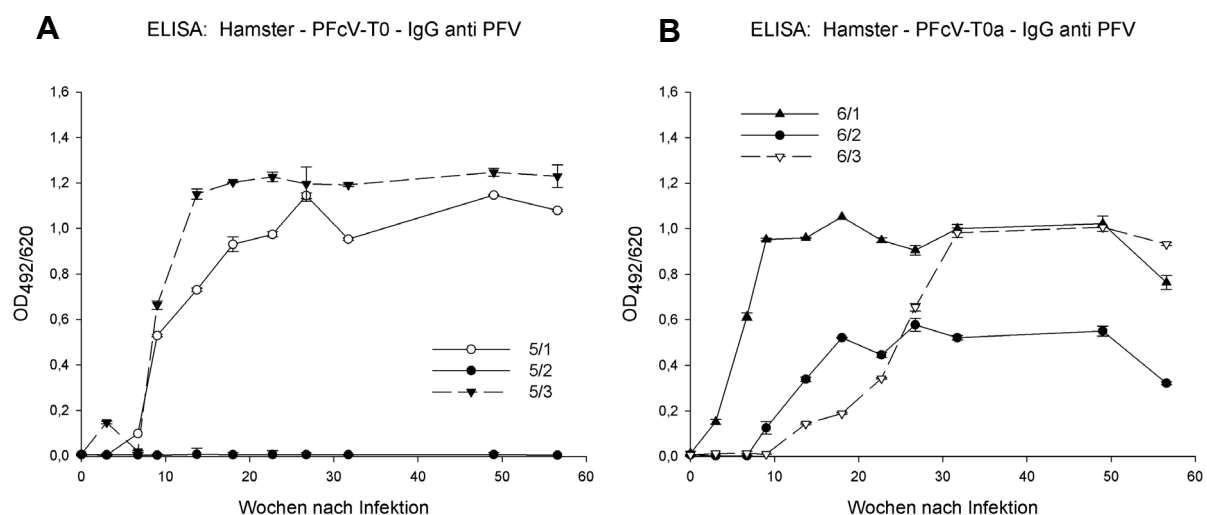


Abb. 22: Auszug aus den Messergebnissen des Peptid-ELISAs zur Bestimmung einer induzierten humoralen Immunantwort gegen HIV-CTL-Epitope in den Versuchstiergruppen H5-H13 und M5-M9, 321 bzw. 343 Tage nach Infektion

Während des laufenden Tierexperiments wurden die Seren der Blutungen an Tag 321 und 342 auf die Anwesenheit von HIV-CTL-Epitop-spezifischen Antikörpern mittels Peptid-ELISA getestet. In keiner der Versuchstiergruppen H5-H13 und M5-M9 konnte ein signifikantes Signal gegen die Peptide des Antigens gemessen werden. In der Abb. wurde exemplarisch das Ergebnis des Hamsters H8/2 aufgeführt (A). Dieser wurde zuvor mit dem Hybridvirus PFhV-T0<CTL> infiziert. Im Vergleich dazu wurde die mAb-2F5-Positivkontrolle des Peptid-ELISAs gegenübergestellt (B). In den Peptid-Pools 1 und 7 befindet sich das 2F5-Epitop.

Im Zuge dieser ersten Ergebnisse wurde eine geringfügige Versuchsplanänderung vorgenommen, um eine Verstärkung der vermutlich basalen Immunantwort zu induzieren. Dazu wurde ein Gene Gun-vermittelter „boost“ der Antigen-gerichteten Immunantwort mit einem nicht viralen DNA-Vakzin durchgeführt. Die dazu benötigten Vektoren wurden auf Basis des Expressionsvektors pDisplay™ von Invitrogen generiert. Dabei wurden Vektoren konstruiert, welche das 2F5-HIV-CTL-Epitop-Antigen unter Kontrolle eines CMV-Promotors exprimieren. Der pDisplay™ Expres-

sionsvektor beinhaltete das zelluläre Exportsignal der Maus-Immunglobuline. Dieses Signal wurde den Antigenen N-terminal angegliedert, um eine Sekretion der Proteine zu induzieren. Dadurch sollte eine B-Zell-vermittelte Immunantwort stimuliert werden. Neben der humoralen Immunantwort sollte auch die T-Zell-vermittelte Immunantwort „geboostet“ werden. Dazu wurde das murine Exportsignal aus dem Expressionsvektor entfernt, wodurch vermehrt die Bildung von Antigenpeptid-MHC-I-Komplexen angeregt werden sollte. Diese DNA-Vakzine wurden allen Tieren der Versuchstiergruppen in der Kombination B- und T-Zell-Stimulanz 1:1 via Gene Gun appliziert. Das DNA-Vakzin wurde auch den Tieren der Kontrollgruppen appliziert, um gleichzeitig den immunstimulatorischen Effekt auf nicht immunisierte Tiere untersuchen zu können. Der DNA-*boost* erfolgte aus technischen Gründen zwischen der 52. und 54. Woche nach Infektion. Das Versuchsende erfolgte jeweils zwei bzw. drei Wochen nach der Applikation (siehe Versuchsplan S. 53). Die Tiere wurden euthanasiert und es folgte die Obduktion und Organentnahme. Die tägliche Sichtung des Versuchstierbestands durch das betreuende Personal zeigte keine äußerlichen pathologischen Veränderungen. Auch die Obduktion führte zu keinen pathologischen Befunden. Den Hamstern wurden die Organe Lunge und Milz entnommen. Zusätzlich erfolgte die Aufarbeitung und Trennung der Blutbestandteile (Plasma & PBMC). Den Mäusen wurde die Milz entnommen und es folgte ebenfalls die Trennung der Blutbestandteile. Nach Versuchsende erfolgte der immunologische Nachweis von PFV-spezifischen Antikörpern im zeitlichen Verlauf mittels ELISA. In den nachfolgenden Abbildungen werden die Ergebnisse aufgeführt. In Abb. 23 sind die Diagramme zu den Messergebnissen der Hamstergruppen H5-H9 und der Negativkontrollgruppe H13 gezeigt. Diese Gruppen wurden mit den Vektoren des Basisvirus PFcV-T0 (Tas-naiv) infiziert.



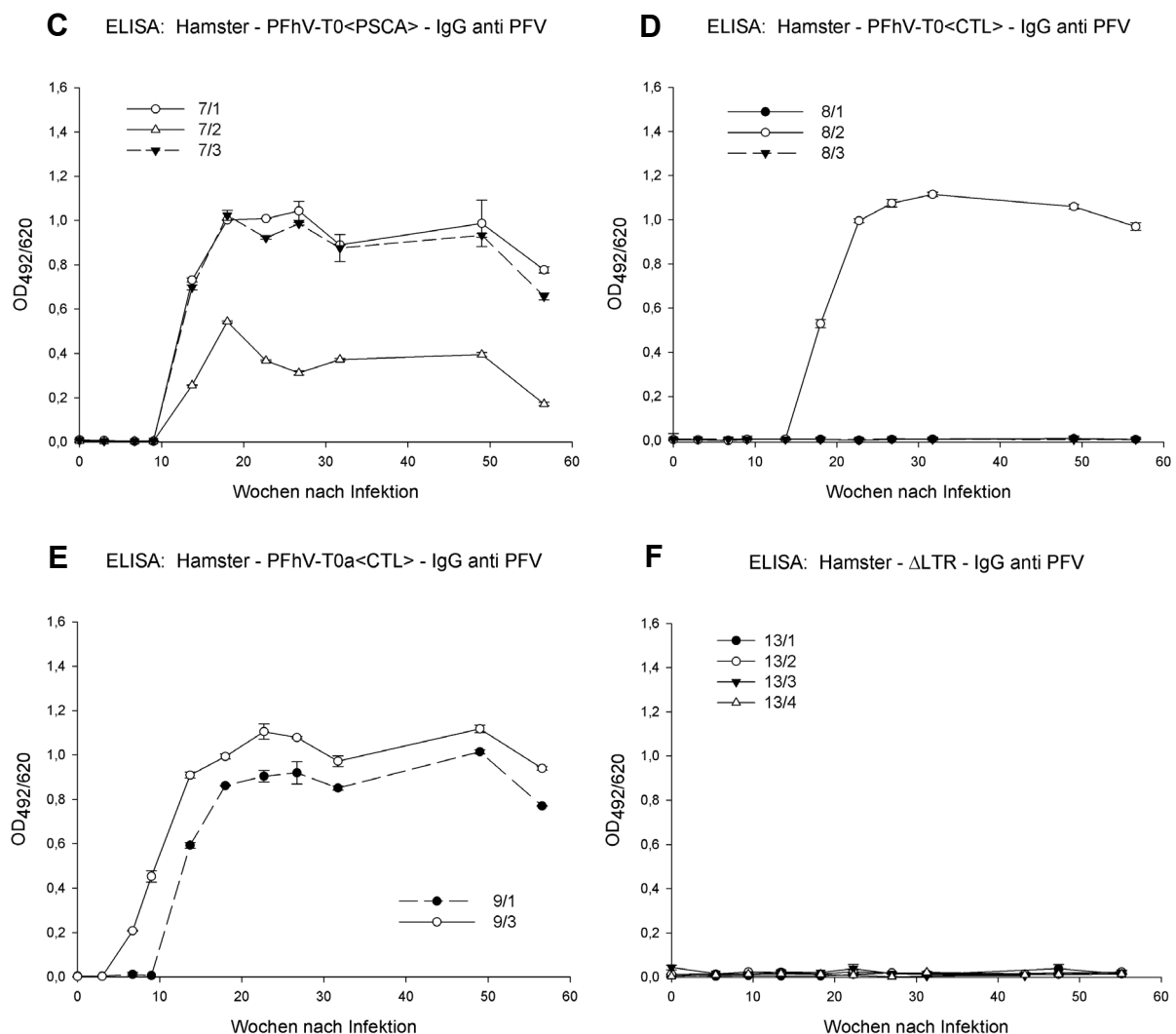


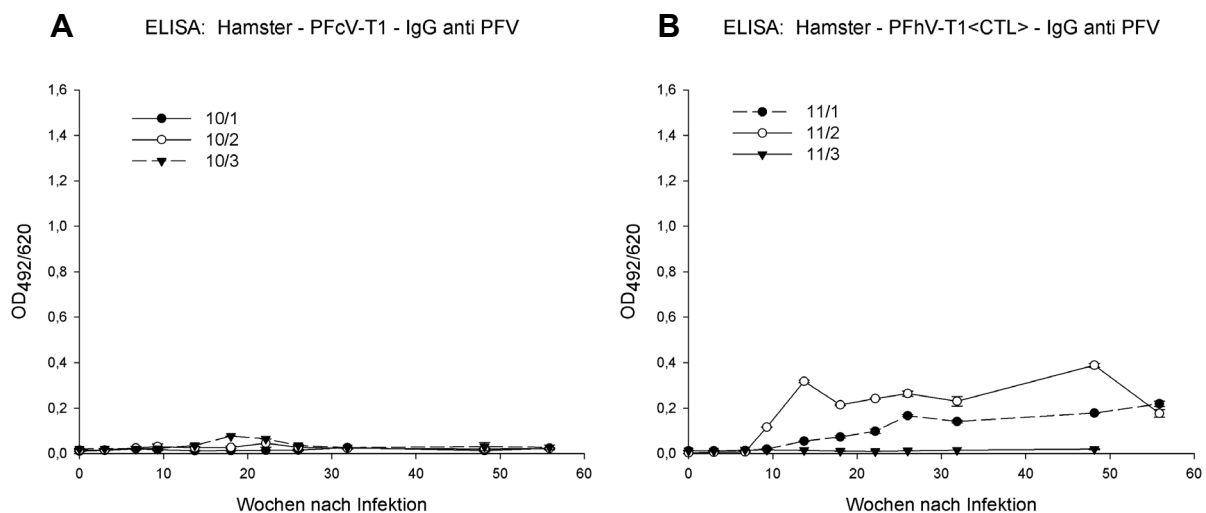
Abb. 23: Diagramme zu den ELISA-Messdaten des *in vivo* Infektionsversuchs von Hamstern mit den optimierten Tas-naiven PFV-Mutanten sowie der Negativkontrollgruppe

Die Abbildungen zeigen den zeitlichen Verlauf der IgG-Immunantwort von infizierten Hamstern gegen virale PFV-Proteine im ELISA. Als Antigen wurde ein PFV-infiziertes BHK-21-Zelllysate verwendet. Die Serumverdünnung betrug bei allen Proben 1:100. Der Versuchszeitraum erstreckte sich über 396 Tage. Dabei wurde auf den X-Achsen die Wochen nach Infektion aufgetragen und die Y-Achsen zeigten die erreichte OD_{492nm/620nm} der Serumproben. Diagramm A und B zeigt die humorale Immunantwort der Hamstergruppen H5 und H6, welche mit den Tas-naiven Basisvektoren PFcV-T0 und PFcV-T0a infiziert wurden. Diagramm C zeigt die im ELISA erzielten Messergebnisse der Gruppe H7, welche mit dem Hybridvirus PFhV-T0<PSCA> infiziert wurden. Diagramm D zeigt die Messdaten der Gruppe H8, welche mit dem Hybridvirus PFhV-T0<CTL> infiziert wurden. Diagramm E zeigt die Messdaten der Gruppe H9, welche mit dem Bet-2A HIV-CTL-Epitop-Hybridvirus PFhV-T0a<CTL> infiziert wurden. Eines der Versuchstiere verstarb kurz nach Versuchsbeginn. Diagramm F zeigt die humorale Immunantwort der Negativhamstergruppe H13, welche mit den LTR Deletionsmutanten PFcV-T0del und PFhV-T0<CTL>del infiziert wurden.

Abb. 23A und B zeigt die IgG-spezifische Immunantwort gegen virale Proteine der mit pPFcV-T0- und pPFcV-T0a-infizierten Hamstergruppen H5 und H6. Zwei der drei Tiere der Gruppe H5 zeigten ab ca. neun Wochen nach Exposition eine permanente Immunantwort gegen PFV bis zum

Ende des Versuchszeitraums. Tier H5/2 zeigte keine Reaktion auf die Infektion. In Gruppe H6 konnte bei allen Hamstern eine Immunreaktion verzeichnet werden. Dabei zeigte Tier H6/1 bereits nach 21 Tagen erste Antikörper. Wohingegen bei Tier H6/2 und H6/3 nach neun bzw. 13 Wochen erste Immunantworten nachgewiesen werden konnten. Bei allen drei Tieren konnte über den gesamten Zeitraum des Versuchs eine permanente Antikörpersekretion detektiert werden. Die Ergebnisse der Gruppen H7-H9 werden in Abb. 23C, D und E dargestellt. Diese Gruppen wurden mit den PSCA- bzw. HIV-CTL-Epitop-Impfvektoren pPFhV-T0<PSCA>, pPFhV-T0<CTL> und pPFhV-T0a<CTL> infiziert. Wie in den Diagrammen ersichtlich, konnte auch in diesen Tieren eine permanente Sekretion von PFV-spezifischen Antikörpern über den Zeitraum des gesamten Versuchs beobachtet werden, wobei in Gruppe H8 lediglich ein Tier eine Immunreaktion zeigte. In Gruppe H9 verstarb ein Hamster kurz nach Versuchsbeginn. In Abb. 23F sind die Immunantworten der Negativkontrollgruppe dargestellt. Über den Versuchszeitraum konnten keine PFV-spezifischen IgGs nachgewiesen werden. Vergleicht man diese Kurvenverläufe mit den der ersten Tierversuchsphase, so konnte entgegen der zuvor beobachteten Homogenität eine deutliche Varianz innerhalb der Gruppen festgestellt werden. Das Auftreten der sogenannten anfänglichen Peak-Phase konnte nur ansatzweise bei einigen wenigen Tieren beobachtet werden (Abb. 23C und E). Es konnte jedoch in allen Tieren eine anhaltende Plateauphase gemessen werden. Dagegen wurde in den meisten Proben der Endblutung ein auffälliger Abfall der IgG-Konzentration verzeichnet. Die genaue Ursache hierfür bleibt unklar.

Die Hamstergruppen H10-H12 wurden mit den modifizierten *TasmI*-Viren der Basis pPFcV-T1 infiziert. In nachfolgender Abb. 24 sind die Ergebnisse des PFV-ELISAs aufgeführt.



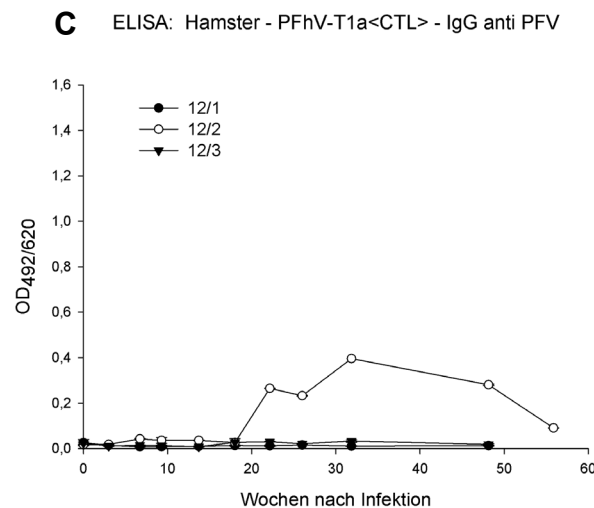


Abb. 24: Diagramme zu den ELISA-Messdaten des *in vivo* Infektionsversuchs von Hamstern mit den optimierten *TasmI*-PFV-Mutanten PFcV-T1, PFhV-T1<CTL> & PFhV-T1a<CTL>

Die Abbildungen zeigen den zeitlichen Verlauf der IgG-Immunantwort gegen virale PFV-Proteine im ELISA von infizierten Hamstern. Als Antigen wurde ein PFV-infiziertes BHK-21-Zelllysate verwendet. Die Serumverdünnung betrug bei allen Proben 1:100. Der Versuchszeitraum erstreckte sich über 396 Tage. Dabei wurde auf den X-Achsen die Wochen nach Infektion aufgetragen und auf den Y-Achsen die erreichte OD_{492nm/620nm} der jeweiligen Serumproben. Diagramm A zeigt die humorale Immunantwort der Hamsterguppen H10, welche mit dem modifiziertem *TasmI*-Basisvektor PFcV-T1 infiziert wurden. Diagramm B zeigt die im ELISA erzielten Messergebnisse der Gruppe H11, welche mit dem HIV-CTL-Epitop-Hybridvirus PFhV-T1<CTL> infiziert wurden. Tier H11/3 verstarb vor Versuchsende. Diagramm C zeigt die Messdaten der Gruppe H12, welche mit dem Hybridvirus PFhV-T1a<CTL> infiziert wurden. Die Tiere H12/1 und H12/3 verstarben ebenfalls frühzeitig vor Versuchsende.

Abb. 24A zeigt die ELISA-Ergebnisse der Gruppe H10. Diese Tiere wurden mit dem *TasmI*-Leervektor pPFcV-T1 infiziert. Wie dem Diagramm zu entnehmen ist, konnten im gesamten Versuchszeitraum keine PFV-spezifischen IgGs nachgewiesen werden. In drei Hamstern der anderen Gruppen konnte dagegen eine PFV-spezifische Immunantwort registriert werden. Im Vergleich zu den Immunantworten der Gruppen H5-H9 fiel hier die Antikörperkonzentration deutlich geringer aus, was auf eine schwächere Replikation hindeutet. Nähere Erläuterungen hierzu wurden in der Diskussion aufgeführt. Die anderen Tiere der Gruppen H11 und H12 zeigten wiederum keine Reaktion auf die Virusapplikation. Der letzte Datenpunkt der Messreihe konnte nicht mehr erfasst werden, da die Tiere frühzeitig nach der 9. bzw. 10. Blutung verstarben. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die einmalige Applikation der viralen Mutanten bei neun von 23 Hamstern zu keiner messbaren Stimulation des Immunsystems führten.

Die Serumproben der Mausversuchsgruppen M5-M9 wurden ebenfalls auf die Anwesenheit von PFV-spezifischen IgGs getestet. Die Ergebnisse dazu sind in der nachfolgenden Abb. 25 aufgeführt.

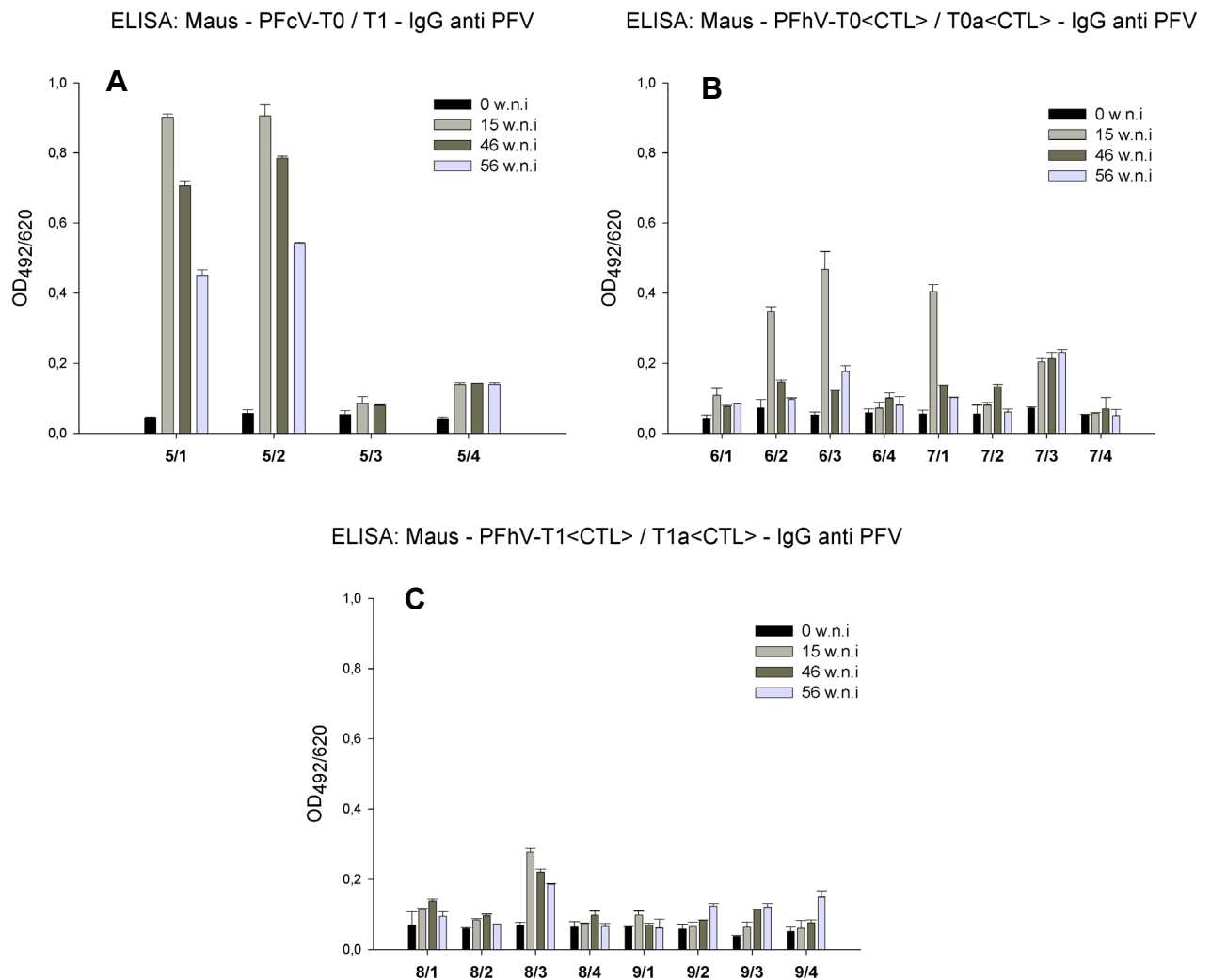


Abb. 25: Diagramme zu den ELISA-Messdaten des *in vivo* Infektionsversuchs von Mäusen mit den optimierten HIV-CTL-Epitop-exprimierenden PFhV-Hybridviren und die dazu äquivalenten Basisviren PFcV-T0 und TFcV-T1

Die Balkendiagramme zeigen die PFV-spezifische IgG-Immunantwort von infizierten Mäusen im ELISA. Als Antigen wurde ein PFV-infiziertes BHK-21-Zelllysate verwendet. Der Versuchszeitraum erstreckte sich über 391 Tage. Die Serumverdünnung betrug bei allen Proben 1:100. Bei jedem Tier wurden vier Blutungen im Versuchszeitraum vorgenommen. Die Balken repräsentieren die erreichte $OD_{492nm/620nm}$ der Blutproben 0, 15, 46 und 56 Wochen nach Infektion. Die X-Achse zeigt die Versuchstiernummer. Diagramm A zeigt die humorale Immunantwort der Maus Gruppe M5, welche mit den optimierten Basisvektoren PFcV-T0 (M5/1 u. M5/2) und PFcV-T1 (M5/3 u. M5/4) infiziert wurden. Tier 5/3 verstarb frühzeitig kurz vor Versuchsende. Diagramm B zeigt die Ergebnisse der Mausgruppen M6 und M7, welche mit den Hybridviren PFhV-T0<CTL> (M6) und PFhV-T0a<CTL> (M7) infiziert wurden. Diagramm C zeigt die Messergebnisse der Versuchsgruppen M8 und M9, welche mit den Hybridviren PFhV-T1<CTL> (M8) und PFhV-T1a<CTL> (M9) infiziert wurden.

Abb. 25A zeigt die mit pPFcV-T0- und pPFcV-T1-infizierte Leer-Vektorgruppe M5. Tier M5/1 und M5/2 wurden mit dem Tas-naiven-Virus und Tier M5/3 und M5/4 mit dem modifizierten *Tasm1*-Virus infiziert. Dabei wurde bei den Tieren M5/1 und M5/2 anfangs eine deutliche Stimulation des Immunsystems beobachtet, welche im Versuchsverlauf abnahm. Dagegen konnte bei den Tieren

M5/3 und M5/4 keine eindeutige Immunantwort verzeichnet werden. Abbildung B zeigt die erfassten Antikörperkonzentrationen der Gruppe M6 und M7, welche mit den H-Protein-exprimierenden Tas-naiven-Hybridviren infiziert wurden. Bei drei Tieren konnte 15 Wochen nach Infektion ein eindeutiger Anstieg der IgGs verzeichnet werden. Alle anderen Messwerte dieser Gruppen könnten lediglich auf eine basale PFV-spezifische Immunantwort hindeuten. Tier M7/3 zeigte im Versuchsverlauf eine konstante Immunreaktion auf niedrigem Level. Wahrscheinlich handelte es sich hierbei um ein unspezifisches Signal. In Gruppen M8 und M9 wurde nur in einem Tier eine eindeutige Immunantwort gemessen, welche im Versuchsverlauf ebenfalls rückläufig war (Abb. 25C). Diese Daten deuten wiederum auf eine schlechtere Replikationskompetenz der *Tasm1*-Mutanten in Mäusen hin.

Zusätzlich zu den Antikörperbestimmungen wurde erneut eine Ko-Kultivierung der Gewebszellen infizierter Tiere für einen eindeutigen Replikationsnachweis durchgeführt. Das entnommene Lungen- und Milzgewebe der Hamster wurde aufgearbeitet und die Zellen vereinzelt. Die Ko-Kultivierung der Gewebszellen erfolgte mit MRC-5-Zellen. Um die Sensitivität der Nachweismethode zu erhöhen, wurden die isolierten Lungen-, Milz- und Blutzellen eines Hamsters vereint und zusammen in einer Zellkulturflasche kultiviert. Die Durchführung erfolgte laut der Beschreibung unter Punkt 2.2.4.3. Drei Wochen nach Tierversuchsende wurden bei den MRC-5-Zellen der Ko-Kultur des Tieres H7/3 auffällige zellmorphologische Veränderungen festgestellt. Mittels qPCR konnte eindeutig foamyvirale DNA in dieser Zellkultur nachweisen. Um die Art des viralen Genoms zu bestimmen, wurden weitere PCR-Tests durchgeführt. Der PCR-Nachweis konnte eindeutig die der Gruppe H7 applizierte Mutante PFhV-T0<PSCA> nachweisen, wodurch die erfolgreiche Re-Isolation des applizierten Impfvirus bestätigt wurde. Dadurch gelang ein eindeutiger Nachweis der *in vivo* Replikation der Mutanten PFhV-T0<PSCA> über einen Zeitraum von annähernd 400 Tagen. Die Ko-Kulturen der anderen 22 Hamster waren hingegen qPCR-negativ. In der nachfolgenden Tabelle 5 sind die Ergebnisse der Impfvirus-Re-Isolation dargestellt.

Tabelle 5: Ergebnis der Impfvirus-Re-Isolation aus den Hamsterguppen der zweiten Tierversuchsphase

Gruppe	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13
Impfvirus	PFcV-T0	PFcV-T1	PFhV-T0<PSCA>	PFhV-T0<CTL>	PFhV-T0a<CTL>	PFhV-T1	PFhV-T1<CTL>	PFhV-T1a<CTL>	negativ Vektor
Re-Isolation	-	-	1	-	-	-	-	-	-

Im Anschluss folgte die Bestimmung der genetischen Integrität des Re-Isolates. Dazu wurde eine PCR mit den Sequenzierungsprimern Nr. s14 und s30 (siehe Anhang S. XVI) auf dem Zelllysate des Re-Isolates durchgeführt. Das resultierende 1161 Basenpaar große PCR-Produkt wurde sequenziert. Dabei beinhaltete das DNA-Fragment die gesamte *psca*-Sequenz sowie Teile des N-terminalen Endes des *bet*-Leserahmens und die U3-Region der 3'LTR. Die Sequenzierung ergab eine 99,72%ige Sequenzübereinstimmung mit der Ausgangssequenz des applizierten Impfvektors pPFhV-T0<PSCA>. Lediglich an drei Stellen des DNA-Fragments wurde eine Punktmutation festgestellt. Die erste Mutation befand sich an Basenpaar 10028 des viralen Genoms und umfasste eine G zu A Mutation, wodurch eine Aminosäuresubstitution im Tas- (C→Y) als auch Bet- (V→M) Protein hervorgerufen wurde. Die zweite Mutation lokalisierte sich an Stelle 10484 und umfasste ebenfalls einen G zu A Punktmutation, welche zu einer Aminosäuresubstitution im PSCA-Antigen (V→M) führte. Die dritte wurde im Bereich der 3'LTR ermittelt und beinhaltete einen Austausch von A zu G an Stelle 10882. Dieser Bereich umfasste keine codierenden Sequenzen. Durch diese sehr geringe Mutationsrate kann eine sehr hohe genetische Stabilität des Impfvirus über einen langen Zeitraum angenommen werden. Die entnommenen Milzen und Blutzellen der Mäuse wurden nicht mit MRC-5-Zellen ko-kultiviert. Stattdessen erfolgte der Nachweis einer spezifischen zellulären Immunantwort gegen das Impfvirus-vermittelte HIV-CTL-Epitop-Protein. Dazu wurde die durch Stimulation induzierte Ausschüttung von IFN γ mittels ELISPOT bestimmt. Die dabei erzielten Ergebnisse werden im nachfolgenden Abschnitt aufgeführt.

3.9 Nachweis einer gezielten Langzeitstimulation des Immunsystems durch die persistierende Replikation und Antigen-Präsentation der Impfviren

Es konnte gezeigt werden, dass durch die einmalige Applikation der PFV-Hybridviren eine langanhaltende Immunabwehr gegen foamyvirale Proteine induziert werden konnte. Dabei lieferte die erfolgreiche Re-Isolation einer der Hybridmutanten den Beweis dafür, dass die genetisch-modifizierten PFV-Mutanten eine persistente und stabile Replikation in den Organismen etablieren konnten. Der folgende Abschnitt sollte die Fragestellung beantworten, ob durch die persistierende Replikation und die damit verbundene Expression der künstlich eingebrachten Antigene eine starke und dauerhafte Immunabwehr gegen die gewählten HIV-CTL-Epitope stimuliert werden konnte. Aufgrund der begrenzten immunologischen Nachweissysteme zur Charakterisierung einer

Immunabwehr in syrischen Goldhamstern erfolgte lediglich die Bestimmung von Antigen-spezifischen IgGs in den Blutseren der infizierten Hamster. Wie bereits erwähnt wurde, erfolgte der immunologische Nachweis mit einem bereits in der Arbeitsgruppe etablierten Peptid-ELISA. Das verwendete HIV-CTL-Epitop-Peptidset umfasste 30 Peptide aus jeweils 15 Aminosäuren mit einer fortlaufenden überlappenden Sequenz von je zehn Aminosäuren. Die Sequenzen der Peptide und die Aufteilung der Peptide in den jeweiligen Peptidpools sind im Anhang ab S. XVII aufgeführt. Die Durchführung wurde in Punkt 2.2.5.2 beschrieben. Während des laufenden Tierversuchs wurden einzelne PFV-positive Seren der Gruppen H7-H9 auf HIV-Epitop-spezifische Antikörper getestet. Die dabei erzielten Ergebnisse konnten keinen eindeutigen Hinweis auf eine spezifische Immunabwehr liefern. Deshalb erfolgte ein Jahr nach Infektion eine zusätzliche gezielte Stimulation des Immunsystems mit nicht-viralen DNA-Vakzinen, um eine eventuell bereits etablierte, aber schwache Immunabwehr zu „boosten“. Nach Versuchsende wurden alle Seren der Endblutung von Hamstern und Mäusen auf spezifische IgG-Antikörper gegen HIV-CTL-Epitope getestet. Dabei wurde erneut festgestellt, dass in keiner der getesteten Blutproben eine eindeutige humorale Immunabwehr nachgewiesen werden konnte. In Abb. 26 sind exemplarisch die Messergebnisse des Peptid-ELISAs zu Versuchsende für den Hamster H9/1 (A) und der 2F5 Positivkontrolle (B) abgebildet.

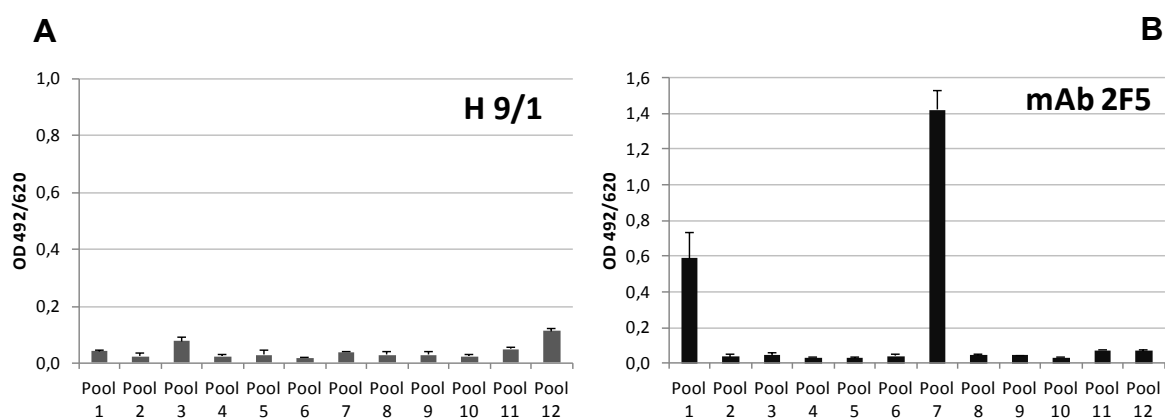


Abb. 26: Auszug aus den Messergebnissen des Peptid-ELISA's zur Bestimmung einer induzierten gezielten humoralen Immunantwort gegen HIV-CTL-Epitope in den Versuchstiergruppen H5-H13 und M5-M9.

In dem durchgeführten Peptid-ELISA zur Bestimmung einer stimulierten gezielten humoralen Immunantwort gegen HIV-CTL-Epitope durch die Immunisierung der Versuchstiergruppen H5-H13 und M5-M9 konnte in keinem der Tiere ein eindeutiges Signal gegen die Peptide der Antigene gemessen werden. Deshalb werden exemplarisch die Ergebnisse des Hamsters H9/1 aufgeführt, welcher mit dem Hybridvirus PFhV-T0a<CTL> infiziert wurde (A). Im Vergleich dazu erfolgte die mAb 2F5 Positivkontrolle des Peptid-ELISAs als Gegenüberstellung (B). In den Peptid Pools 1 und 7 befindet sich das Peptid mit dem mAb 2F5-Epitop.

Die scheinbare Reaktion gegen den HIV-CTL-Peptid-Pool 3 und 12 in Abb. 26A befindet sich nicht außerhalb des methodenbedingten Hintergrundsignals und konnte somit nicht als positiv gewertet werden. Alle anderen getesteten Seren der Endblutung lieferten vergleichbare, nicht signifikante Ergebnisse gegen die jeweiligen Peptide des H-Proteins. In Abb. 26B wird das Messergebnis der mAB-2F5 Positivkontrolle aufgeführt. Erkennbar ist ein Signal gegen den Pool 1 und 7 des HIV-CTL-Epitop-Peptidsets. In diesen Pools ist jeweils die 2F5-Epitop-Sequenz enthalten. Somit konnte die Funktionsweise der Nachweismethode bestätigt werden.

Neben der humoralen Immunantwort sollte die Bildung von antigenspezifischen zytotoxischen T-Zellen untersucht werden, um die eventuelle Induktion einer zellvermittelten Immunabwehr zu bestätigen. Hierfür wurde ein für Maus-Milzzellen etablierter IFN γ -ELISPOT durchgeführt. Aufgrund fehlender kommerzieller Nachweissysteme war die Bestimmung einer spezifischen T-Zell-Antwort in Hamstern nicht durchführbar. Von den entnommenen Maus-Milzen wurden die Milzzellen isoliert und mit dem HIV-CTL-Epitop-Peptidset 18 h stimuliert, um eine antigenspezifische Stimulation zu induzieren. Zusätzlich sollte die T-Zell-Aktivität gegen PFV ermittelt werden. Dazu wurden die Zellen mit Lebendvirus-Überständen in gleicher Weise stimuliert. Die genaue Durchführung ist in Punkt 2.2.5.3 erläutert. Die Ergebnisse der Gruppen M5 bis M9 des IFN γ -ELISPOT's sind in Abb. 27 aufgeführt. Auf der Y-Achse der Diagramme ist die Einheit SFU (*spot forming units*) pro 10^6 Milzzellen (Splenozyten) aufgetragen. Die X-Achse zeigt die Versuchstiernummer. Dabei konnte in allen immunisierten Mäusen (M6-M9) eine starke T-Zellantwort gegen die Peptide 10 und 11 des HIV-CTL-Peptidsets nachgewiesen werden.

Abb. 27A zeigt die Ergebnisse der Gruppen M6 und M7, welche mit den Tas-naiven-Hybridviren PFhV-T0<CTL> & PFhV-T0a<CTL> immunisiert wurden. Alle Milzzellen dieser Tiere wurden durch die Peptide 10 und 11 zur Sezernierung von IFN γ stimuliert. Dabei wurden die T-Zellen durch das Peptid 11 stärker angeregt. Bei den Mäusen M6/2 und M7/1 konnte mit 3026 bzw. 3767 SFU/ 10^6 die stärkste Stimulation verzeichnet werden. Dabei zeigte sich zwischen den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied in der Stärke der Immunabwehr. Die mit PFV stimulierten Zellen der Tiere M6/2 und M7/1 zeigten eher eine schwache Reaktion mit \bar{x} 29 bzw. 59 SFU/ 10^6 . Dabei wurden in den Gruppen M6 und M7 Werte von 9 bis 93 SFU/ 10^6 durch PFV-Stimulation gemessen.

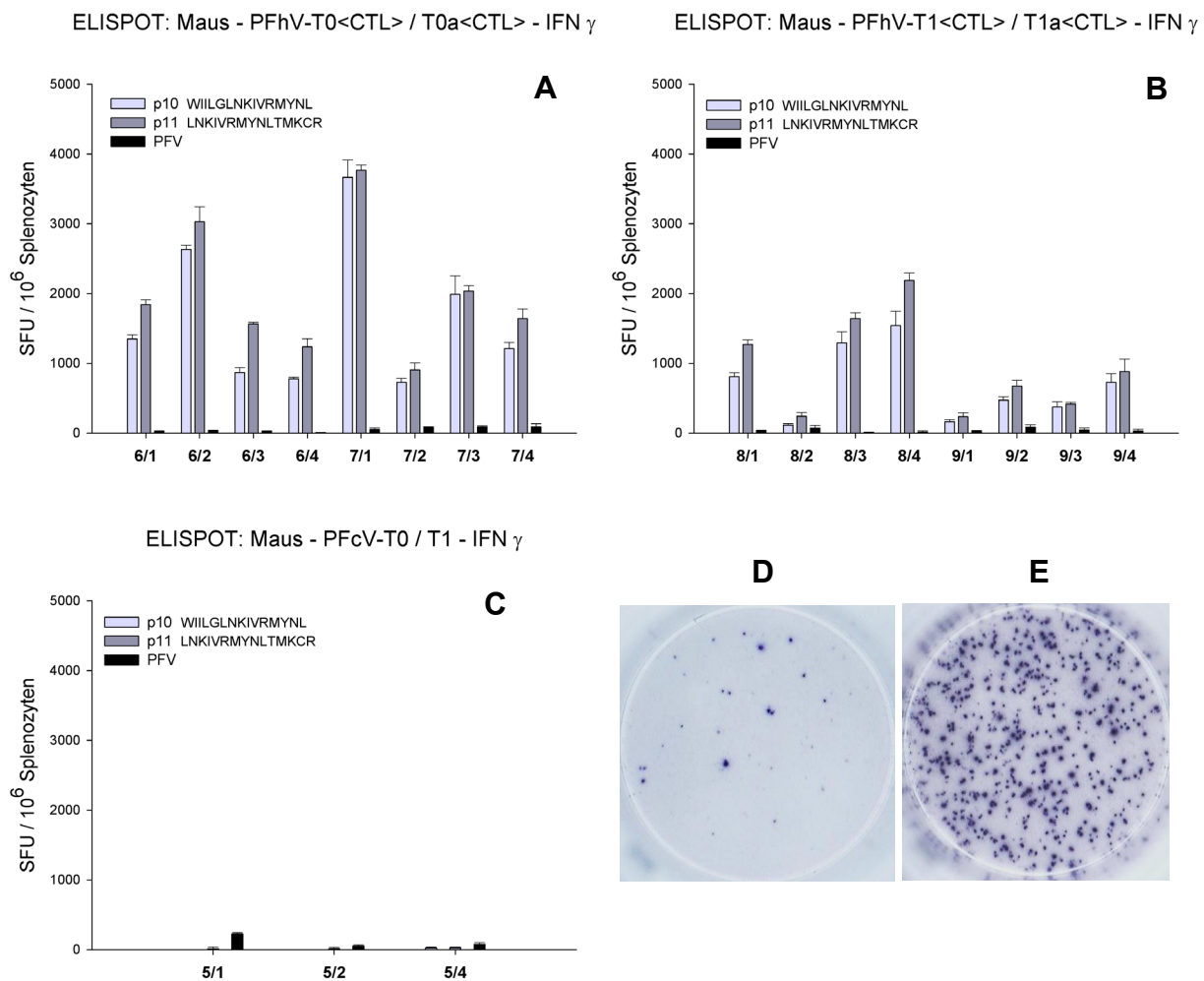


Abb. 27: Ergebnisse des durchgeführten IFN γ -ELISPOT gegen HIV-CTL-Peptide mit den Mausmilzzellen der immunisierten Mausgruppen M5 bis M9.

Diagramm A, B und C zeigt die Ergebnisse des ELISPOTs der Mausgruppen M5-M9. Auf der Y-Achse ist die Einheit SFU (*spot forming units*) pro 10^6 Splenozyten aufgetragen. Die X-Achse zeigt die Versuchstiernummer. Die entnommenen Mausmilzzellen wurden mit dem Peptidset des „H-Proteins“ stimuliert. Zusätzlich wurden die Zellen mit Lebendvirus (PFVwt) stimuliert. Die Zellen der immunisierten Gruppen M6-M9 zeigen eine starke Sezernierung von IFN γ durch Stimulation der Peptide 10 und 11 des H-Protein-Peptidsets. Diagramm A zeigt die Messwerte der Gruppe M6 und M7, welche mit den Tas-naiven-Hybridviren PFhV-T0<CTL> und PFhV-T0a<CTL> infiziert wurden. Diagramm B zeigt die Gruppen M8 und M9, welche mit den *Tasm1*-Hybridviren PFhV-T1<CTL> und PFhV-T1a<CTL> infiziert wurden. Diagramm C zeigt die Messwerte der Leer-Vektor-Mausgruppe M5, welche mit den Basisvektoren PFcV-T0 (M5/1 & M5/2) und PFcV-T1 (M5/4) infiziert wurden. Tier M5/3 verstarb kurz vor Versuchsende. Bild D zeigt das Ergebnis des ELISPOTs des Tiers M5/2, stimuliert mit dem Peptid 11 (Kavität C5). Bild E zeigt das Ergebnis des ELISPOTs des Tiers M6/3, stimuliert mit dem Peptid 11 (Kavität C5).

Im Vergleich dazu zeigte das Tier M5/1 der pPFcV-T0 Leer-Vektor-Kontrolle eine stärkere Reaktion von 226 SFU/ 10^6 durch die Lebendvirusstimulation. Die Ergebnisse der Leer-Vektor-Gruppen wurden in Abb. 27 Diagramm C dargestellt. Tier M5/1 und M5/2 zeigten gegen Peptid 11 eine schwache Reaktion von 17 SFU/ 10^6 , welche vermutlich durch den nicht viralen DNA-*boost*

induziert wurde. Durch diese Ergebnisse konnte eine induzierte Immunantwort durch die Applikation der Impfviren eindeutig nachgewiesen werden. Diagramm B zeigt die Tiere der Gruppen M8 und M9, welche mit den modifizierten *Tasm1*-Impfviren infiziert wurden. Auch in diesen Tieren konnte ausnahmslos - jedoch mit geringerer Stärke - eine Immunantwort gegen die Peptide 10 und 11 des „H-Proteins“ festgestellt werden. Tier M8/2 wies die schwächste Reaktion der Gruppe mit 241 SFU/10⁶ auf. Die anderen Tiere zeigten eine mit Gruppe 7 vergleichbare Intensität. Vergleicht man die Messwerte der Gruppe M8 mit M9, so konnte in Gruppe M9 eine weniger ausgeprägte Immunabwehr induziert werden. Bei Tier M9/1 konnten 237 SFU/10⁶ gemessen werden. Dies stellt somit den niedrigsten Messwert dieser Gruppe dar. Die Bilder D und E der Abb. 27 zeigen exemplarisch jeweils eine Kavität aus einer Dreifachbestimmung des durchgeführten IFN γ -ELISPOTs. Bild D dokumentiert die erzielten Ergebnisse von Maus 5/2, stimuliert mit Peptid 11. Bild E zeigt die Messergebnisse von Maus 6/3, welche ebenfalls durch Stimulation mit Peptid 11 erzielt wurden. Durch diese Aufnahmen sollen die Unterschiede zwischen der Leer- und den Vakzine-Vektorgruppen nochmals bildlich veranschaulicht werden. Somit konnte zweifelsfrei bewiesen werden, dass die hier entwickelten viralen Impfviren dauerhaft eine ausgeprägte T-Zellantwort in den Mäusen induzieren können.

4. Diskussion

Die Arbeiten im Feld der HIV-Impfstoffentwicklung der letzten Jahre zeigen, dass die Verwendung von replikationskompetenten Vektoren als Vakzinierungsmethode erste Erfolge bei der Kontrolle der Viruslast im Primatenmodell erzielen konnten (Hansen et al. 2011; 2013). Demgegenüber stehen die weitgehend enttäuschend verlaufenden klinischen Studien der letzten Jahrzehnte mit neuartigen Vakzinierungsstrategien zur Induktion einer schützenden Immunantwort gegen das HI-Virus. Des Weiteren werden derzeit große Hoffnungen in die Grundlagenforschung zur Entwicklung von effektiven Anti-Tumorimpfstoffen gesetzt. Dies begründet sich hauptsächlich durch verschiedene klinische Studien mit ersten Erfolgen bei der Behandlung von austerapierten Krebspatienten. Demnach ist anzunehmen, dass eine permanente Stimulation des Immunsystems durch effektivere Impfstoffe die bisher erzielten Behandlungserfolge weiter verbessern könnten. Hinsichtlich dieser Ansätze und Problemstellungen lag der Schwerpunkt der hier vorliegenden Dissertation auf der Entwicklung von replizierenden Foamyvirus-basierten Vektoren als neue effektive Vakzinierungsmethode.

4.1 Konstruktion von replizierenden PFV- Δ Bet-Mutanten und Charakterisierung der Replikationseigenschaften *in vitro* sowie *in vivo*

4.1.1 Erstellung und Erprobung von replikationskompetenten PFV- Δ Bet-Basis-Vektoren

Erste Arbeiten aus dem Feld der Grundlagenforschung an Foamyviren lieferten die Basis für die Aufgabenstellung der vorliegenden Dissertation (Schmidt & Rethwilm 1995; Schwantes *et al.*, 2002). In diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass durch die genetische Modifikation von foamyviralen Genomen (PFV/FFV) die Expression von artfremden Antigenen bei gleichzeitigem Erhalt der viralen Replikation induziert werden kann. Durch die Anwendung eines replikationskompetenten FFV-Vektor-Expressions-Systems konnte eine gezielte Immunantwort im Katzenmodell stimuliert werden (Schwantes *et al.*, 2003). Im Fall von PFV führte der genetische Austausch von Teilen des *bet*-Leserahmens durch artfremde Antigensequenzen ebenfalls zur Expression von heterologen Proteinen unter Kontrolle der Replikation des viralen Vektorsystems (Schmidt & Rethwilm 1995). Dieser Ansatz sollte in der hier vorliegenden Arbeit aufgegriffen und

weitergeführt werden. Dazu wurde der virale Vektor pHSRV2/13 (PFV) in dieser Arbeit mehrfach genetisch modifiziert. In Bereich der akzessorischen Gene von PFV wurde eine „MCS“ in die virale Sequenz eingefügt. Dabei befindet sich die hier verwendete Schnittstelle (*SanDI*) 71bp stromaufwärts zu der verwendeten Schnittstelle (*AccI*) von Schmidt & Rethwilm (1995). Aufgrund von aufgetretenen technischen Problemen erfolgte anschließend der Austausch von Teilen der 5'LTR des Vektors PFV_{mcs} gegen ein CMV-IE-Promotor-Element, wodurch bei der Klonierung auftretende Rekombinationsereignisse reduziert werden sollten. Diese Technik zur Stabilisation von retroviralen Vektorsystemen wurde bereits mehrfach publiziert (Soneoka *et al.*, 1995; Möbes *et al.*, 1997; Schwantes *et al.*, 2002). Zusätzlich wurde ein spezieller *E. coli* Deletionsstamm (Clean Genome® *E. coli* MDS 42) eingesetzt, um die Rekombinationsereignisse in *E. coli* weiter zu minimieren (Chakiath *et al.*, 2007). Durch diese Optimierungsmaßnahmen konnte eine ausreichende Stabilität des Vektorsystems für nachfolgende gentechnische Modifikationen erzielt werden. Im Anschluss erfolgte die Konstruktion einer *Bet*-Deletionsmutanten (PFV Δ *bet*), um das Replikationsvermögen des Vektors pHSRV2 mit deletiertem *bet*-Leserahmen zu untersuchen. Zwischen den einzelnen Klonierungsschritten zu den jeweiligen Vektoren erfolgte eine Replikationskontrolle über die Induktion von Foamyvirus-typischen zytopathischen Effekten in Zellkultur. Wie bereits erwähnt, können bei einer foamyviralen Infektion *in vitro* sehr charakteristische zytopathischen Effekte unter dem Lichtmikroskop beobachtet werden. Dies wird durch die Env-vermittelte Fusion von Zellmembranen benachbarter Zellen induziert. Dieses Verfahren zur Bestimmung des Replikationsvermögens von foamyviralen Vektoren ist allgemein anerkannt und wurde mehrfach publiziert (Löchelt *et al.*, 1991; Herchenröder *et al.*, 1995; Mergia *et al.*, 1998). Dabei konnten alle erstellten PFV-Mutanten foamyvirustypische zytopathische Effekte in Zellkultur induzieren. Um das Replikationsverhalten der erstellten Vektoren genauer zu untersuchen und durch Messdaten belegen zu können, wurde ein qPCR-basierter Replikationsvergleich auf der Grundlage der $\Delta\Delta$ Ct-Methode nach Pfaffl (2001) angewandt. Die erzielten Ergebnisse sind in Abb. 6 aufgeführt. Vergleicht man die Messdaten von PFV_{mcs} und PFV *basic* mit dem PFV_{wt}, so konnten in allen Proben eine annähernd gleichwertige DNA-Reproduktion gemessen werden. Dies spricht für eine mit dem Wildtyp vergleichbare Replikationsgeschwindigkeit der Mutanten. Betrachtet man dagegen die erfassten relativen DNA-Mengen von PFV Δ *bet*, so konnte eine signifikante Minderung der DNA-Reproduktion verzeichnet werden. Dies spricht eindeutig für eine Beeinträchtigung der Replikationskompetenz durch die Deletion des *bet*-

Leserahmens. In der Publikation von Schmidt & Rethwilm (1995) konnte ebenfalls eine Reduktion des Virustiters (Titer ca. eine Log-Stufe weniger) durch Deletion des *bet*-Leserahmens gemessen werden. Durch den Übertrag von PFV Δ *bet*-infiziertem, zellfreiem Kulturmedium auf naive Zellen konnte dennoch eine erneute Infektion der Kultur erzielt werden. Dementgegen konnte bei der LTR-Deletionsmutante PFV Δ *del* keine Reproduktion von viraler DNA gemessen werden. Dies spricht für die Replikationsinkompetenz dieser Mutante. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Vektoren PFV*mcs*, PFV*basic* und PFV Δ *bet* die Fähigkeit zur funktionalen Partikelsynthese und Freisetzung *in vitro* beibehalten konnten. Folglich kann gesagt werden, dass durch die durchgeführten Modifikationen die grundlegende Replikationskompetenz von PFV erhalten werden konnte. Somit wurden die Daten früherer Publikationen bestätigt, bei denen die Replikation von Bet-Defizienten Foamyviren ebenfalls gezeigt werden konnte (Baunach *et al.*, 1993; Yu & Lineal 1993; Schmidt & Rethwilm 1995; Mergia *et al.*, 1998).

4.1.2 Anwendbarkeit der erstellten PFV-Mutanten im Kleintiermodell

Nachdem die Replikationseigenschaften der generierten PFV-Mutanten *in vitro* charakterisiert wurden, sollte die Replikationskompetenz *in vivo* untersucht werden. Dazu war es erforderlich, ein geeignetes Kleintiermodell für die Versuchsdurchführung auszuwählen. In Vorversuchen zu dieser Arbeit konnte eine dauerhafte antivirale Immunantwort in syrischen Goldhamstern durch PFV-Applikation erzielt werden. Deshalb erschien die Verwendung dieses Tiermodells für diese Arbeit als sinnvoll. Außerdem sollten bereits gewonnenen Daten reproduziert werden, um ein neues Kleintiermodell für foamyvirale Infektionsversuche zu etablieren. In einigen Publikationen konnte bereits die Replikation von SFV/PFV (pHSRV) in experimentell infizierten Kleintieren (Kaninchen und Mäuse) gezeigt werden (Swack & Hsiung, 1975; Hooks & Detrick-Hooks, 1979; Brown *et al.*, 1982; Saib *et al.*, 1997b; Schmidt *et al.*, 1997b). Um die hier erzielten Daten im Hamstermodell mit den bereits etablierten Kleintiermodellen vergleichen zu können, erfolgte die parallele Infektion von C57BL/6-Mäusen mit den viralen Vektoren. Dadurch erweiterte sich zusätzlich das Spektrum an immunologischen Methoden zum Nachweis einer spezifischen Immunantwort, da die Zahl der kommerziellen Antikörper-Assays für syrische Goldhamster stark begrenzt ist. Die Inokulation der Tiere mit den viralen Mutanten erfolgte mittels ballistischer Applikation von viralen Plasmiden. Dabei wurden die viralen Vektoren an Goldpartikel gebunden und mittels Luftdruck in das obere Hautepithel der Versuchstiere geschossen. Dadurch gelangten die viralen Vektoren in die Zellkerne

der oberen Hautzellen, wodurch die Replikation der Viren eingeleitet werden sollte. Der Beschuss der Versuchstiere erfolgte mit dem „Helios Gene Gun-System“ der Firma BioRad. Dieses ballistische Infektionsverfahren wurde bereits in anderen Arbeiten publiziert (Kent *et al.*, 2001; Liska *et al.*, 1999). Dabei bietet die Infektion durch reine virale Plasmide via Gene Gun eine Reihe von Vorteilen gegenüber der Infektionsmethode durch Lebendvirusüberstände. Einer der Hauptvorteile ist die kostengünstige und verhältnismäßig einfache Herstellung von viralen Plasmiden in großen Mengen. Damit in Verbindung steht auch das reduzierte Sicherheitsrisiko bei der Herstellung von viralen Vektoren im Vergleich zu infektiösen Lebendvirusüberständen. Des Weiteren ist die applizierte DNA frei von Verunreinigungen, wie z. B. in die Virionen interkalierte Zellproteine, welche in früheren Experimenten zur massiven Verfälschung der Ergebnisse geführt haben (Norley *et al.*, 1998). Weiterhin können Verunreinigungen durch Mediumbestandteile, unklassifizierte Virusstämme oder Mykoplasmen-Kontamination ausgeschlossen werden. Die Gene Gun-Applikation ist eine minimal invasive Methode, wodurch auf das Narkotisieren der Versuchstiere verzichtet werden kann. Auch ist die Lagerung und der Transport von Gen Gun-Munition, gegenüber der Verwendung von Lebendvirusüberständen, um ein vielfaches kostengünstiger. Dies könnte hinsichtlich der Verwendung von replikationskompetenten foamyviralen Vektoren als Vakzinierungsstrategie erhebliche Vorteile bieten. Als Nachteil dieser Methode können die hohen Kosten bei der Anschaffung und Wartung des Helios Gene Gun-Systems genannt werden. Aufgrund der hier aufgeführten Vorteile erschien es sinnvoll, dass bereits etablierte Infektionssystem in dieser Arbeit zu nutzen.

Die Replikationsfähigkeit der generierten viralen Vektoren PFVmcs und PFV Δ bet wurde *in vivo* untersucht. Zusätzlich erfolgte die Applikation der Vektoren pHSRV2/13 und PFVdel als Referenz. Nach 148 Tagen wurden zunächst die Tiere der PFV-Wildtypgruppen euthanasiert und obduziert, um die *in vivo* Replikation von PFV näher untersuchen zu können. Es konnte in allen Tieren eine PFV-spezifische Immunantwort gemessen werden (Abb. 7). Dabei wurden zwischen der Hamster- und Mausgruppe unterschiedliche Verläufe der stimulierten PFV-IgG Immunantwort verzeichnet. Bei den Hamstern konnte an Tag 127 nach Infektion ein auffälliger Abfall der Immunantwort gemessen werden, welcher in der darauf folgenden Abnahme wieder kompensiert wurde. Diese Beobachtungen konnte bislang noch keine andere Arbeitsgruppe vorlegen. Die genaue Ursache für diese beobachtete sogenannte „Peak-Phase“ konnte nicht geklärt werden. In zwei Studien von 1979 und 1993 wurde eine immunsuppressive Wirkung auf zellulärer Ebene durch die Infektion mit

Foamyviren im Kaninchen demonstriert (Hooks & Detrick-Hooks, 1979; Santillana-Hayat *et al.*, 1993). Jedoch konnte dieser Effekt nur innerhalb der ersten 14-30 Tage nach Infektion beobachtet werden. Somit scheint ein direkter Zusammenhang mit dem Absinken des Antikörpertiters unwahrscheinlich. Bei den Mäusen konnte dieses Muster nicht gezeigt werden (Abb. 7B & D). Nach 50 Tagen wurde ein Anstieg des PFV-spezifischen IgG-Titers mit anschließend konstantem Verlauf bis zum Versuchsende verzeichnet. Dies könnte auf ein verändertes Replikationsverhalten und damit verbundene immunstimulatorische Eigenschaften von PFV in BL6-Mäusen hindeuten. Um eine PFV-Replikation in beiden Tierarten nachzuweisen, erfolgten Virus-Re-Isolationsexperimente und der Pro-Virusnachweis in einzelnen Organen. Bei der Obduktion der Tiere wurden keine Auffälligkeiten oder pathologischen Veränderungen festgestellt. Dadurch konnte die allgemeine Hypothese der Apathogenität einer foamyviralen Infektion erneut bestätigt werden (u.A. Brown *et al.*, 1982; Saib *et al.*, 1997b; Falcone *et al.*, 2003). In keinem der getesteten Gewebe war eine Virusreplikation von PFV nachweisbar. In den Arbeiten von Swack & Hsiung (1975) und Brown *et al.* (1982) konnte die Replikation von Foamyviren in den Organen Milz und Lunge bei Mäusen und Kaninchen via Ko-Kultivierung nachgewiesen werden. In beiden Publikationen wurde jedoch ein simianes Primärisolat verwendet. Das hier verwendete Virus HSRV2/13 basiert auf dem 1971 isolierten, erstmals-entdeckten Foamyvirus aus einer humanen Gewebekultur und weist vermutlich dadurch erhebliche genetische Mutationen zu dem ursprünglich isolierten Virus auf. Dazu zählt als bekannte Mutation eine Deletion in der U3-LTR-Region, welche jedoch keine Einschränkung der Virusreplikation *in vitro* hervorruft (Schmidt *et al.*, 1997a). Jedoch ist denkbar, dass diese Mutationen eine Verminderung der Replikationskompetenz *in vivo* verursachen, wodurch der fehlgeschlagene Nachweis der Virusreplikation erklärt werden könnte. In der Arbeit von Schmidt *et al.* (1997b), bei den CBA/Ca und C57BL/6J Mäuse mit dem Virusstamm pHSRV2 infiziert wurden, konnte lediglich in 2 von 52 Fällen eine Virus-Re-Isolation gezeigt werden. Dies könnte die Vermutung bestätigen, dass diese Virusvariante eine basale *in vivo* Replikation am Rande der Nachweisgrenze aufweisen könnte. In dieser Arbeit konnte jedoch gleichzeitig bei allen getesteten Organproben der Pro-Virusnachweis mittels *nested* PCR geführt werden. Dies deckt sich nicht mit den erzielten Ergebnissen dieser Dissertation. In keinem der untersuchten Gewebe konnte provirale DNA mittels *nested* PCR nachgewiesen werden. Die Ursache hierfür ist unbekannt. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Virus-Re-Isolation aus Gewebszellen eine weitaus sensitivere Nachweismethode darstellt. Daher scheint es eher unwahrscheinlich, dass der PCR-Nachweis einer

Pro-Viruspräsenz positiv ausfällt, wenn die parallel durchgeführten Virus-Re-Isolationsversuche negativ verlaufen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass lediglich die permanente Expression von PFV-spezifischen Antikörpern über einen Zeitraum von 150 Tagen auf eine PFVwt-Replikation in Hamstern und Mäusen hinweisen könnte.

In den PFV Δ bet-Versuchsgruppen konnte eine mit dem PFVwt vergleichbare Immunantwort verzeichnet werden. Zwischen den Tagen 65 und 127 nach Infektion konnte ebenfalls eine „Peak-Phase“ der humoralen Immunantwort bei Hamstern beobachtet werden (Abb. 8C). Dies deutet darauf hin, dass durch die Applikation der Mutanten PFV Δ bet ein mit dem Wildtyp vergleichbarer immunologischer Effekt induziert werden konnte. Jedoch muss hierbei angemerkt werden, dass die Replikation der Δ Bet-Mutanten über ein CMV-IE-Promotorelement eingeleitet wurde. In früheren Publikationen konnte eine temporäre Stimulation von Immunantworten durch die Gene Gun-Applikation von CMV-Promotor gesteuerten, nicht replizierenden DNA-Vakzinen gezeigt werden (Haynes *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 1996; Davis, 1997; Hanke *et al.*, 1999). Somit kann durch die zweimalige Applikation der PFV-Vektoren ein möglicher CMV-Promotor vermittelter Gene Gun-DNA-Immunsierungseffekt nicht vollständig ausgeschlossen werden. Jedoch spricht gegen diese Vermutung der mit dem Wildtyp vergleichbare Verlauf der Immunreaktion in den Gruppen H3 / M3 (Abb. 7A & C und Abb. 8C & D). Ein weiteres Indiz für eine virale Replikation ist die langanhaltend starke und konstante PFV-gerichtete Antikörperantwort über einen Zeitraum von knapp 300 Tagen. In der Arbeitsgruppe, bei der diese Dissertation angefertigt wurde, ist das Verfahren der DNA-Immunsierung seit vielen Jahren etabliert (Siegismund *et al.*, 2009; Niederstadt *et al.*, 2012; Nguyen-Hoai *et al.*, 2012). Dabei konnte gezeigt werden, dass bei der Verwendung von nicht Kodon-optimierten DNA-Vakzinen, bei gleichzeitiger Abwesenheit eines genetischen Adjuvants (z.B. CCL19, GM-CSF) nur sehr niedrige Antikörper Titer induziert werden konnten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass nach mehrmaliger Applikation der DNA-Vakzine die induzierte Antikörperantwort zehn Wochen nach der letzten Immunsierung ein Maximum erreicht. Danach wurde in allen Experimenten ein Absinken des Antikörper-Titers verzeichnet. Durch die Applikation der replikationsinkompetenten Mutante PFV Δ del, welche ebenfalls einen CMV-Promotor beinhaltet, konnte keine PFV-spezifische Immunantwort in Hamstern induziert werden (Abb. 8E). Somit kann ein CMV-Promotor-induzierter immunologischer Effekt nahezu ausgeschlossen werden. Daher ist anzunehmen, dass der PFVwt sowie die PFV-Mutante PFV Δ bet trotz des fehlgeschlagenen Virusreplikationsnachweises im Stande waren, eine produktive Infektion

in Hamstern und Mäusen zu etablieren. Für die Mutante PFV_{mcs} kann diese Annahme nicht übernommen werden. Lediglich zwei Hamster zeigten einen Anstieg der PFV-spezifischen humoralen Immunantwort, welche sich jedoch deutlich von der mit dem Wildtyp infizierten Gruppe differenzierte (Abb. 8A). Bei den Mäusen wurde lediglich eine schwache, rückläufige Immunantwort gemessen (Abb. 8B). Somit ist anzunehmen, dass durch die minimale genetische Modifikation im Bereich der akzessorischen Gene die *in vivo* Replikationsfähigkeit der PFV_{mcs}-Mutanten stark eingeschränkt wurde. Abschließend kann jedoch gesagt werden, dass trotz eingeschränkter *in vitro* Replikationskompetenz der Bet-Deletionsmutante eine PFV_{wt}-äquivalente permanente Antikörperantwort induziert werden konnte, welche vermutlich durch eine basale Replikation der Mutanten stimuliert wurde. Die in dieser Arbeit generierten Daten zur Induktion einer PFV-gerichteten Immunantwort in Hamstern und Mäusen durch Gene Gun-Applikation von viralen Vektoren wurde bereits publiziert (Blochmann *et al.*, 2014).

4.2 Optimierung der PFV- Δ Bet-Mutanten für die Antigen-Präsentation und Charakterisierung der Replikations- und Expressionseigenschaften *in vitro*

4.2.1 Optimierung der im Tiermodell getesteten Basis-Vektoren

Auf Basis der gewonnenen Tierversuchsdaten erfolgte die Weiterentwicklung und Optimierung der PFV-Basisvektoren. Die Daten des Tierversuchs zeigten eine verminderte PFV-spezifische Antikörperantwort durch die Applikation der Mutanten PFV_{mcs}, wodurch eine verminderte *in vivo* Replikationskompetenz im Vergleich zu den anderen PFV-Mutanten angenommen werden konnte. Dabei ist es wahrscheinlich, dass die PFV_{mcs}-Replikationsfähigkeit *in vivo* durch die genetische Mutation am C-terminalen Ende des Tas-Proteins durch das Einfügen einer MCS-Sequenz verändert wurde. Die Substitution umfasst die letzten zehn AS der Tas-Sequenz. Dabei konnte in früheren Arbeiten der Bereich zwischen den AS 273 bis 287 von PFV-Tas als konservierte, für die Promotoraktivierung essentielle Sequenz ermittelt werden (He *et al.*, 1993; Venkatesh *et al.*, 1993). Somit liegt der in PFV_{mcs} substituierte Bereich (AS 290-300) außerhalb dieser essentiellen Sequenz, wodurch die Funktion von Tas offensichtlich nicht grundlegend beeinträchtigt wurde. Dies konnte in den *in vitro* Replikationsexperimenten gezeigt werden (Abb. 6). Dennoch führte diese Mutation offensichtlich zu einem eingeschränkten Replikationsvermögen *in vivo*. Die Mutante PFV Δ bet enthält ebenfalls diese Mutation des Tas C-Terminus (Tas Δ 1). Jedoch konnte in

den Tierversuchen eine mit dem Wildtyp vergleichbare Immunstimulation verzeichnet werden. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass die *Tasm1* verursachte Einschränkung der *in vivo* Replikation von PFVmcs durch die Deletion des *bet*-Leserahmens kompensiert werden konnte. Jedoch kann nicht gesagt werden, welche biologischen Mechanismen den hier beobachteten Effekt verursachten. Denkbar wäre aber ein Bet-Antagonisten Effekt, bei dem das Bet-Protein mit dem Transaktivator interagiert und so dessen Funktion beeinflusst. Dadurch könnte die mutationsbedingte eingeschränkte Funktionalität des *Tasm1*-Proteins zusätzlich blockiert werden, so dass die Aktivität von *Tasm1* stark eingeschränkt wurde. Infolgedessen könnte die Deletion des *bet*-Leserahmens diesen Effekt entgegenwirken. Da bislang keine Publikationen mit PFV-Bet-Deletionsmutanten *in vivo* vorliegen, können diese Ergebnisse nicht mit anderen Arbeiten verglichen werden. Somit bleibt die genaue Aufklärung dieser Beobachtungen offen.

Die Rekonstruktion der Tas-naiven-Sequenz der Mutante PFV Δ bet sollte zur Optimierung des Vektorsystems beitragen. Gleichzeitig sollte die *Tasm1*-Mutante für nachfolgende Versuche erhalten bleiben, um eventuelle funktionelle Unterschiede untersuchen zu können. Es erfolgte die Rekonstruktion der naiven Tas-Proteinsequenz (PFcV-T0) sowie die Konstruktion einer *Tasm1*-Mutante (PFcV-T1). Beide Konstrukte sollten parallel in allen nachfolgenden Experimenten getestet werden. Zusätzlich erfolgte die Eingliederung einer autokatalytischen Peptidsequenz des Maul- und Klauenseuche-Virus (2A-Peptid) (Ryan *et al.*, 1991) in den *bet*-Leserahmen der Klone PFcV-T0 und PFcV-T1. Dadurch sollte die zellunabhängige Abspaltung des in die MCS eingefügten Antigens vom fusionierten N-terminalen Teil des Bet-Proteins prozessiert werden. Die Verwendung und Funktionalität des 2A-Peptids konnte bereits in einigen Publikationen gezeigt werden (Ryan & Drew 1994; Schmidt & Rethwilm 1995). Zusätzlich erfolgte die Konstruktion eines weiteren Basis-Vektors (PFcV-T2a) mit angegliederter 2A-Peptidsequenz an den naiven *tas*-Leserahmen von PFcV-T0. Dadurch sollte das Spektrum an Basis-Vektoren erweitert werden. Die erstellten Vektoren wurden parallel in BHK-21-Zellen transfiziert, um die Replikationskompetenz der optimierten PFV-Vektoren mittels qPCR vergleichen zu können. Die erzielten Ergebnisse sind in Abb. 11 aufgeführt. Vergleicht man die virale DNA-Menge der Mutante PFcV-T0 und PFcV-T1, so kann geschlussfolgert werden, dass durch die Rekonstruktion der Tas-naiv Sequenz eine Steigerung der Replikationsfähigkeit erzielt wurde. Im Umkehrschluss wurde deutlich, dass die Mutation der letzten zehn AS der Tas-Sequenz durch das Einfügen einer MCS die *in vitro* Replikation der Δ Bet-Mutanten beeinträchtigt. Wie bereits erwähnt, umfasst das C-terminale Ende von Tas eine

essentielle Sequenz für die Promotoraktivierung. Die Mutation der *Tasm1*-Sequenz liegt außerhalb dieses relevanten Bereichs. Allerdings befindet sich die Mutation unmittelbar hinter dieser Sequenz, wodurch ungewollte Wechselwirkungen wahrscheinlich sind. Die dadurch verursachte eventuelle Beeinflussung der Promotoraktivierung könnte die Beeinträchtigung der Replikationseffizienz *in vitro* erklären. Vergleicht man die Messdaten von PFCV-T0 nach dem ersten zellfreien Übertrag der viralen Überstände mit dem PFVwt, so repliziert der PFVwt mit einer ungefähr doppelten Effizienz der DNA-Reproduktion. Diese Einschränkung von PFCV-T0 könnte auf den Verlust des funktionalen Bet-Proteins zurückgeführt werden. In früheren Publikationen konnte bereits eine Minderung der Replikationseffizienz von SFV durch Deletion des *bet*-Leserahmens gezeigt werden (Schmidt & Rethwilm 1995; Mergia *et al.*, 1998). Die Messdaten der um eine 2A-Schnittstelle erweiterten Basis-Vektoren PFCV-T0a und PFCV-T1a zeigten im Vergleich zu den äquivalenten Ausgangsvektoren keine Einschränkung der Replikationseffizienz. Somit wurde angenommen, dass die eingefügte 2A-Sequenz keinen Auswirkungen auf die Replikation der Vektoren verursacht. Dagegen zeigt die Mutante PFCV-T2a eine deutliche Einschränkung der Replikationskompetenz. Dies ist vermutlich ebenfalls auf die Modifikation des C-terminalen Endes des *Tas2a*-Proteins zurückzuführen. Jedoch konnte nach Übertrag von zellfreien, virulenten Kulturmedium auf naive Zellen ein erneuter Anstieg der viralen DNA-Menge gemessen werden. Somit konnte die Funktionalität der Virusreplikation der *Tas2a*-Mutanten bestätigt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch die genetische Optimierung der Mutanten PFV Δ bet fünf Basis-Vektoren (siehe Abb. 10) mit variablen Replikationseigenschaften generiert werden konnten. Dabei konnte durch die Rekonstruktion der naiven *Tas*-Sequenz eine Steigerung der Replikationsgeschwindigkeit erzielt werden.

4.2.2 Konstruktion von Fremdantigen-exprimierenden PFV-Hybridviren

Die zuvor durchgeführten Tierversuche zeigten eine permanente und langanhaltende Immunstimulation gegen virale PFV-Proteine nach Applikation der konstruierten PFV-Mutanten. In den darauffolgenden Experimenten sollte die Expression von heterologen Antigenen unter Kontrolle der viralen Replikation gezeigt werden, um gezielt eine spezifische Immunantwort gegen definierte Antigene zu stimulieren. Um den Nachweis der prinzipiellen Funktionalität der heterologen Antigenexpression zu vereinfachen, erfolgte die Konstruktion von GFP-exprimierenden Hybridviren auf Basis der Mutanten PFCV-T0a, PFCV-T1a und PFCV-T2a. Durch die Verwendung

der 2A-Peptid enthaltenden Basis-Vektoren sollte die ungehinderte Faltung der Quartärstruktur des GFPs gewährleistet werden, um die virusgesteuerte Fremdgenexpression unter dem Fluoreszenzmikroskop nachzuweisen. Gleichzeitig konnte durch die Verwendung von GFP als Modellantigen die zelluläre Lokalisation der prozessierten Antigene *in vitro* mikroskopisch untersucht werden. Die Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte bei allen drei GFP-Hybridviren (PFhV-T0a<GFP>, PFhV-T1a<GFP>, PFhV-T2a<GFP>) die Expression von GFP in infizierten Zellen nachweisen. Auch konnten die Foamyvirus-typischen zytopathischen Effekte beobachtet werden, was auf den Erhalt der Virusreplikation hindeutete. Einen fundierten Beweis für den Erhalt der Virusreplikation der erstellten GFP-Hybridviren lieferte der zellfreie Übertrag von infektiösen Zellkulturüberständen auf naive Zellen, wodurch erneut zytopathische Effekte und GFP-Expression in den Zellen induziert wurden. Somit konnte die Freisetzung von funktionalen Viruspartikeln in den Kulturüberstand infizierter Zellen angenommen werden. Auch deutete die erneute Expression von GFP in infizierten Zellen auf eine funktionale horizontale Weitergabe der künstlich eingefügten Erbinformation durch die Impfviren hin. Somit konnte angenommen werden, dass durch das konstruierte PFV-Vektor-Expressions-System eine permanente Präsentation von definierten Antigenen möglich ist. Durch diese Ergebnisse wurden die Daten von Schmidt & Rethwilm (1995) bestätigt. In dieser Arbeit konnte die virusgesteuerte Expression eines *mhv-s* (*mouse hepatitis virus surface*) Gens durch eine PFV- Δ Bet-Mutante gezeigt werden. Dabei entspricht die Größe des verwendeten Genabschnitts ungefähr der Größe des hier eingefügten *gfp*-Gens. In der Publikation von Schwantes *et al.*, (2002) konnte ebenfalls die Expression von GFP durch einen FFV-basierten replikationskompetenten Vektor gezeigt werden. Jedoch sind die Replikationseigenschaften von FFV und der genetische Aufbau der in dieser Publikation verwendeten Vektoren mit dem hier konstruierten PFV-Vektoren nicht kompatibel, wodurch ein direkter Vergleich der Ergebnisse nicht möglich ist.

Bei der mikroskopischen Analyse der GFP-Expression in infizierten BHK-21-Zellen konnte bei der Mutante PFhV-T2a<GFP> eine Lokalisation der GFP-Moleküle vorwiegend innerhalb der Zellkerne gezeigt werden. In Abb. 15 A, B & D sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von PFhV-T2a<GFP>-infizierten Zellstrukturen aufgeführt. Dagegen zeigt Abb. 15C eine PFhV-T0<GFP>-infizierte Kultur ohne grün fluoreszierende Zellkerne. Die gezeigte vorwiegende Kernlokalisierung der GFP-Moleküle könnte auf die Tas-gebundene GFP-Expression zurückgeführt werden. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, verfügt der Transaktivator Tas über ein Kernlokalisierungssignal

(NLS), wodurch das Protein in den Zellkern transportiert wird, um den Replikationszyklus der Foamyviren einzuleiten (He *et al.*, 1993; Venkatesh *et al.*, 1993). Vermutlich ist das im Fusionsprotein Tas-2A-GFP enthaltene NLS für den Kerntransport von GFP verantwortlich. Denkbar wäre eine unvollständige Spaltung des Fusionsproteins, wodurch sich das GFP im Zellkern anreichern konnte. Abb. 15A und B zeigt eine Zellstruktur, welche für eine foamyvirale Infektion *in vitro* typisch ist. Innerhalb der gezeigten Synzytie sind Vakuolen ähnliche Strukturen zu erkennen. Der Erhalt dieser typischen zytopathischen Effekte könnte trotz der massiven genetischen Veränderungen bei PFhV-T2a<GFP> auf den Erhalt eines Wildtyp-vergleichbaren Replikationsmechanismus hindeuten. Jedoch zeigte die mikroskopische Dokumentation des Infektionsverlaufs eine erhebliche Reduktion der Replikationsgeschwindigkeit, wodurch von einer weiteren Verwendung dieser Mutanten in nachfolgenden Versuchen abgesehen wurde. Die Expression der viralen Antigene und des rekombinant eingefügten GFPs konnten mittels Western Blot bestätigt werden. Der in Abb. 16A dargestellte WB zeigt Proteinbanden in Hybridvirus infizierten Zelllysaten, welche spezifisch mit einem PFV-infiziertem Hamsterserum detektiert wurden. Somit konnte die Expression viraler PFV-Proteine durch die PFV-Mutanten bestätigt werden. Abb. 16B zeigt Signale, welche mit dem mAb 2F5 detektiert wurden. Somit konnte die Expression des N-terminal angefügten 2F5-Epitops sowie des Antigens ebenfalls bestätigt werden. Die zusätzlichen Banden (15 kDa) stellen vermutlich GFP-Abbauprodukte dar. Vergleicht man die GFP-Bandenintensität von Spur 6 und Spur 8, so konnte in Spur 8 eine Reduktion der GFP-Moleküle gezeigt werden, obwohl beide Zelllysate in Abb. 16A eine nahezu gleiche PFV-Bandenintensitäten aufweisen. Die genaue Ursache hierfür bleibt unklar. Denkbar wäre aber eine Minderung der GFP-Expression durch die Verwendung des *tas*-Leserahmens. Wie bereits erwähnt, treten bei der Wildtypinfektion Δ Tas spleiß Varianten auf, wodurch der *tas*-Leserahmen zerstört wird. Demzufolge könnte die GFP-Expression im Laufe der Zeit verloren gehen. In der Publikation von Schwantes *et al.*, (2002) konnte der Verlust der FFV-Vektor gebundenen GFP-Expression im Laufe von zehn zellfreien Viruspassagen gezeigt werden. In dieser Arbeit konnten genetische Mutationen des Vektorsystems als Ursache für den Expressionsverlust identifiziert werden. Dabei wurde die genetische Stabilität der GFP-Hybridviren in dieser Arbeit nicht untersucht, da diese Konstrukte lediglich zum Nachweis der virusgesteuerten Fremdgenexpression entwickelt wurden und nicht im Tiermodell getestet werden sollten.

4.2.3 Konstruktion von HIV- und Prostataantigen-exprimierenden Impfvektoren

Nachdem die replikationsgesteuerte Expression von GFP durch das entwickelte virale Vektorsystem bewiesen werden konnte, erfolgte die Konstruktion von Antigen präsentierenden Hybridviren, um gezielt eine spezifische Immunantwort gegen definierte HIV- und Prostata-Antigene induzieren zu können. Als Modellantigene wurden das humane PSCA als Prostata-Antigen und der HIV-CTL-multi-Epitop-String (H-Protein) von Hanke *et al.* (1998a) eingesetzt. Dabei sollte das membranständige PSCA vorwiegend humorale Immunreaktionen induzieren, während der HIV-CTL-Epitop-String vorwiegend das zelluläre Immunabwehrsystem stimulieren sollte. Für beide Antigene konnten potentielle immunstimulatorische Eigenschaften bereits bewiesen werden (Reiter *et al.*, 1997; Hanke *et al.*, 1998a; 1998c; 1999). Es folgte die Klonierung der Antigensequenzen in die *bet*-Leserahmen der optimierten Basis-Vektoren, wodurch sechs neue Hybridviren generiert wurden. Durch *in vitro* Transfektion der neuen Mutanten konnte erneut ein typischer zytopathischer Effekt induziert werden. Die Freisetzung von infektiösen Virionen in den Zellkulturüberstand konnte ebenfalls durch erneute Infektion von naiven Zellen gezeigt werden. Von infizierten Zellen wurden WB-Proben entnommen, um die Antigenexpression der Hybridviren nachzuweisen. Dabei konnte die Expression des 2F5-Epitop markierten H-Proteins durch die HIV-CTL-Hybridviren gezeigt werden. Der Nachweis der Δ Bet-2F5-PSCA Expression durch die Viren PFhV-T0<PSCA> und PFhV-T1<PSCA> konnte jedoch nicht erbracht werden. Daher konnte angenommen werden, dass die Hybridvirus gebundene PSCA-Expression durch das Antigen selbst beeinträchtigt wurde, da die prinzipielle Funktionalität des Vektor-Expressions-Systems über die Expression der Antigene GFP, Δ Bet-2F5-HIV-CTL-Epitop-Protein und Δ Bet-2A-2F5-HIV-CTL-Epitope-Protein bewiesen werden konnte (siehe Abb. 19). Die hierzu durchgeführte Ursachenforschung führte zu keiner Aufklärung des Sachverhalts. Durch die gestörte Fremdgen-Prozessierung erhielten jedoch die PSCA-Hybridviren vermutlich einen Replikationsvorteil gegenüber den anderen Hybridviren. Dies konnte in dem durchgeführten Replikationsvergleich aller Konstrukte via qPCR gezeigt werden und wurde unter Punkt 4.2.4 genauer diskutiert. Aufgrund der vorgelegten Daten wurde auf die Konstruktion weiterer PSCA-Hybridviren verzichtet.

Um eine effektive und permanente Immunantwort gegen die eingefügten Antigene der Hybridviren induzieren zu können, war es essentiell, dass die Expression der heterologen Fremdartigene über einen langen Zeitraum stabil bleibt. Dies wurde durch ein Langzeit-Infektionsexperiment *in vitro*

überprüft. Nach fünf zellfreien Virusüberträgen (68 Tage nach Infektion) wurde die Stabilität der Fremdantigenexpression auf DNA- und Protein-Ebene untersucht. Der Nachweis auf DNA-Ebene erfolgte mittels PCR auf Zelllysaten infizierter Zellen und Sequenzierung der erhaltenen PCR-Fragmente. Die Ergebnisse sind in Abb. 18 aufgeführt. Dabei konnte die genetische Stabilität der künstlich veränderten Genabschnitte der Hybridviren nach fünf Viruspassagen bewiesen werden. Die Sequenzierung der gewonnenen Genabschnitte zeigten eine 100%ige Übereinstimmung mit der Ausgangssequenz. Auch konnten keine Nebenbanden im Gelbild gezeigt werden, welche auf eine ungewollte Degeneration hindeuten würden. Mittels WB konnte die stabile Expression der Proteine Δ Bet-2F2-HIV-CTL-Epitop und Δ Bet-2A-2F2-HIV-CTL-Epitop durch die HIV-CTL-Hybridviren nachgewiesen werden. Die Expression von PFV-Antigenen konnte ebenfalls bestätigt werden (Abb. 19A). Abb. 19B zeigt Proteinbanden, welche in infizierten Zelllysaten durch den mAb 2F5 detektiert wurden. Die gezeigten Banden entsprachen - gemessen an den Markerbanden des Proteinstandards - den theoretischen Größen. Auch konnten keine Nebenbanden gezeigt werden, wodurch eventuelle ungewollte Spleißprodukte oder degenerierte Proteine ausgeschlossen werden konnten. Auf dem Film des entwickelten WB's konnten bei den 2A-Peptid enthaltenen Hybridviren PFhV-T0a<CTL> und PFhV-T1a<CTL> schwache Banden in Höhe von ca. 55 kDa gesichtet werden. Die Lage der Banden wurde in der Abb. 19B markiert (*). Diese Banden repräsentieren das un-prozessierte Δ Bet-2A-2F2-HIV-CTL-Epitope-Protein (53,1 kDa). Somit konnte die Vermutung bestätigt werden, dass die Prozessierung durch das 2A-Peptid zu gewissen Teilen unvollständig abläuft. Diese Daten bestätigten demnach, dass die in Abb. 15 gezeigte Kernlokalisation des GFP-Moleküls in PFhV-T2a<GFP>-infizierten Zellen durch unvollständige Prozessierung des Tas-2A-GFP-Proteins verursacht wurde. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Antigene in hohen Konzentrationen exprimiert wurden, wodurch von einer permanenten Präsentation der Antigene durch infizierte Zellen ausgegangen werden kann.

Durch die gezeigten Ergebnisse konnte die Stabilität der Antigenexpression auf DNA- und Protein-Ebene bewiesen werden. In der Publikation von Schmidt & Rethwilm (1995) konnte die stabile Antigenexpression eines ca. 1,3 kb großen Fragments über den Zeitraum von zehn Virusüberträgen gezeigt werden. Dies untermauert die Stabilität des entwickelten PFV-Expressions-Vektorsystems. Die Publikation von Schwantes *et al.*, (2003) zeigte jedoch den Verlust der FCV-Antigenexpression durch einen replizierenden Vektor auf FFV-Basis. Dabei umfasste das zu exprimierende Antigen lediglich eine Sequenzgröße von 435 bp. Innerhalb weniger Passagen konnte die Degeneration des

Vektorsystems gezeigt werden, wodurch die Expression des Antigens verloren ging. Dabei weist das Entwickelte FFV-Vektorsystem hinsichtlich der hier angewandten Technik der Antigenexpression essentielle genetische Unterschiede auf. Das beschriebene System von Schwantes *et al.* beinhaltet den kompletten FFV-*bet*-Leserahmen, an den nachfolgend die Sequenz des Antigens angegliedert wurde. Dadurch befindet sich die FCV-Antigensequenz direkt zwischen repetitiven LTR-Sequenzen, wodurch vermutlich die Instabilität des FFV-Vektor-Systems begünstigt wurde. Somit ist ein direkter Vergleich mit dem hier entwickelten PFV-Vektor-System nicht möglich, da die Antigensequenz vor den entsprechenden PFV-LTR-Sequenzen lokalisiert wurde.

Abschließend kann gesagt werden, dass durch die genetische Modifikation des viralen Genoms pHSRV2/13 ein stabil-replizierendes Vektor-Expressions-System generiert werden konnte, welches definierte Antigene dauerhaft *in vitro* exprimiert und die dafür erforderliche Erbinformation horizontal auf andere Zellen überträgt.

4.2.4 qPCR-basierter Replikationsvergleich der PFV-Hybrid-Vektoren *in vitro*

Durch *in vitro* Transfektion der erstellten PFV-Hybridviren konnte die Induktion von zytopathischen Effekten unter dem Mikroskop nachgewiesen werden. Der darauffolgende Übertrag des virulenten Zellkulturmediums auf naive Zellen führte erneut zur Ausbildung von typischen zytopathischen Effekten, wodurch die Replikationskompetenz der PFV-Hybridviren angenommen wurde. Dabei konnten Unterschiede zwischen den einzelnen Mutanten hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs der CPE-Induktion verzeichnet werden. Dies deutete auf ein verändertes Replikationsverhalten durch die vorgenommenen genetischen Mutationen hin. Mit dem entwickelten qPCR-basierten Replikationsvergleich konnten diese Unterschiede durch Messdaten erfasst und bestätigt werden. Die dabei erzielten Ergebnisse sind in den Abb. 20 und Abb. 21 aufgeführt. Bei allen getesteten Viren konnte ein Anstieg der viralen DNA-Menge im zeitlichen Verlauf gemessen werden. Auch nach Übertrag von zellfreiem Kulturmedium auf naive Zellen konnte erneut eine Reproduktion der viralen DNA im Zelllysate verzeichnet werden. Dies belegte eindeutig die Funktionalität der viralen Replikation aller PFV-Hybridmutanten. Jedoch zeigten die Ergebnisse Unterschiede in der Replikationseffizienz der jeweiligen Hybridviren. Wie schon bei der mikroskopischen Dokumentation deutlich wurde, replizieren die Hybridviren deutlich langsamer als die dazu äquivalenten Basis-Vektoren. Im Laufe des Replikationsversuchs konnte bei allen GFP- und HIV-CTL-Epitop-exprimierenden Hybridviren eine deutliche Reduktion der DNA-Repro-

duktion gemessen werden. Daher kann angenommen werden, dass die künstliche Expression von heterologen Fremdantigenen die virale Fitness allgemein beeinträchtigt. Die gemessenen DNA-Reproduktion der Mutanten PFhV-T0<PSCA> und PFhV-T1<PSCA> können diese Annahme bestätigen. Bei beiden Vektoren konnte keine Expression des Antigens nachgewiesen werden. Dadurch ist denkbar, dass der hier gemessene Replikationsvorteil beider Hybridviren durch die fehlerhafte Antigenexpression begünstigt wurde. In den vorangegangenen Versuchen konnte die genetische Stabilität aller Vektoren bewiesen werden. Somit konnte ein Replikationsvorteil durch die Basenreduktion des viralen Genoms ausgeschlossen werden. Der einzige Unterschied bestand somit in der Funktionalität der Fremdgenexpression. Welcher Mechanismus der Steigerung der Replikationseffizienz zugrunde liegt bleibt unklar.

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass durch die gezielte genetische Modifikation des Vektors pHSRV2/13 ein stabil-replizierendes PFV-Vektor-Expressions-System mit unterschiedlichen Replikations- und Expressionseigenschaften generiert werden konnte. In den nachfolgenden Tierversuchen sollte dieses virale Vektor-Expressions-System auf die Anwendbarkeit als neue Vakzinierungsstrategie getestet werden. Dabei sollte das optimale Vektorsystem für die Induktion einer starken Immunreaktion ermittelt werden.

4.3 Immunisierung von Hamstern und Mäusen durch Applikation von replizierenden Impfviren und Bewertung der resultierenden Immunantwort

4.3.1 Replikationsnachweis der Impfviren *in vivo*

Die generierten PFV-Hybridviren wurden im zuvor etablierten Kleintiermodell auf ihre Funktionalität als Immunstimulatoren getestet. Der Versuchszeitraum wurde auf 400 Tage angesetzt, um den gewünschten Langzeiteffekt der neuen Vakzinierungsmethode erfassen zu können. Die Infektion der Versuchstiere mit den optimierten viralen Vektoren erfolgte erneut über Gene Gun-Inokulation. Dabei wurden die Versuchstiere lediglich einmal mit den Impfvektoren inokuliert, um eine denkbare DNA-Immunisierung durch mehrfache Applikation ausschließen zu können. Zusätzlich wurden replikationsdefiziente PFV-Impfvektoren generiert und appliziert, um eindeutig einen eventuellen CMV-Promotor-vermittelten „Gene Gun-Effekt“ nachweisen oder ausschließen zu können. Die einmalige Applikation der Tas-naiven Impfvektoren (Basisvektor PFcV-T0) konnte in allen Gruppen (H5-H9) eine PFV-spezifische Antikörperantwort induzieren.

In Abb. 23 sind die Ergebnisse des durchgeführten PFV-ELISAs aufgeführt. Dabei konnte in fast allen Individuen eine permanente humorale Immunantwort stimuliert werden. Eine anfängliche „Peak-Phase“ der Immunantwort, wie sie in der ersten Tierversuchsphase bei den Hamstern beobachtet wurde, konnte in diesem Experiment nur ansatzweise bei den Tieren der Gruppen H7 und H9 vermutet werden. Die Ursache hierfür ist unklar. Es ist jedoch vorstellbar, dass die zweimalige Applikation der Vektoren eine Verstärkung der Startinfektion induzierte, wodurch die in Tierversuchs-Phase I beobachtete anfängliche „Peak-Phase“ der Immunantwort stimuliert wurde (siehe Abb. 7). Um dies zu bestätigen, müsste dieser Tierversuch mit zweimaliger Applikation der Vektoren wiederholt werden.

Bei drei Hamstern der Gruppen H5-H9 konnte nach Applikation der Impfvektoren keine Stimulation des Immunsystems verzeichnet werden. Auch bei der Kontroll-Gruppe H13 konnten keine PFV-spezifischen Antikörper detektiert werden. Durch die Applikation der *Tasm1*-basierten Impfviren (Basis-Vektor PFcV-T1) konnte lediglich in drei Tieren der Gruppen H10-H12 eine schwache aber permanente anti-PFV-Immunantwort stimuliert werden (Abb. 24). Durch diese gemessenen Daten könnte man zu folgender Schlussfolgerung gelangen: Die einmalige Applikation der Impfviren führt nur dann zur Stimulation einer PFV-gerichteten Immunantwort, wenn sich eine produktive Infektion der Impfviren nach einmaligem Beschuss im Wirt etablieren konnte. Somit könnten die PFV-Antikörper-negativen Tiere als Infektionsausfälle gewertet werden. Diese Hypothese kann durch folgende Beobachtungen untermauert werden: Die nahezu konstante und ausgeprägte Immunantwort, welche über einen Zeitraum von knapp 400 Tagen gemessen werden konnte, ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Stimulation der Immunzellen durch die permanente Präsenz der viralen Antigene dauerhaft aufrecht erhalten wurde. Dies könnte wiederum auf eine persistente virale Replikation der Impfviren im Kleintiermodell hindeuten. Einen weiteren Hinweis auf die Replikation der PFV-Mutanten *in vivo* lieferte der unterschiedliche Verlauf der Immunreaktion zwischen den Versuchsgruppen der *Tas*-naiven und der *Tasm1*-Mutanten. Hinsichtlich der induzierten starken Immunantwort in den *Tas*-naiven-Hamsterguppen (H5-H9) zeigten die Versuchsgruppen H11 und H12 eine deutlich schwächere PFV-gerichtete Immunantwort. Dies könnte auf eine schwächere *in vivo* Replikation der *Tasm1*-Mutanten hindeuten, wie dies auch *in vitro* gezeigt werden konnte und durch die Modifikation des C-terminalen Endes von *Tas* induziert wurde. Auch die offensichtlich hohe Infektionsausfallquote von 66% (6 von 9 negativ) bei den Gruppen H10-H12 deutet auf eine schwächere Startinfektion durch

Replikationsdefizite der *Tasm1*-Mutanten hin. Dagegen zeigten die Gruppen H5-H9 lediglich eine Ausfallquote von 21% (3 von 14), wodurch eine effizientere Startinfektion der Tas-naiv-Vektoren angenommen werden konnte. Somit liegt nahe, dass das variable Profil der induzierten Immunantwort durch die unterschiedlichen Replikationseigenschaften der Impfviren stimuliert wurde. Dadurch kann ein CMV-Promotor-induzierter „Gene Gun-Effekt“ nahezu ausgeschlossen werden. Der fehlende Nachweis von PFV-spezifischen Antikörpern in der Kontroll-Gruppe H13 bestätigt diese Annahme.

Die gemessenen ELISA-Ergebnisse des durchgeführten Mausversuchs könnten ebenfalls als eine replikationsabhängige Immunreaktion auf die Impfviren-Infektion interpretiert werden (Abb. 25). Maus M5/1 und M5/2 wurden mit der Tas-naiv-Basis-Mutanten PFcV-T0 inokuliert. Beide Tiere zeigten innerhalb des Versuchszeitraums eine anfangs starke, dann abfallende Immunantwort gegen PFV, wie dies auch in den vorherigen Mausinfektionsversuchen gezeigt werden konnte (Abb. 8). Dagegen zeigten die Tiere M5/3 und M5/4 keine eindeutige Reaktion gegen die applizierte *Tasm1*-Mutante PFcV-T1. Auch die Gruppen M6 und M7, welche mit den Hybridviren des Basis-Vektors PFcV-T0 inokuliert wurden, zeigten eine stärkere Immunantwort als die mit *Tasm1*-Hybridviren inokulierten Gruppen M8 und M9. Somit kann geschlossen werden, dass auch im Mausmodell die Stärke der induzierten Immunantwort von der Replikationseigenschaften des applizierten Impfvirus abhängig ist, wodurch sich die Interpretation der Daten aus dem Hamsterversuch bestätigt.

Den endgültigen Beweis für die *in vivo* Replikation der in dieser Arbeit erstellten Vektoren lieferte die Virus-Re-Isolation des applizierten Hybridvirus PFhV-T0<PSCA> aus dem Gewebe des Hamsters H7/3 knapp 400 Tage nach Applikation. Somit konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die stimulierte Immunantwort gegen PFV durch die Replikation des applizierten Impfvirus induziert wurde. Dadurch wurde die oben formulierte Hypothese bestätigt. Durch die gleichwertige Immunantwort allen Tas-naiv-Gruppen H5-H9 wurde laut der oben formulierten Hypothese die Replikationskompetenz aller im Tiermodell getesteten Tas-naiv-basierten PFV-Mutanten angenommen. Auch gibt es Hinweise darauf, dass die *Tasm1*-basierten Mutanten zumindest zeitweise eine Infektion in der Maus etablieren konnten. Die Argumentationskette für diese Behauptung ist im nachfolgenden Abschnitt formuliert.

Aufgrund der erfolgreichen Re-Isolation des PSCA-Hybridvirus PFhV-T0<PSCA> aus Hamster H7/3 konnte die genetische Stabilität des Impfvektors nach über einem Jahr persistierender

Replikation *in vivo* untersuchen werden. Die genetische Analyse des modifizierten Bereichs zwischen dem N-terminalen Teil von Bet und der 3'LTR ergab eine 99,72%ige Übereinstimmung mit der Ausgangssequenz. Dies belegt eindeutig die genetische Stabilität der Mutanten PFhV-T0<PSCA> *in vivo* über einen Zeitraum von knapp 400 Tagen. Über die genetische Integrität der HIV-CTL-Epitop-Hybridviren konnte, aufgrund der fehlgeschlagenen Re-Isolationsversuche, keine abschließende Aussage getroffen werden. Dabei ist jedoch anzunehmen, dass die anderen Hybridmutanten ein ähnlich stabiles Replikationsverhalten *in vivo* aufweisen, wie dies zuvor auch *in vitro* bewiesen werden konnte (siehe Abb. 18). In früheren Publikationen konnte eine allgemein hohe genetische Integrität bei der persistierenden Replikation von SFV-Wildtypstämmen im natürlichen Wirt gezeigt werden. Phylogenetische Untersuchungen von replizierenden Viren *in vivo* zeigten über einen längeren Zeitraum eine äußerst geringe Evolutionsrate der viralen Genetik (Schweizer *et al.*, 1999; Switzer *et al.*, 2005). Auch bei der zoonotischen Infektion von SFV im Menschen konnte eine äußerst geringe Mutationsrate über einen langen Zeitraum (bis zu 30 Jahre) verzeichnet werden (Delebecque *et al.*, 2006, Mouinga-Ondémé & Kazanji, 2013). Inwieweit diese Beobachtungen der Wildtypinfektion auf das hier generierte Vektorsystem übertragbar sind, kann nicht gesagt werden. Es konnte gezeigt werden, dass durch die drastischen genetischen Veränderungen der viralen Genetik von PFV die Replikationseigenschaften der viralen PFV-Mutanten *in vitro* verändert wurden (siehe 4.2.4). Somit wäre denkbar, dass die vorgenommenen genetischen Modifikationen auch die natürliche genetische Stabilität der Viren beeinträchtigen könnten. In einigen Publikationen konnte eine gesteigerte Mutationsrate der foamyviralen Genetik durch Einfluss der zellulären anti-retroviralen Abwehrmechanismen der murinen, simianen und humanen APOBEC-Proteinfamilie gezeigt werden. Die dabei erzielten Ergebnisse *in vitro* zeigten eine Interaktion des viralen Bet-Proteins mit den zellulären APOBEC3C-Proteinen, wodurch eine HIV-Vif ähnliche Funktion des Bet-Proteins angenommen wurde (Löchelt *et al.*, 2005; Russell *et al.*, 2005; Perkovic *et al.*, 2009). Im Umkehrschluss wäre demnach logisch, dass die Deletion des *bet*-Leserahmens einen deutlichen Anstieg der APOBEC3-vermittelten Cytidin-Deaminierungen (G zu A) im Genom des Re-Isolates PFhV-T0<PSCA> hervorrufen müsste. Jedoch wurden lediglich zwei G zu A und eine A zu G Mutationen im Bereich des sequenzierten Abschnitts des Re-Isolates PFhV-T0<PSCA> identifiziert. Dabei betrug die Mutationsrate 0,26% nach knapp 400 Tagen Replikation *in vivo*. Angesichts dieser Beobachtung kann der Einfluss der APOBEC3-vermittelten Zellabwehrmechanismen des Hamsters auf die Replikation der Δ Bet-Hybridviren als eher sehr gering

eingeschätzt werden. Diese Annahme kann auch durch die Ergebnisse von Delebecque *et al.*, (2006) untermauert werden. In dieser Arbeit konnte ebenfalls ein Einfluss von murinen, simianen und humanen APOBEC3 auf die *in vitro* Replikation von SFV gezeigt werden. Jedoch konnte keine funktionelle Interaktion zwischen den Proteinen Bet und APOBEC3 beobachtet werden. Die Sequenzanalyse des SFV-Wildtyps aus langzeitinfizierten Menschen zeigte ebenfalls keine Hinweise auf den Einfluss von APOBEC3 auf die virale Mutationsrate. Somit wurde der Effekt der anti-retroviralen Zellabwehrmechanismen auf die foamyvirale Replikation *in vivo* ebenfalls als eher sehr geringfügig eingeschätzt. Hinsichtlich dieser Ergebnisse kann also davon ausgegangen werden, dass die in dieser Arbeit erstellten Impfvektoren eine stabile und persistierende Infektion im getesteten Kleintiermodell etablieren konnten und demnach prinzipiell dafür geeignet sind, eine längerfristige Stimulation des Immunabwehrsystems aufrecht zu erhalten.

4.3.2 Auswertung der Vektor-stimulierten Immunantwort gegen heterologe Fremdantigene

Durch die Inokulation von replizierenden PFV-Impfvektoren konnte eine permanente Immunantwort gegen die PFV-Mutanten im Tiermodell erzielt werden. Die Re-Isolation des Impfvirus PFhV-T0<PSCA> bestätigte die Annahme, dass die induzierte Immunantwort durch die persistierende Replikation der PFV-Mutanten stimuliert wurde. Somit ist die *in vivo* Replikationsfähigkeit des Vektorsystems anzunehmen. Im Anschluss erfolgte die genauere Charakterisierung der induzierten Immunantwort gegen die künstlich eingefügten Antigene, um abschließend die Funktionalität und Effektivität des generierten Impfsystems bewerten zu können. Durch die stark begrenzte Auswahl der immunologischen Nachweismethoden für das Tiermodell syrischer Goldhamster konnte lediglich die Antigen-gerichtete IgG-Immunantwort bestimmt werden. Die Entwicklung von weiteren, auf den Hamster angepasste immunologische Nachweismethoden war aufgrund des begrenzten Zeitrahmens dieser Dissertation nicht möglich. Die immunisierten Hamster und Mäuse wurden während des laufenden Versuchs auf die Anwesenheit einer Fremdantigen-gerichteten humoralen Immunantwort getestet. Dabei konnten keine spezifischen Antikörper detektiert werden. Aus diesem Grund erfolgte ein *boost* der Antigen-gerichteten Immunantwort mittels eines nicht-replizierenden DNA-Impfstoffes via Gene Gun-Applikation. In fast allen Hamstern konnte nach Applikation der DNA-Vakzine ein Abfall der PFV-gerichteten IgG-Antwort verzeichnet werden (Abb. 23; Abb. 24). Inwieweit dies mit der Applikation des DNA-Impfstoffes in Zusammenhang steht, kann nicht gesagt werden. Eine nachweisliche

immunologische Reaktion auf die Applikation des DNA-Impfstoffs wäre vorrangig in den vakzinierten Gruppen H8, H9, H11 und H12 anzunehmen. Jedoch konnte bei nahezu allen Tieren eine Abnahme des Antikörpertiters beobachtet werden. Dabei konnte zwischen den Gruppen der Basis-Vektoren und den Gruppen der Hybridviren kein signifikanter Unterschied gemessen werden. Somit ist ein Zusammenhang zwischen der DNA-Immunsierung und dem Absinken des PFV-Antikörpertiters eher fraglich. Folglich kann eine methodisch bedingte Ursache nicht ausgeschlossen werden. Nach Abschluss des Tierversuchs erfolgte die endgültige Bewertung einer induzierten, antigenspezifischen Immunreaktion. Die dabei erfassten Ergebnisse des Peptid-ELISAs zeigten erneut keine spezifischen Antikörper gegen das Antigen HIV-CTL-Epitop-String (Abb. 26). Somit ist anzunehmen, dass durch die angewandte Immunisierungsstrategie keine ausgeprägten Antigen-gerichteten Antikörpertiter induziert werden konnten. Dieser Fehlschlag könnte mehrere Ursachen haben. Denkbar wäre, dass die eingesetzte Antigenkomposition der Impfvektoren für die Induktion einer humoralen Immunantwort eher ungeeignet ist. In den *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass lediglich das HIV-CTL-Epitop-Protein durch das Vektorsystem exprimiert werden konnte. Nun scheint es naheliegend, dass CTL-Epitope für die Induktion von humoralen Immunantworten eher unpassend sind. Die immunologische Präsentation von CTL-Epitopen wird über MHC-I-Rezeptoren vermittelt. Diese rekrutieren hauptsächlich CD8⁺ T-Zellen, wodurch die Apoptose der präsentierenden Zelle eingeleitet wird. Somit scheint die Prägung einer Antikörperantwort durch den Einsatz dieser Epitope eher unwahrscheinlich. Weiterhin konnte in einer Studie gezeigt werden, dass das hier eingesetzte HIV-CTL-Epitop-Protein hauptsächlich in Vakuolen ähnlichen Strukturen innerhalb des Zytoplasmas vorgefunden wurde, wodurch die Präsentation über MHC-I zusätzlich begünstigt wird (Hanke *et al.*, 1998a). Die Induktion einer humoralen Immunantwort wird jedoch überwiegend über extrazelluläre Moleküle vermittelt. Deshalb sollte die Induktion einer humoralen Immunantwort durch die Vektoren PFhV-T0<PSCA> und PFhV-T1<PSCA> über Zelloberflächenpräsentation des hPSCAs vermittelt werden. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Expression des hPSCAs über die konstruierten Vektoren nicht möglich war. Daher ist es unwahrscheinlich, dass durch die Applikation der PSCA-Impfviren eine messbare humorale Immunantwort stimuliert werden kann. Dabei wäre die Induktion einer starken und breiten humoralen Immunantwort gegen definierte Antigene durch das generierte Vektorsystem theoretisch vorstellbar. Dies belegt die Induktion einer starken PFV-gerichteten Antikörperantwort durch die applizierten Impfviren. Durch die Optimierung der heterologen

Antigenpräsentation könnte folglich der gewünschte Effekt induziert werden. Eine denkbare Optimierungsoption wäre die Konstruktion von Hybridviren, welche optimierte Zelloberflächenproteine, wie z.B. ein rekombinantes inaktiviertes HIV-Env-Antigen oder PSMA, stabil exprimieren können. Weiterhin wäre die Verwendung eines N-terminal angegliederten Sezernierungssignals, wie etwa das murine Ig- κ -Ketten Signalpeptid (Coloma *et al.*, 1992) kombiniert mit verschiedenen löslichen Antigenen, als mögliche Optimierungsoption vorstellbar. Dadurch könnte eine Sekretion von globulären Antigenen in den extrazellulären Raum erzielt werden, wodurch eine Optimierung der humoralen Vektorimmunogenität erreicht werden könnte. Ein allgemein limitierender Faktor bei der Optimierung der Impfvektoren wäre die begrenzte Verpackungskapazität des Vektorsystems und der damit in Verbindung stehende Erhalt einer stabilen Antigenexpression. Durch die in dieser Arbeit erstellten GFP-PFV-Hybridvektoren konnte bewiesen werden, dass mit dem generierten Vektorsystem eine Verpackungskapazität von bis zu 12.341 bp erreicht werden konnte. Mit dem von Schmidt & Rethwilm (1995) konstruierten PFV-Vektor-Expressions-System konnte eine Verpackungskapazität von bis zu 12,7 kb erzielt werden. Dies deutet darauf hin, dass durch das hier erstellte Impfvektorsystem eine Expression von Proteinen bis zu ca. 60 kDa möglich sein könnte. Die Ermittlung der maximalen Verpackungskapazität und die damit verbundene stabile Antigenexpression des hier entwickelten Impfvektor-Expressions-Systems bleibt jedoch nachfolgenden Arbeiten vorbehalten.

Die Wirksamkeit eines antiviralen Impfstoffs wird maßgeblich von der Breite der induzierten Immunantwort bestimmt. Dabei ist neben der Prägung einer starken Antikörperantwort vor allem auch die Stimulation einer effektiven und starken zellulären Immunabwehr entscheidend. Denn die immunologische Neutralisation einer viralen Infektion wird hauptsächlich über zytotoxische T-Zellen vermittelt, welche infizierte Zellen aufspüren und eliminieren. Auch im Feld der Anti-Tumor-Impfstoffentwicklung wird die Induktion einer starken T-Zell-vermittelten Immunantwort gegen entartete Körperzellen angestrebt. Folglich sollte die PFV-Vektor induzierte T-Zellantwort bestimmt werden, um die Effektivität der neu erstellten Impfstrategie hinsichtlich einer T-Zellstimulation abschließend bewerten zu können. Mit der dabei angewendeten Nachweismethode (IFN γ -ELISPOT) wurde hauptsächlich die Population der zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen erfasst (Hanke *et al.*, 1998a). Aufgrund der begrenzten etablierten Nachweismethoden konnte lediglich die stimulierte HIV-CTL-Epitop-spezifische T-Zellantwort im Mausmodell bestimmt werden. Die dabei gemessene Immunantwort konnte die Stimulierung einer starken, spezifischen

und zytotoxischen T-Zellabwehr durch die entwickelte Immunisierungsstrategie bestätigen. Durch Stimulation der Peptide 10 und 11 des HIV-CTL-Epitop-Peptid-Sets konnte eine hohe Anzahl von spezifischen T-Zellen aktiviert werden (Abb. 27). Die PFcV-T0- und PFcV-T1-Gruppen zeigten dagegen eine vergleichbar schwache Reaktion auf die Peptide 10 und 11. Somit scheint ein unspezifischer Effekt unwahrscheinlich. Das C57BL/6-Maus-Kern-Epitop des HIV-CTL-Epitop-Proteins (Hanke *et al.*, 1998a) befindet sich vermutlich in Peptid 11. In Abb. 28 ist die Lage des vermutlichen Kern-Epitops aufgeführt.

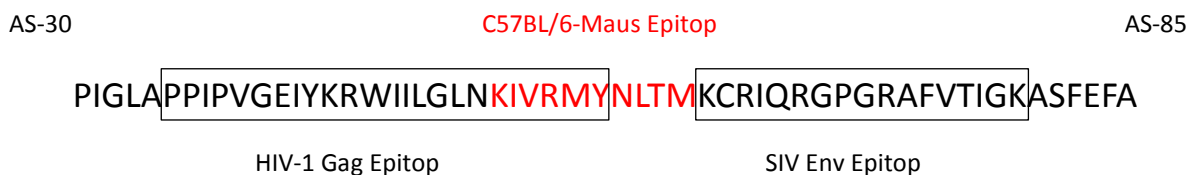


Abb. 28: Darstellung des vermutlichen C57BL/6-Maus-Kern-Epitops des HIV-CTL-Epitop-Proteins

Rechts und links oben wurde die Lage innerhalb des HIV-CTL-Epitop-Proteins aufgeführt (von Aminosäure (AS) 30-85). In der Mitte der Peptidsequenz ist das vermutliche C57BL/6-Maus-Kern-Epitop rot markiert. Die Rahmen rechts und links markieren CTL-Epitope von HIV-1-Gag und SIV-Env.

Es ist anzunehmen, dass es sich zwischen der ersten HIV-1-Gag-Epitopsequenz und dem zweiten SIV-Env-Abschnitts des H-Proteins von Hanke *et al.* lokalisiert. Die vermutliche Sequenz wurde rot markiert. Die Lage des Kern-Epitops wurde von der induzierten Immunantwort abgeleitet.

Die Gruppen M6 und M7, welche mit den Hybridvektoren zur Basis PFcV-T0 (Tas-naiv) infiziert wurden, zeigten die stärkste Reaktion im ELISPOT. In Maus M7/1 konnte durch die angewandte Vakzinierungsstrategie ein Wert von 3767 SFU/10⁶ Spleenozyten erzielt werden. Im Vergleich dazu zeigte eine andere Vakzinierungsstudie zehn Tage nach einmaliger intramuskulärer Applikation eines äquivalenten aber nicht replizierenden HIV-CTL-Epitop-Vektors (pTH.H) einen Wert von 1346 SFU/10⁶ Spleenozyten im Mausmodell (Hanke *et al.*, 1998a). In einer weiteren Studie mit einem vergleichbaren MVA-basierten, nicht-replizierenden viralen Impfstoff (MVA.HM) konnte zehn Tagen nach Applikation lediglich ein Wert von 283 SFU/10⁶ im Mausmodell erzielt werden. Nach 55 Tagen verringerte sich die stimulierte Immunantwort auf 133 SFU/10⁶ Spleenozyten (Hanke *et al.*, 1998b). Dabei muss angemerkt werden, dass die Immunisierungsexperimente in BALB/c-Mäusen durchgeführt wurden. Auch wurde ein anderes Epitop innerhalb des H-Proteins von dem Mausstamm BALB/c erkannt. Somit sind die Daten nicht gänzlich vergleichbar. Dennoch

lieferte der Vergleich einen eindeutigen Hinweis darauf, dass die hier entwickelte Vakzinierungsstrategie 400 Tage nach Applikation eine starke Rekrutierung von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen im Mausmodell induzieren konnte. Dies konnte die prinzipielle Funktionalität des hier entwickelten Impfsystems beweisen. Ein endgültiger Beweis für die Replikation der Impfvektoren im Mausmodell konnte jedoch nicht erbracht werden, wobei die starke antigenspezifische T-Zellantwort knapp 400 Tage nach Applikation möglicherweise auf eine Replikation der Tas-naiv-Hybridviren hindeutet.

Auch die *TasmI*-Hybridviren immunisierten Gruppen zeigten eine deutliche Immunreaktion (max. 2189 SFU/10⁶) gegen das HIV-Antigen. Durch die Applikation der Mutanten PFhV-T1<CTL> konnte dabei eine stärkere Immunantwort in Gruppe M8 induziert werden als durch die Applikation von PFhV-T1a<CTL> in der Vergleichsgruppe M9. Dies könnte wiederum auf eine replikationsabhängige Immunreaktion hindeuten, wie dies zuvor im Hamstermodell erläutert wurde. Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass die Immunisierung mit einem Δ Bet-HIV-CTL-Epitop-Fusionsprotein offensichtlich eine stärkere Immunreaktion induziert, als der Einsatz des HIV-CTL-Epitop-Proteins allein. In einem Nebenprojekt im Rahmen dieser Dissertation konnte das frühe Auftreten einer Bet-spezifischen Antikörperantwort bei einer SFVmac- und PFV-Infektion im Hamster- und Mausmodell gezeigt werden (Blochmann *et al.*, 2014). Dies spricht für eine Immundominanz des Bet-Proteins *in vivo*, wodurch der stärkere Immunisierungseffekt von PFhV-T1<CTL> erklärt werden könnte. Zwischen den Vektoren PFhV-T0<CTL> und PFhV-T0a<CTL> konnte dieser Zusammenhang jedoch nicht beobachtet werden. In beiden Gruppen wurden annähernd gleiche Immunantworten induziert. Dies ist vermutlich auf die allgemein verbesserte Antigenpräsentation der Tas-naiv-Hybridviren zurückzuführen, wodurch der verbesserte Immunisierungseffekt des Bet-HIV-CTL-Epitop-Fusionsproteins wahrscheinlich überlagert wurde. Bei Maus M8/2 konnte im Vergleich zu den anderen Tieren der Gruppe M8 eine geringe spezifische T-Zellantwort gegen Peptid 10 und 11 gemessen werden. Dies könnte wiederum darauf hindeuten, dass es in diesem Tier zu einem Infektionsausfall oder zur Klärung der Infektion nach Applikation gekommen sein könnte. Im Umkehrschluss wäre somit die Etablierung einer produktiven Infektion der Hybridvektoren in den anderen Mäusen der Gruppen M5, M6, M7 und M8 annehmbar. Die gemessene zytotoxische T-Zellantwort gegen PFV-Lebendvirus könnte ebenfalls auf eine Replikation der Vektoren hinweisen. Inwieweit die Infektion im Mausmodell stabil oder persistent verläuft kann, ohne weitere Untersuchungen nicht gesagt werden. Für die

Optimierung der vektorinduzierten Stimulation der zellulären Immunantwort wäre der Einsatz von genetischen Adjuvantien wie CCL19 oder GM-CSF (Krautwald *et al.*, 2004; Dranoff *et al.*, 1993) vorstellbar.

Abschließend kann gesagt werden, dass die in dieser Dissertation konzipierte und entwickelte Immunisierungsstrategie mit replizierenden foamyviralen Impfvektoren in Kombination mit einem nicht-replizierenden DNA-Vakzin eine langanhaltende und starke zelluläre Immunantwort im Mausmodell induzieren konnte. Somit wurde die Aufgabenstellung der vorliegenden Dissertation erfüllt. Durch den Einsatz von Hybridviren mit variablen Replikationseigenschaften konnten unterschiedliche Immunantworten stimuliert werden. Dies könnte für zukünftige Anwendungen nützlich sein. Der Replikationsnachweis der applizierten PF-Viren war lediglich in einem Fall aus 78 Versuchstieren erfolgreich. Dabei war die Re-Isolation des Wildtypvirus ebenfalls nicht möglich. Somit sprechen diese Daten für eine extrem basale Replikation der konstruierten PFV-Vektoren am Rande der Nachweisgrenze. Trotz alledem konnte durch den Einsatz von zusätzlich attenuierten PFV-basierten Impfvektoren (*Tasm1*-Mutanten) eine verhältnismäßig starke zelluläre Immunantwort stimuliert werden. Dies spricht für eine außerordentlich hohe Effizienz des konstruierten Impfvektorsystems, wodurch das Potential von foamyviralen Vektoren als Immunstimulatoren bestätigt werden konnte. Inwieweit dieses entwickelte Impfsystem in der Humanmedizin angewendet werden kann, soll in dem folgenden letzten Abschnitt dieser Arbeit diskutiert werden.

4.4 Beurteilung der Anwendbarkeit dieses PFV-Impfsystems im Menschen

Die jüngsten Ergebnisse im Feld der HIV-Impfstoffentwicklung zeigen das enorme Potential von replizierenden Vektorsystemen im Kampf gegen die weltweite HIV-Pandemie. In einer Reihe von neu angesetzten klinischen Studien der Phase I werden derzeit neue Ansätze mit replizierenden Vektorsystemen getestet. Eine von IAVI (*international AIDS vaccine initiative*) initialisierte Phase I-Studie (IAVI S001) prüft derzeit die Sicherheit und Immunogenität eines replizierenden Vektorsystems basierend auf dem 1997 entwickelten Sendai Vektor (Hasan *et al.*, 1997) in *prime/boost* Kombination mit einem adenoviralen Vektorsystem (Ad35-GRIN) in Kenia, Ruanda und Großbritannien. Auch in den USA werden derzeit replizierende VSV-Vektor-HIV-Impfstoffe in der klinischen Phase I getestet (HVTN 087, HVTN 090), um die Verträglichkeit und

Wirksamkeit dieses Systems zu untersuchen. Dabei bestätigen die 2013 veröffentlichten Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Louis Picker, bei dem eine intravaginale und intravenöse inokulierte SIV-Infektion in den rhCMV/SIV-immunisierten Affen nicht mehr nachgewiesen werden konnte (Hansen *et al.*, 2013), erneut die Wirksamkeit von replizierenden genetischen Impfstoffen. Laut L. Picker wäre auch eine Anwendung im Menschen vorstellbar (iavireport - Volume 17, Nr. 2). Insofern weist die Aufgabenstellung dieser Dissertation in eine richtige Richtung.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse belegen eindeutig das hohe Potential von replizierenden foamyviralen Vektorsystemen zur Induktion einer starken und permanenten Immunantwort durch einmalige Exposition. Besonders die hier gezeigte Induktion einer Antigen-spezifischen zellulären Immunabwehr könnte der Ausbreitung einer viralen Infektion im Organismus entgegenwirken, wie dies in den Primatenversuchen durch den Einsatz von replizierenden CMV-basierten Impfstoffen gezeigt werden konnte (Hansen *et al.*, 2011; 2013). Auch im Feld der Krebstherapie wäre die Induktion von tumorspezifischen CD8⁺ T-Zellen durch eine gezielte Immunisierung ein hoffungsvoller Lösungsansatz, um austherapierten Krebspatienten eine neue Perspektive bieten zu können. Um die Weiterentwicklung und Erprobung von Foamyvirus-basierten Impfstoffen voranzutreiben, ist es erforderlich, die Wirksamkeit und Effektivität dieses Impfstoffansatzes im Primatenversuch prüfen zu können. Dafür ist es notwendig, das entwickelte Vektorsystem auf den Primaten anzupassen. Bereits veröffentlichte Ergebnisse schildern die Isolation eines SFVmac-Primärisolates aus natürlich infizierten Rhesusaffen (Blochmann *et al.*, 2014). Wie bereits erwähnt gibt es Hinweise darauf, dass Bet-defiziente simiane Foamyviren eine persistente Infektion im Menschen etablieren können (Callahan *et al.*, 1999). Somit ist eine Übertragung der hier erzielten Ergebnisse auf ein naives simianes Foamyvirus theoretisch vorstellbar. Auch konnte in ersten Experimenten gezeigt werden, dass die isolierte SFVmac-R289hybAGM-Variante stärkere zytophatische Effekte *in vitro* induzieren konnte als die hier verwendete PFV-Labormutante (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse der genetischen Analyse des Primärisolates zeigten eine durch SFVmac-SFVagm-Superinfektion entstandene Re-Kombinationsmutagenese im Bereich der Oberflächeneinheit des *env*-Gens. Dabei ist annehmbar, dass diese Art von SFV-Env-Hybrid-Mutanten durch einen Replikationsvorteil *in vivo* selektioniert wurden. In einem Nebenprojekt dieser Dissertation wurde bereits ein Replikationsvorteil dieser Hybriden gegenüber dem PFV-Wildtyp im Hamstermodell nachgewiesen (Blochmann *et al.*, 2014). Daher scheint es sinnvoll, zukünftige Optimierungsversuche auf die isolierte Mutante SFVmac-R289hybAGM auszuweiten.

Aufgrund der potentiell kanzerogenen Eigenschaften von integrierenden lentiviralen Vektoren wird derzeit von einer Verwendung solcher integrierenden Vektorsystemen abgeraten (Knight *et al.*, 2013). Jedoch gibt es bis heute keinen Hinweis auf eine Foamyvirus-induzierte Tumorgenese in zoonotisch oder natürlich infizierten Wirten. Die kaum nachweisbare Replikation *in vivo* des hier entwickelten Impfvectorsystems könnte vermutlich zu einer weiteren Reduktion des Sicherheitsrisikos beitragen. Darüber hinaus könnte die genetische Organisation der Foamyviren weitere Möglichkeiten bieten, diese Vektorsysteme hinsichtlich solcher Sicherheitsrisiken zu optimieren. Die foamyvirale LTR-Promotorregion, welche die Aktivierung von Onkogenen einleiten könnte, wird ausschließlich durch die Bindung des Transkativators der Spumaviren (Tas) aktiviert. Dabei konnte in infizierten Wirten die Bildung von natürlich entstandenen Δ Tas-Virusvarianten nachgewiesen werden, welche vermutlich bei der Etablierung einer persistenten Infektion eine Funktion übernehmen (Saib *et al.*, 1995b). Somit wäre vorstellbar, dass durch die Entwicklung von foamyviralen Impfvektoren mit natürlicher Δ Tas-Mutation, kombiniert mit einer temporär verabreichten Tas-Medikation durch z. B. nicht integrierende foamyvirale Vektoren (Deyle *et al.*, 2010) oder anderen replikationsinkompetenten Vektorsystemen - wie MVA oder Ad35-GRIN - eine zusätzliche Reduktion des verbleibenden Restrisikos erzielt werden könnte. Angesichts dieser theoretischen Überlegungen und den bereits erwähnten natürlichen apathogenen Eigenschaften der Foamyviren, erscheint nach Abwägung des potentiellen Nutzens, der Einsatz von replizierenden und persistierenden Impfvektoren für spezielle Zielgruppen als möglich.

5. Zusammenfassung

Auf Basis der bislang zur Verfügung stehenden Methoden konnte weder ein effektiver HIV-Impfstoff entwickelt noch der durchschlagende Erfolg bei der Induktion einer Anti-Tumorantwort erzielt werden. Aus diesem Grund ist es Aufgabe der Grundlagenforschung, innovative Lösungsansätze bereit zu stellen, um die Effektivität der Vakzinierung zu verbessern. Diesbezüglich zeigte der Einsatz von replikationskompetenten Vektorsystemen erste vielversprechende Ergebnisse im SIV-Primatenmodell. Hinsichtlich dieses Ansatzes war es Ziel dieser Dissertation, ein neues replikationskompetentes Impf-Vektor-System basierend auf simianen Foamyviren zu entwickeln, um eine effektive und permanente Immunantwort gegen definierte Antigene stimulieren zu können.

Auf der Basis des foamyviralen Vektors pHSRV2/13 (PFV/HFV) erfolgte die Konstruktion von replizierenden PFV- Δ Bet-Basis-Vektoren. In einer ersten Tierversuchsphase konnte durch ballistische Applikation der PFV- Δ Bet-Deletionsmutanten via Gene Gun eine permanente PFV-gerichtete Antikörperantwort in Hamstern und Mäusen induziert werden.

Die Entwicklung eines effektiven viralen Impf-Vektor-Systems bedingte maßgeblich die stabile Expression definierter Antigene unter Kontrolle der viralen Replikation. Durch die gezielte genetische Modifikation der PFV- Δ Bet-Basis-Vektoren konnte eine Palette von Hybridviren mit variablen Replikations- und Antigen-Expressionseigenschaften generiert werden. Dabei war es möglich, eine stabile Expression von GFP und HIV-CTL-Epitopen über einen Zeitraum von 68 Tagen *in vitro* nachzuweisen.

Im Anschluss erfolgte die Immunisierung von Hamstern und Mäusen mit den generierten PFV-HIV-Epitop-Hybridviren. Durch diese Hybridviren konnte eine permanente, PFV-gerichtete Antikörperantwort über einen Zeitraum von knapp 400 Tagen induziert werden. Darüber hinaus ist es gelungen, die *in vivo* Replikation der generierten Impf-Vektoren über Re-Isolation des applizierten Impfvirus aus dem Gewebe eines infizierten Hamsters eindeutig nachzuweisen. Einen endgültigen Beweis für die Funktionalität des generierten Impf-Vektor-Systems lieferte der geführte Nachweis einer induzierten HIV-Epitop-spezifischen T-Zellpopulation im Milzgewebe von immunisierten Mäusen knapp 400 Tage nach Applikation der Hybrid-Impfviren. Dabei wurde eine variable Immunantwort in Abhängigkeit zu den unterschiedlichen Eigenschaften der konstruierten Impf-Vektoren stimuliert. Dadurch konnte bewiesen werden, dass durch die Applikation von replizierenden foamyviralen Impf-Vektoren die Induktion einer starken und permanenten Immunabwehr prinzipiell möglich ist.

Summary

Attempts to develop a successful HIV vaccine or induce an effective anti-tumor response using the methods available have so far been unsuccessful. The evaluation of innovative strategies aimed at improving the efficacy of vaccination is therefore an important aspect of basic research. Recent studies using replication vector systems in the SIV-primate model have, in this respect, been promising. The aim of this thesis was therefore to develop a novel replication-competent vaccine vector system based on simian foamy viruses able to induce an effective and enduring immune response against defined antigens. Replicating PFV- Δ Bet vectors were constructed using the foamy viral vector pHSRV2/13 (PFV/HFV) as a basis. An initial animal experiment demonstrated the induction of a long-lasting PFV-specific antibody response in hamsters and mice by gene gun ballistic application of the PFV- Δ Bet deletion mutants. In order to be effective, a vaccine viral vector of this kind requires the stable expression of defined antigens under the control of viral replication. A variety of hybrid viruses with differing replication and antigen expression characteristics were generated by specific genetic modification of the PFV- Δ Bet basis vectors. Virus replication and the stable expression of GFP and an HIV-CTL epitope string could be demonstrated for up to 68 days *in vitro*. Hamsters and mice were therefore inoculated with the PFV-HIV epitope hybrid viruses and a persistent PFV-specific antibody response was observed over a period of nearly 400 days. Furthermore, *in vivo* replication of the vaccine vectors was demonstrated by re-isolation of the inoculated virus from the tissues of an infected hamster. The functionality of the vaccine vector system was clearly demonstrated by the presence of HIV epitope-specific T-cells in the spleens of mice immunized almost 400 days previously with the hybrid viruses. The strength of the response appeared to depend on the particular characteristics of the vaccine vectors. These data demonstrate that it is in principle possible to induce a strong and persisting immunity by application of replicating foamy virus vaccine vectors.

6. Ausblick

Das virale Genom von SFVmac-R289hybAGM (Blochmann *et al.*, 2014) wurde bereits in einen rekombinanten viralen Vektor übertragen (pRB-R289hybAGM). Experimente *in vitro* konnten dabei die Replikationsfähigkeit dieses viralen Vektors unter Beweis stellen. Folglich wäre die Prüfung der Übertragbarkeit der Ergebnisse dieser Arbeit auf das virale Genom von SFVmac-R289hybAGM in zukünftigen Arbeiten möglich. Dabei sollte zunächst der Replikationserhalt des SFVmac-Stamms in Abwesenheit eines funktionalen *bet*-Leserahmens geprüft werden. In früheren Publikationen konnte bereits eine funktionale Replikation von SFVmac, in Abwesenheit des Bet-Proteins, gezeigt werden (Yu & Lineal 1993; Mergia *et al.*, 1998). Somit scheint eine Übertragung der Ergebnisse theoretisch möglich, um das entwickelte Impfsystem an *in vivo* Versuche in Primaten anzupassen zu können. Ebenfalls sollte die Impfvektor-vermittelte Antigenpräsentation weiter optimiert werden, um eine möglichst breite und effektive Immunabwehr im Organismus etablieren zu können. Denkbar wäre dabei eine Fusion der Antigene mit den genetischen Adjuvantien wie CCL19 oder GM-CSF. Auch wäre die Verwendung von sekretierten, extrazellulären Antigenen vorstellbar, um die Stimulation einer humoralen Immunantwort zu begünstigen.

Diese Optimierungsversuche sollten dabei zunächst in dem hier entwickelten Kleintiermodell durchgeführt werden. Um die dabei induzierte Immunabwehr genauer untersuchen zu können, ist es jedoch erforderlich, im Vorfeld neue immunologische Nachweismethoden zur Klassifizierung der Immunantwort im Hamster zu entwickeln. Hierbei wäre die Entwicklung von hamsterspezifischen Detektionsantikörpern hilfreich, um bereits etablierte Systeme auf Hamsterzellen übertragen zu können. Um eine verlässliche Aussage über die Effektivität des entwickelten Impfstoffs im Kleintiermodell treffen zu können, ist zusätzlich die Entwicklung von reproduzierbaren *in vivo* Zytotoxizitätstests erforderlich. Im Falle des Nachweises der Stimulation einer effektiven HIV- oder Tumor-spezifischen Immunabwehr könnte der Versuch unternommen werden, die gewonnenen Erkenntnisse im Primatenmodell zu reproduzieren.

Ein weiterer Ansatzpunkt für zukünftige Arbeiten wäre die Reduktion des Sicherheitsrisikos des hier entwickelten Impfvectorsystems. Denkbar wäre dabei eine replikationsinkompetente Δ Tas-Vektorvariante, welche unter externer Zufuhr von Tas-Molekülen zur Replikation angeregt werden kann.

7. Literaturverzeichnis

7.1 Publikationen

Achong BG, Mansell PW, Epstein MA (1971). A new human virus in cultures from a nasopharyngeal carcinoma. *J. Pathol.* 103, 18.

Aguzzi A, Marino S, Tschopp R, Rethwilm A (1996). Regulation of expression and pathogenic potential of human foamy virus in vitro and in transgenic mice. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 206, 243–273.

Amato RJ and Stepankiw M (2012). Clinical Efficacy of TroVax in the Treatment of Progressive Castration-resistant Prostate Cancer. *Clin. Med. Insights. Oncol.* 6, 67-73.

Baba TW, Liska V, Khimani AH, Ray NB, Dailey PJ, Penninck D, Bronson R, Greene MF, McClure HM, Martin LN, Ruprecht RM (1999). Live attenuated, multiply deleted simian immunodeficiency virus causes AIDS in infant and adult macaques. *Nat. Med.* 5(2), 194-203.

Bander NH, Milowsky MI, Nanus DM, Kostakoglu L, Vallabhajosula S, Goldsmith SJ (2005). Phase I trial of 177lutetium-labeled J591, a monoclonal antibody to prostate-specific membrane antigen, in patients with androgen-independent prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* 23(21), 4591-601.

Bannert N & Kurth R (2004). Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101 Suppl 2, 14572-9.

Bauer TR Jr, Olson EM, Huo Y, Tuschong LM, Allen JM, Li Y, Burkholder TH, Russell DW (2011). Treatment of canine leukocyte adhesion deficiency by foamy virus vectors expressing CD18 from a PGK promoter. *Gene Ther.* 18(6), 553-9.

Bauer TR Jr, Tuschong LM, Calvo KR, Shive HR, Burkholder TH, Karlsson EK, West RR, Russell DW, Hickstein DD (2013). Long-Term Follow-up of Foamy Viral Vector-Mediated Gene Therapy for Canine Leukocyte Adhesion Deficiency. *Mol. Ther.* 21(5), 964-72.

Baunach G, Maurer B, Hahn H, Kranz M, Rethwilm A (1993). Functional analysis of human foamy virus accessory reading frames. *J. Virol.* 67, 5411-5418

Belyakov IM, Wyatt LS, Ahlers JD, Earl P, Pendleton CD, Kelsall BL, Strober W, Moss B, Berzofsky JA (1998). Induction of a mucosal cytotoxic T-lymphocyte response by intrarectal immunization with a replication-deficient recombinant vaccinia virus expressing human immunodeficiency virus 89.6 envelope protein. *J. Virol.* 72(10), 8264-72.

- Bleiholder** A, Mühle M, Hechler T, Bevins S, vandeWoude S, Denner J, Löchelt M (2011). Pattern of seroreactivity against feline foamy virus proteins in domestic cats from Germany. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 143(3-4), 292-300.
- Blewett** EL, Black DH, Lerche NW, White G, Eberle R (2000). Simian foamy virus infections in a baboon breeding colony. *Virology* 278, 183-93.
- Blochmann** R, Curths C, Coulibaly C, Cichutek K, Kurth R, Norley S, Bannert N, Fiebig U (2014). A novel small animal model to study the replication of simian foamy virus in vivo. *Virology* 448, 65-73.
- Bock** M, Heinkelein M, Lindemann D, Rethwilm A (1998). Cells expressing the human foamy virus (HFV) accessory Bet protein are resistant to productive HFV superinfection. *Virology* 250(1), 194-204.
- Boneva** RS, Grindon AJ, Orton SL, Switzer WM, Shanmugam V, Hussain AI, Bhullar VB, Chamberland ME, Heneine W, Folks TM, Chapman LE (2002). Simian foamy virus infection in a blood donor. *Transfusion* 42(7), 886-91.
- Boneva** RS, Switzer WM, Spira TJ, Bhullar VB, Shanmugam V, Cong ME, Lam L, Heneine W, Folks TM, Chapman LE (2007). Clinical and virological characterization of persistent human infection with simian foamy viruses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 23(11), 1330-7.
- Boyer** PL, Stenbak CR, Clark PK, Linial ML, Hughes SH (2004). Characterization of the polymerase and RNase H activities of human foamy virus reverse transcriptase. *J. Virol.* 78, 6112-6121.
- Brooks** JI, Merks HW, Fournier J, Boneva RS, Sandstrom PA (2007). Characterization of blood-borne transmission of simian foamy virus. *Transfusion* 47(1), 162-70.
- Brooks** JI, Rud EW, Pilon RG, Smith JM, Switzer WM, Sandstrom PA (2002). Cross-species retroviral transmission from macaques to human beings. *Lancet* 360, 387-388.
- Brown** P, Moreau-Dubois MC, Gajdusek DC (1982). Persistent asymptomatic infection of the laboratory mouse by simian foamy virus type 6: a new model of retrovirus latency. *Arch. Virol.* 71, 229-234.
- Buge** SL, Richardson E, Alipanah S, Markham P, Cheng S, Kalyan N, Miller CJ, Lubeck M, Udem S, Eldridge J, Robert-Guroff M (1997). An adenovirus-simian immunodeficiency virus env vaccine elicits humoral, cellular, and mucosal immune responses in rhesus macaques and decreases viral burden following vaginal challenge. *J. Virol.* 71(11), 8531-41.
- Callahan** ME, Switzer WM, Matthews AL, Roberts BD, Heneine W, Folks TM, Sandstrom PA (1999). Persistent zoonotic infection of a human with simian foamy virus in the absence of an intact orf-2 accessory gene. *J. Virol.* 73(11), 9619-24.

- Carlson** JR, McGraw TP, Keddie E, Yee JL, Rosenthal A, Langlois AJ, Dickover R, Donovan R, Luciw PA, Jennings MB, et al. (1990). Vaccine protection of rhesus macaques against simian immunodeficiency virus infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 6(11), 1239-46.
- Cartellieri** M, Herchenröder O, Rudolph W, Heinkelein M, Lindemann D, Zentgraf H, Rethwilm A (2005). N-terminal Gag domain required for foamy virus particle assembly and export. *J. Virol.* 79(19), 12464-76.
- Chakiath** CS & Esposito D (2007). Improved recombinational stability of lentiviral expression vectors using reduced-genome Escherichia coli. *Biotechniques*. 43(4), 466-470.
- Chalfie** M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805.
- Chang** J, Lee KJ, Jang KL, Lee EK, Baek GH, Sung YC (1995). Human foamy virus Bell transactivator contains a bipartite nuclear localization determinant which is sensitive to protein context and triple multimerization domains. *J. Virol.* 69(2), 801-8.
- Charneau** P, Alizon M, Clavel F (1992). A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. *J. Virol.* 66, 2814-20.
- Chermann** JC, Barré-Sinoussi F, Dauguet C, Brun-Vezinet F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L (1983). Isolation of a new retrovirus in a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome. *Antibiot. Chemother.* 32, 48-53.
- Coloma** MJ, Hastings A, Wims LA, Morrison SL (1992). Novel Vectors for the Expression of Antibody Molecules Using Variable Regions Generated by Polymerase Chain Reaction. *J. Imm. Methods*. 152, 89-104.
- Copier** J & Dalgleish A (2010). Whole-cell vaccines: A failure or a success waiting to happen? *Curr. Opin. Mol. Ther.* 12(1),14-20.
- Cormack** BP, Valdivia RH, Falkow S (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173, 33-38.
- Daniel** MD, Kirchhoff F, Czajak SC, Sehgal PK, Desrosiers RC (1992). Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene. *Science*. 258(5090),1938-41.
- Davis** HL (1997). Plasmid DNA expression systems for the purpose of immunization. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 635-646.
- Delebecque** F, Suspene R, Calattini S, Casartelli N, Saib A, Froment A, Wain- Hobson S, Gessain A, Vartanian JP, Schwartz O (2006). Restriction of foamy viruses by APOBEC cytidine deaminases. *J. Virol.* 80(2), 605-14.

- Delelis O, Lehmann-Che J, Saib A (2004).** Foamy viruses - a world apart. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 400-6.
- Delelis O, Petit C, Leh H, Mbemba G, Mouscadet JF, Sonigo P (2005).** A novel function for spumaretrovirus integrase: an early requirement for integrase-mediated cleavage of 2 LTR circles. *Retrovirology* 2, 31.
- de Parseval N & Heidmann T (2005).** Human endogenous retroviruses: from infectious elements to human genes. *Cytogenet Genome Res.* 110(1-4), 318-32.
- Deyle DR, Li Y, Olson EM, Russell DW (2010).** Nonintegrating foamy virus vectors. *J. Virol.* 84(18), 9341-9.
- Deyle DR, Khan IF, Ren G, Russell DW (2013).** Lack of genotoxicity due to foamy virus vector integration in human iPSCs. *Gene Ther.* 20(8), 868-73.
- Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, Jackson V, Hamada H, Pardoll D, Mulligan RC (1993).** Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90(8), 3539-43.
- Duda A, Luftenegger D, Pietschmann T, Lindemann D (2006).** Characterization of the prototype foamy virus envelope glycoprotein receptor-binding domain. *J. Virol.* 80, 8158-8167.
- Eastman SW & Linial ML (2001).** Identification of a conserved residue of foamy virus Gag required for intracellular capsid assembly. *J. Virol.* 75(15), 6857-64.
- Enders J & Peebles T (1954).** Propagation in tissue culture of cutaneous agents from patients with measles. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 86, 277-87.
- Enssle J, Fischer N, Moebes A, Mauer B, Smola U, Rethwilm A (1997).** Carboxy-terminal cleavage of the human foamy virus Gag precursor molecule is an essential step in the viral life cycle. *J. Virol.* 71, 7312-7317.
- Enssle J, Jordan I, Mauer B, Rethwilm A (1996).** Foamy virus reverse transcriptase is expressed independently from the Gag protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 4137-4141.
- Erlwein O & Rethwilm A (1993).** BEL-1 transactivator responsive sequences in the long terminal repeat of human foamy virus. *Virology* 196(1), 256-68.
- Erlwein O, Bieniasz PD, McClure MO (1998).** Sequences in pol are required for transfer of human foamy virus-based vectors. *J. Virol.* 72(7), 5510-6.
- Falcone V, Leupold J, Clotten J, Urbanyi E, Herchenroder O, Spatz W, Volk B, Bohm N, Toniolo A, Neumann-Haefelin D, Schweizer M (1999a).** Sites of simian foamy virus persistence in naturally

infected African green monkeys: latent provirus is ubiquitous, whereas viral replication is restricted to the oral mucosa. *Virology* 257, 7-14.

Falcone V, Schweizer M, Toniolo A, Neumann-Haefelin D, Meyerhans A (1999b). Gamma interferon is a major suppressive factor produced by activated human peripheral blood lymphocytes that is able to inhibit foamy virus-induced cytopathic effects. *J Virol* 73, 1724-1728.

Falcone V, Schweizer M, Neumann-Haefelin D (2003). Replication of primate foamy viruses in natural and experimental hosts. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 277, 161-180.

Fenyofalvi G, Bagossi P, Copeland TD, Oroszlan S, Boross P, Tozser J (1999). Expression and characterization of human foamy virus proteinase. *FEBS Lett* 462, 397-401.

Fischer N, Heinkelein M, Lindemann D, Enssle J, Baum C, Werder E, Zentgraf H, Muller JG, Rethwilm A (1998). Foamy virus particle formation. *J. Virol.* 72(2), 1610-5.

Flügel RM, Rethwilm A, Maurer B, Darai G (1987). Nucleotide sequence analysis of the env gene and its flanking regions of the human spumaretrovirus reveals two novel genes. *EMBO. J.* 6(7), 2077-84.

Flügel RM & Pfrepper KI (2003). Proteolytic processing of foamy virus Gag and Pol proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 277, 63-88.

Gardner MB, Carlson JR, Jennings M, Rosenthal A, Langlois A, Haynes B, Bolognesi D, Palker TJ (1991). SIV vaccine protection of rhesus monkeys. *Biotechnol. Ther.* 2(1-2), 9-19.

Gifford R & Tristem M (2003). The evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses. *Virus. Genes.* 26, 291-315.

Giron ML, de The H, Saib A (1998). An evolutionarily conserved splice generates a secreted Env-Bet fusion protein during human foamy virus infection. *J. Virol.* 72, 4906-4910.

Gregor PD, Wolchok JD, Turaga V, Latouche JB, Sadelain M, Bacich D, Heston WD, Houghton AN, Scher HI (2005). Induction of autoantibodies to syngeneic prostate-specific membrane antigen by xenogeneic vaccination. *Int. J. Cancer.* 116(3), 415-21

Guimarães-Walker A, Mackie N, McCormack S, Hanke T, Schmidt C, Gilmour J, Barin B, McMichael A, Weber J, Legg K, Babiker A, Hayes P, Gotch F, Smith C, Dally L, Dorrell L, Cebere I, Kay R, Winstone N, Moore S, Goonetilleke N, Fast P; IAVI-006 Study Group (2008). Lessons from IAVI-006, a phase I clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the pTHr.HIVA DNA and MVA.HIVA vaccines in a prime-boost strategy to induce HIV-1 specific T-cell responses in healthy volunteers. *Vaccine.* 26(51), 6671-7.

Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, Clappier E, Caccavelli L, Delabesse E, Beldjord K, Asnafi V, MacIntyre E, Dal Cortivo L, Radford I, Brousse N, Sigaux F,

Moshous D, Hauer J, Borkhardt A, Belohradsky BH, Wintergerst U, Velez MC, Leiva L, Sorensen R, Wulffraat N, Blanche S, Bushman FD, Fischer A, Cavazzana-Calvo M (2008). Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J. Clin. Invest.* 118(9), 3132-42.

Hahn H, Baunach G, Brautigam S, Mergia A, Neumann-Haefelin D, Daniel MD, McClure MO, Rethwilm A (1994). Reactivity of primate sera to foamy virus Gag and Bet proteins. *J. Gen. Virol.* 75 (Pt 10), 2635-44.

Hanke T, Schneider J, Gilbert SC, Hill AV, McMichael A (1998a). DNA multi-CTL epitope vaccines for HIV and Plasmodium falciparum: immunogenicity in mice. *Vaccine.* 16(4), 426-35

Hanke T, Blanchard TJ, Schneider J, Ogg GS, Tan R, Becker MSC, Gilbert SG, Hill AVS, Smith GL, McMichael A (1998b). Immunogenicities of intravenous and intramuscular administrations of MVA-based multi-CTL epitope vaccine for HIV in mice. *J. Gen. Virol.* 79, 83-90

Hanke T, Blanchard TJ, Schneider J, Hannan CM, Becker M, Gilbert SC, Hill AV, Smith GL, McMichael A (1998c). Enhancement of MHC class I-restricted peptide-specific T cell induction by a DNA prime/MVA boost vaccination regime. *Vaccine.* 16(5), 439-45.

Hanke T, Neumann VC, Blanchard TJ, Sweeney P, Hill AV, Smith GL, McMichael A (1999). Effective induction of HIV-specific CTL by multi-epitope using gene gun in a combined vaccination regime. *Vaccine.* 17(6), 589-96.

Hansen SG, Ford JC, Lewis MS, Ventura AB, Hughes CM, Coyne-Johnson L, Whizin N, Oswald K, Shoemaker R, Swanson T, Legasse AW, Chiuchiolo MJ, Parks CL, Axthelm MK, Nelson JA, Jarvis MA, Piatak M Jr, Lifson JD, Picker LJ (2011). Profound early control of highly pathogenic SIV by an effector memory T-cell vaccine. *Nature.* 473(7348), 523-7.

Hansen SG, Jr MP, Ventura AB, Hughes CM, Gilbride RM, Ford JC, Oswald K, Shoemaker R, Li Y, Lewis MS, Gilliam AN, Xu G, Whizin N, Burwitz BJ, Planer SL, Turner JM, Legasse AW, Axthelm MK, Nelson JA, Früh K, Sacha JB, Estes JD, Keele BF, Edlefsen PT, Lifson JD, Picker LJ (2013). Immune clearance of highly pathogenic SIV infection. *Nature.* 502(7469), 100-4

Harrop R, Shingler W, Kelleher M, de Belin J, Treasure P (2010). Cross-trial analysis of immunologic and clinical data resulting from phase I and II trials of MVA-5T4 (TroVax) in colorectal, renal, and prostate cancer patients. *J. Immunother.* 33(9), 999-1005.

Hartung S, Norley SG, Ennen J, Cichutek K, Plesker R, Kurth R (1992). Vaccine protection against SIVmac infection by high- but not low-dose whole inactivated virus immunogen. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 5(5), 461-8.

Hasan MK, Kato A, Shioda T, Sakai Y, Yu D, Nagai Y (1997). Creation of an infectious recombinant Sendai virus expressing the firefly luciferase gene from the 3' proximal first locus. *J. Gen. Virol.* 78 (Pt 11), 2813-20.

Haynes JR, McCabe DE, Swain WF, Widera G, Fuller JT (1996). Particle-mediated nucleic acid immunization. *J. Biotechnol.* 44(1-3), 37-42.

He F, Sun JD, Garrett ED, Cullen BR (1993). Functional organization of the Bel-1 trans activator of human foamy virus. *J. Virol.* 67(4), 1896-904.

Heinkelein M, Schmidt M, Fischer N, Moebes A, Lindemann D, Enssle J, Rethwilm A (1998). Characterization of a cis-acting sequence in the Pol region required to transfer human foamy virus vectors. *J. Virol.* 72(8), 6307-14.

Heinkelein M, Pietschmann T, Jarmy G, Dressler M, Imrich H, Thurow J, Lindemann D, Bock M, Moebes A, Roy J, Herchenroder O, Rethwilm A (2000). Efficient intracellular retrotransposition of an exogenous primate retrovirus genome. *Embo. J.* 19(13), 3436-45.

Heinkelein M, Dressler M, Jarmy G, Rammling M, Imrich H, Thurow J, Lindemann D, Rethwilm A (2002). Improved primate foamy virus vectors and packaging constructs. *J. Virol.* 76(8), 3774-83.

Heinkelein M, Rammling M, Juretzek T, Lindemann D, Rethwilm A (2003). Retrotransposition and cell-to-cell transfer of foamy viruses. *J. Virol.* 77(21), 11855-8.

Heneine W, Switzer WM, Sandstrom P, Brown J, Vedapuri S, Schable CA, Khan A, Lerche NW, Schweizer M, Neumann-Haefelin D, Chapman LE, Folks TM (1998). Identification of a human population infected with simian foamy viruses. *Nat. Med.* 4, 403-407.

Heneine W, Schweizer M, Sandstrom P, Folks T. (2003). Human infection with foamy viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 277, 182-196.

Herchenröder O, Renne R, Loncar D, Cobb EK, Murthy KK, Schneider J, Mergia A, Luciw PA (1994). Isolation, cloning, and sequencing of simian foamy viruses from chimpanzees (SFVcpz): high homology to human foamy virus (HFV). *Virology.* 201(2), 187-99.

Herchenröder O, Turek R, Neumann-Haefelin D, Rethwilm A, Schneider J (1995). Infectious proviral clones of chimpanzee foamy virus (SFVcpz) generated by long PCR reveal close functional relatedness to human foamy virus. *Virology.* 214(2), 685-9.

Higano CS, Corman JM, Smith DC, Centeno AS, Steidle CP, Gittleman M, Simons JW, Sacks N, Aimi J, Small EJ (2008). Phase 1/2 dose- escalation study of a GM-CSF-secreting, allogeneic, cellular immunotherapy for metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Cancer.* 113(5), 975-984.

Hill CL, Bieniasz PD, McClure MO (1999). Properties of human foamy virus relevant to its development as a vector for gene therapy. *J. Gen. Virol.* 80 (Pt 8), 2003-9.

Hirata RK, Miller AD, Andrews RG, Russell DW (1996). Transduction of hematopoietic cells by foamy virus vectors. *Blood*. 88(9), 3654-61.

Hooks JJ & Detrick-Hooks B (1979). Simian foamy virus-induced immunosuppression in rabbits. *J. Gen. Virol.* 44, 383-390.

Jocham D, Richter A, Hoffmann L, Iwig K, Fahlenkamp D, Zakrzewski G, Schmitt E, Dannenberg T, Lehmacher W, von Wietersheim J, Doehn C (2004). Adjuvant autologous renal tumour cell vaccine and risk of tumour progression in patients with renal-cell carcinoma after radical nephrectomy: phase III, randomised controlled trial. *Lancet*. 363(9409), 594-9

Johnson PR, Schnepf BC, Connell MJ, Rohne D, Robinson S, Krivulka GR, Lord CI, Zinn R, Montefiori DC, Letvin NL, Clark KR (2005). Novel adeno-associated virus vector vaccine restricts replication of simian immunodeficiency virus in macaques. *J. Virol.* 79(2), 955-65.

Jones-Engel L, May CC, Engel GA, Steinkraus KA, Schillaci MA, Fuentes A, Rompis A, Chalise MK, Aggimarangsee N, Feeroz MM, Grant R, Allan JS, Putra A, Wandia IN, Watanabe R, Kuller L, Thongsawat S, Chaiwarith R, Kyes RC, Linial ML (2008). Diverse contexts of zoonotic transmission of simian foamy viruses in Asia. *Emerg. Infect. Dis.* 14(8), 1200-8.

Jordan I, Enssle J, Guttler E, Mauer B, Rethwilm A (1996). Expression of human foamy virus reverse transcriptase involves a spliced pol mRNA. *Virology* 224, 314-319

Josephson NC, Trobridge GD, Russell DW (2004). Transduction of long-term and mobilized peripheral blood-derived NOD/SCID repopulating cells by foamy virus vectors. *Hum. Gene. Ther.* 15(1), 87-92.

Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, Redfern CH, Ferrari AC, Dreicer R, Sims RB, Xu Y, Frohlich MW, Schellhammer PF; IMPACT Study Investigators (2010a). Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* 363(5), 411-22.

Kantoff PW, Schuetz TJ, Blumenstein BA, Glode LM, Bilhartz DL, Wyand M, Manson K, Panicali DL, Laus R, Schlom J, Dahut WL, Arlen PM, Gulley JL, Godfrey WR (2010b). Overall survival analysis of a phase II randomized controlled trial of a Poxviral-based PSA-targeted immunotherapy in metastatic castration-resistant prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* 28(7), 1099-105.

Kent SJ, Dale CJ, Preiss S, Mills J, Campagna D, Purcell DF (2001). Vaccination with attenuated simian immunodeficiency virus by DNA inoculation. *J. Virol.* 75, 11930-11934.

Khan AS (2009). Simian foamy virus infection in humans: prevalence and management. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 7(5), 569-80.

- Kiem** HP, Allen J, Trobridge GD, Olson E, Keyser K, Peterson L, Russell DW (2007). Foamy-virus-mediated gene transfer to canine repopulating cells. *Blood*. 109(1), 65-70.
- Kiem** HP, Wu RA, Sun G, von Laer D, Rossi JJ, Trobridge GD (2010). Foamy combinatorial anti-HIV vectors with MGMTP140K potently inhibit HIV-1 and SHIV replication and mediate selection in vivo. *Gene Ther.*17(1), 37-49.
- Knight** S, Collins M, Takeuchi Y (2013). Insertional Mutagenesis by Retroviral Vectors: Current Concepts and Methods of Analysis. *Curr. Gene Ther.* 13(3), 211-27.
- Krautwald** S, Ziegler E, Förster R, Ohl L, Amann K, Kunzendorf U (2004). Ectopic expression of CCL19 impairs alloimmune response in mice. *Immunology*. 112(2), 301-9.
- Kupiec** JJ, Tobaly-Tapiero J, Canivet M, Santillana-Hayat M, Flügel RM, Peries J, Emanoil-Ravier R (1988). Evidence for a gapped linear duplex DNA intermediate in the replicative cycle of human and simian spumaviruses. *Nucleic Acids Res.* 16, 9557-9565.
- Kupiec** JJ, Kay A, Hayat M, Ravier R, Peries J, Galibert F (1991). 534 Sequence analysis of the simian foamy virus type 1 genome. *Gene*. 101(2), 185-94.
- Learmont** JC, Geczy AF, Mills J, Ashton LJ, Raynes-Greenow CH, Garsia RJ, Dyer WB, McIntyre L, Oelrichs RB, Rhodes DI, Deacon NJ, Sullivan JS (1999). Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sydney Blood Bank Cohort. *N. Engl. J. Med.* 340(22), 1715-22.
- Lecellier** CH & Saib A (2000). Foamy viruses: between retroviruses and pararetroviruses. *Virology* 271, 1-8.
- Lecellier** CH, Vermeulen W, Bachelerie F, Giron ML, Saib A (2002). Intra- and intercellular trafficking of the foamy virus auxiliary bet protein. *J. Virol.* 76(7), 3388-94.
- Lehmann-Che** J, Renault N, Giron ML, Roingard P, Clave E, Tobaly-Tapiero J, Bittoun P, Toubert A, de The H, Saib A (2007). Centrosomal latency of incoming foamy viruses in resting cells. *PLoS Pathog.* 3(5), e74.
- Leurs** C, Jansen M, Pollok KE, Heinkelein M, Schmidt M, Wissler M, Lindemann D, Von Kalle C, Rethwilm A, Williams DA, Hanenberg H (2003). Comparison of three retroviral vector systems for transduction of nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice repopulating human CD34+ cord blood cells. *Hum. Gene Ther.*14(6), 509-19.
- Lindemann** D, Bock M, Schweizer M, Rethwilm A (1997). EYcient pseudotyping of murine leukemia virus particles with chimeric human foamy virus envelope proteins. *J. Virol.* 71, 4815-4820.

- Lindemann D**, Pietschmann T, Picard-Maureau M, Berg A, Heinkelein M, Thurow J, Knaus P, Zentgraf H, Rethwilm A (2001). A particle-associated glycoprotein signal peptide essential for virus maturation and infectivity. *J. Virol.* 75(13), 5762-71.
- Lindemann D** & Göpfert PA (2003). The foamy virus envelope glycoproteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 277, 111-129.
- Linial ML** (1999). Foamy viruses are unconventional retroviruses. *J. Virol.* 73, 1747-55.
- Linial ML** & Eastman SW (2003). Particle assembly and genome packaging. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 277, 89-110.
- Linial ML**, Fan H, Hahn B, Löwer R, Neil J, Quackenbush S, Rethwilm A, Sonigo P, Stoye JP, Tristem M, Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (2005) Retroviridae. In *Virus Taxonomy. Eds Elsevier Academic Press: London.* pp. 421-440.
- Liska V**, Khimani AH, Hofmann-Lehmann R, Fink AN, Vlasak J, Ruprecht RM (1999). Viremia and AIDS in rhesus macaques after intramuscular inoculation of plasmid DNA encoding full-length SIVmac239. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 15, 445-450.
- Löchelt M**, Zentgraf H, Flügel RM (1991). Construction of an infectious DNA clone of the full-length human spumaretrovirus genome and mutagenesis of the bel 1 gene. *Virology.* 184, 43-54.
- Löchelt M**, Flügel RM, Aboud M (1994). The human foamy virus internal promoter directs the expression of the functional Bel 1 transactivator and Bet protein early after infection. *J. Virol.* 68(2), 638-45.
- Löchelt M**, Yu SF, Flügel RM (1995). The human foamy virus internal promoter is required for efficient gene expression and infectivity. *Virology.* 206, 601-10.
- Löchelt M** (2003). Foamy virus transactivation and gene expression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 277, 27-61.
- Löchelt M**, Romen F, Bastone P, Muckenfuss H, Kirchner N, Kim YB, Truyen U, Rosler U, Battenberg M, Saib A, Flory E, Cichutek K, Munk C (2005). The antiretroviral activity of APOBEC3 is inhibited by the foamy virus accessory Bet protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102(22), 7982-7.
- Lu S**, Arthos J, Montefiori DC, Yasutomi Y, Manson K, Mustafa F, Johnson E, Santoro JC, Wissink J, Mullins JI, Haynes JR, Letvin NL, Wyand M, Robinson HL (1996). Simian immunodeficiency virus DNA vaccine trial in macaques. *J. Virol.* 70(6), 3978-91.
- Lüftenegger D**, Picard-Maureau M, Stanke N, Rethwilm A, Lindemann D (2005). Analysis and function of prototype foamy virus envelope N glycosylation. *J. Virol.* 79, 7664-7672.
- Luo JH**, Yu YP, Cieply K, Lin F, DeFlavia P, Dhir R, Finkelstein S, Michalopoulos G, Becich M (2002). Gene expression analysis of prostate cancers. *Mol. Carcinog.* 33(1), 25-35.

- Madan** RA, Arlen PM, Mohebtash M, Hodge JW, Gulley JL (2009). Prostavac-VF: a vector-based vaccine targeting PSA in prostate cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 18(7), 1001-11.
- Maurer** B, Bannert H, Darai G, Flügel RM (1988). Analysis of the primary structure of the long terminal repeat and the gag and pol genes of the human spumaretrovirus. *J. Virol.* 62(5), 1590-7.
- McLeod** DG, Adams GW, Gittleman MC, Bihartz DL, Reiling RB, Ruiz HE, Cochran JS, Prettyman J, Delcayre A, Godfrey WR, Legrand FA, Mann G, Bandman O (2013). Phase I dose escalation trial of MVA-BN-PRO in men with nonmetastatic castration-resistant prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2013 Genitourinary Cancers Symposium Vol 31, No 6_suppl (February 20 Supplement), 2013: 193.
- Meiering** CD & Linial ML (2001). Historical perspective of foamy virus epidemiology and infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 165–76.
- Meiering** CD & Linial ML (2002). Reactivation of a complex retrovirus is controlled by a molecular switch and is inhibited by a viral protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99(23), 15130-5.
- Mergia** A, Leung NJ, Blackwell J (1996). Cell tropism of the simian foamy virus type 1 (SFV-1). *J. Med. Primatol.* 25(1), 2-7.
- Mergia** A & Wu M (1998). Characterization of provirus clones of simian foamy virus type 1. *J. Virol.* 72(1), 817-22.
- Mitchell** RS, Beitzel BF, Schroder AR, Shinn P, Chen H, Berry CC, Ecker JR, Bushman FD (2004). Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS. Biol.* 2(8), e234.
- Möbes** A, Enssle J, Bieniasz PD, Heinkelein M, Lindemann D, Bock M, McClure MO, Rethwilm A (1997). Human foamy virus reverse transcription that occurs late in the viral replication cycle. *J. Virol.* 71(10), 7305-11.
- Morozov** VA, Copeland TD, Nagashima K, Gonda MA, Oroszlan S (1997). Protein composition and morphology of human foamy virus intracellular cores and extracellular particles. *Virology* 228(2), 307-17.
- Mouinga-Ondémé** A & Kazanji M (2013). Simian foamy virus in non-human primates and cross-species transmission to humans in Gabon: an emerging zoonotic disease in central Africa? *Viruses.* 5(6), 1536-52.
- Müllers** E, Uhlig T, Stirnnagel K, Fiebig U, Zentgraf H, Lindemann D (2011). Novel functions of prototype foamy virus Gag glycine-arginine-rich boxes in reverse transcription and particle morphogenesis. *J. Virol.* 85(4), 1452-63.

Mullis KB & Faloona FA (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-50.

Muranyi W & Flügel RM (1991). Analysis of splicing patterns of human spumaretrovirus by polymerase chain reaction reveals complex RNA structures. *J. Virol.* 65(2), 727-35.

Murphy GP, Tjoa BA, Simmons SJ, Rogers MK, Kenny GM, Jarisch J (2000). Higher-dose and less frequent dendritic cell infusions with PSMA peptides in hormone-refractory metastatic prostate cancer patients. *Prostate.* 43(1), 59-62.

Murray SM, Picker LJ, Axthelm MK, Linial ML (2006). Expanded tissue targets for foamy virus replication with simian immunodeficiency virus-induced immunosuppression. *J. Virol.* 80, 663-70.

Netzer KO, Schliephake A, Maurer B, Watanabe R, Aguzzi A, Rethwilm A (1993). Identification of pol-related gene products of human foamy virus. *Virology* 192(1), 336-8.

Nguyen-Hoai T, Hohn O, Vu MD, Baldenhofer G, Sayed Ahmed MS, Dorken B, Norley S, Lipp M, Pezzutto A, Westermann J (2012). CCL19 as an adjuvant for intradermal gene gun immunization in a Her2/neu mouse tumor model: improved vaccine efficacy and a role for B cells as APC. *Cancer Gene Ther.* 19(12), 880-7.

Niederstädt L, Hohn O, Dorner BG, Schade R, Bannert N (2012). Stimulation of IgY responses in gene gun immunized laying hens by combined administration of vector DNA coding for the target antigen Botulinum toxin A1 and for avian cytokine adjuvants. *J. Immunol. Methods.* 382(1-2), 58-67.

Nilsson BO, Carlsson L, Larsson A, Ronquist G (2001). Autoantibodies to prostasomes as new markers for prostate cancer. *Ups. J. Med. Sci.* 106, 43-9.

Norley S, Beer B, König H, Jensen F, Kurth R (1998). SIVmac vaccine studies using whole inactivated virus antigen sequentially depleted of viral proteins. *J. Med. Primatol.* 27(4), 184-92.

Nowrouzi A, Dittrich M, Klanke C, Heinkelein M, Rammling M, Dandekar T, von Kalle C, Rethwilm A (2006): Genome-wide mapping of foamy virus vector integrations into a human cell line. *J. Gen. Virol.* 87, 1339-47.

Park J, Nadeau PE, Mergia A (2002). A minimal genome simian foamy virus type 1 vector system with efficient gene transfer. *Virology.* 302(2), 236-44.

Park J, Nadeau P, Zucali JR, Johnson CM, Mergia A (2005). Inhibition of simian immunodeficiency virus by foamy virus vectors expressing siRNAs. *Virology.* 343(2), 275-82.

Park J, Nadeau PE, Mergia A (2009). Activity of TAR in inducible inhibition of HIV replication by foamy virus vector expressing siRNAs under the control of HIV LTR. *Virus Res.* 140(1-2), 112-20.

- Patton** GS, Erlwein O, McClure MO (2004). Cell-cycle dependence of foamy virus vectors. *J. Gen. Virol.* 85, 2925–2930.
- Pedersen** FS & Sørensen AB (2010). Pathogenesis of Oncoviral Infections. *Retroviruses*, 237–267.
- Perkovic** M, Schmidt S, Marino D, Russell RA, Stauch B, Hofmann H, Kopietz F, Kloke BP, Zielonka J, Ströver H, Hermle J, Lindemann D, Pathak VK, Schneider G, Löchelt M, Cichutek K, Münk C (2009). Species-specific inhibition of APOBEC3C by the prototype foamy virus protein bet. *J. Biol. Chem.* 284(9), 5819–26.
- Perkovic** M, Norley S, Sanzenbacher R, Battenberg M, Panitz S, Coulibaly C, Flory E, Siegismund C, Munk C, Cichutek K (2010). SIVagm containing the SHIV89.6P Envelope gene replicates poorly and is non-pathogenic. *Virology* 399, 87–97.
- Peters** K, Wiktorowicz T, Heinkelein M, Rethwilm A (2005). RNA and protein requirements for incorporation of the Pol protein into foamy virus particles. *J. Virol.* 79(11), 7005–13.
- Petit** C, Giron ML, Tobaly-Tapiero J, Bittoun P, Real E, Jacob Y, Tordo N, De The H, Saib A (2003). Targeting of incoming retroviral Gag to the centrosome involves a direct interaction with the dynein light chain 8. *J. Cell Sci.* 116(Pt 16), 3433–42.
- Pfaffl** MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9), e45.
- Pfreppe** KI, Rackwitz HR, Schnolzer M, Heid H, Löchelt M, Flügel RM (1998). Molecular characterization of proteolytic processing of the Pol proteins of human foamy virus reveals novel features of the viral protease. *J. Virol.* 72(9), 7648–52.
- Picard-Maureau** M, Jarmy G, Berg A, Rethwilm A, Lindemann D (2003). Foamy virus envelope glycoprotein-mediated entry involves a pH-dependent fusion process. *J. Virol.* 77(8), 4722–30.
- Pietschmann** T, Zentgraf H, Rethwilm A, Lindemann D (2000). An evolutionarily conserved positively charged amino acid in the putative membrane-spanning domain of the foamy virus envelope protein controls fusion activity. *J. Virol.* 74, 4474–4482.
- Pósfai** G, Plunkett III G, Fehér T, Frisch D, Keil GM, Umenhoffer K, Kolisnychenko V, Stahl B, Sharma SS, de Arruda M, Burland V, Harcum SW, Blattner FR (2006). Emergent properties of reduced-genome Escherichia coli. *Science.* 312(5776), 1044–6.
- Reiter** RE, Gu Z, Watabe T, Thomas G, Szigeti K, Davis E, Wahl M, Nisitani S, Yamashiro J, Le Beau MM, Loda M, Witte ON (1997). Prostate stem cell antigen: a cell surface marker overexpressed in prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 1735–40.
- Rerks-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 JG, Francis DP, Stablein

D, Birx DL, Chunsuttiwat S, Khamboonruang C, Thongcharoen P, Robb ML, Michael NL, Kunasol P, Kim JH; MOPH-TAVEG Investigators (2009). Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N. Engl. J. Med.* 361(23), 2209-20.

Rethwilm A, Baunach G, Netzer KO, Maurer B, Borisch B, ter Meulen V (1990). Infectious DNA of the human spumaretrovirus. *Nucleic Acids Res.* 18(4), 733-8.

Rethwilm A, Erlwein O, Baunach G, Maurer B, ter Meulen V (1991). The transcriptional transactivator of human foamy virus maps to the bel 1 genomic region. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 941-945.

Rethwilm A (2003). The replication strategy of Foamy Viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 277, 1-26.

Rethwilm A (2010). Molecular biology of foamy viruses. *Med. Microbiol. Immunol.* 199, 197-207.

Rinke CS, Boyer PL, Sullivan MD, Hughes SH, Linial ML (2002). Mutation of the catalytic domain of the foamy virus reverse transcriptase leads to loss of processivity and infectivity. *J. Virol.* 76, 7560-7570.

Robb ML (2008). Failure of the Merck HIV vaccine: an uncertain step forward. *Lancet.* 372(9653), 1857-8.

Romen F, Backes P, Materniak M, Sting R, Vahlenkamp TW, Riebe R, Pawlita M, Kuzmak J, Löchelt M (2007). Serological detection systems for identification of cows shedding bovine foamy virus via milk. *Virology.* 364(1), 123-31.

Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE Jr, Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA, Swain SM, Pisansky TM, Fehrenbacher L, Kutteh LA, Vogel VG, Visscher DW, Yothers G, Jenkins RB, Brown AM, Dakhil SR, Mamounas EP, Lingle WL, Klein PM, Ingle JN, Wolmark N (2005). Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 353(16), 1673-84.

Rubin MA, Zhou M, Dhanasekaran SM, Varambally S, Barrette TR, Sanda MG, Pienta KJ, Ghosh D, Chinnaiyan AM (2002). alpha-Methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *JAMA.* 287(13), 1662-70.

Russell RA, Wiegand HL, Moore MD, Schafer A, McClure MO, Cullen BR (2005). Foamy virus Bet proteins function as novel inhibitors of the APOBEC3 family of innate antiretroviral defense factors. *J. Virol.* 79(14), 8724-31.

Ryan MD, King AM, Thomas GP (1991). Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence. *J. Gen. Virol.* 72(Pt 11), 2727-2732.

Ryan MD & Drew J (1994). Foot-and-mouth disease virus 2A oligopeptide mediated cleavage of an artificial polyprotein. *EMBO J.* 13(4), 928-33.

Saffran DC, Raitano AB, Hubert RS, Witte ON, Reiter RE, Jakobovits A (2001). Anti-PSCA mAbs inhibit tumor growth and metastasis formation and prolong the survival of mice bearing human prostate cancer xenografts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98(5), 2658-63.

Saib A, Peries J, de The H (1995a): Recent insights into the biology of the human foamy virus. *Trends. Microbiol.* 3, 173-78.

Saib A, Koken MH, van der Spek P, Peries J, de The H (1995b). Involvement of a spliced and defective human foamy virus in the establishment of chronic infection. *J. Virol.* 69(9), 5261-8.

Saib A, Neves M, Giron ML, Guillemin MC, Valla J, Peries J, Canivet M (1997a). Long-term persistent infection of domestic rabbits by the human foamy virus. *Virology.* 228, 263-268.

Saib A, Puvion-Dutilleul F, Schmid M, Peries J, de The H (1997b). Nuclear targeting of incoming human foamy virus Gag proteins involves a centriolar step. *J. Virol.* 71(2), 1155-61.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230, 1350-4.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press NY.* 1, 3.

Sampson JH, Aldape KD, Archer GE, Coan A, Desjardins A, Friedman AH, Friedman HS, Gilbert MR, Herndon JE, McLendon RE, Mitchell DA, Reardon DA, Sawaya R, Schmittling R, Shi W, Vredenburgh JJ, Bigner DD, Heimberger AB (2011). Greater chemotherapy-induced lymphopenia enhances tumor-specific immune responses that eliminate EGFRvIII-expressing tumor cells in patients with glioblastoma. *Neuro Oncol.* 13(3), 324-33.

Sanda MG, Ayyagari SR, Jaffee EM, Epstein JI, Clift SL, Cohen LK, Dranoff G, Pardoll DM, Mulligan RC, Simons JW (1994). Demonstration of a rational strategy for human prostate cancer gene therapy. *J. Urol.* 151(3), 622-8.

Sandstrom PA, Phan KO, Switzer WM, Fredeking T, Chapman L, Heneine W, Folks TM (2000). Simian foamy virus infection among zoo keepers. *Lancet* 355, 551-552.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74(12), 5463-7.

Santillana-Hayat M, Rozain F, Bittoun P, Chopin-Robert C, Lasneret J, Peries J, Canivet M (1993). Transient immunosuppressive effect induced in rabbits and mice by the human spumaretrovirus prototype HFV (human foamy virus). *Res. Virol.* 144, 389-396.

Schliephake AW & Rethwilm A (1994). Nuclear localization of foamy virus Gag precursor protein. *J. Virol.* 68, 4946–4954.

Schmidt M & Rethwilm A (1995). Replicating foamy virus-based vectors directing high level expression of foreign genes. *Virology.* 210(1), 167-78.

Schmidt M, Herchenroder O, Heeney J, Rethwilm A (1997a). Long terminal repeat U3 length polymorphism of human foamy virus. *Virology.* 230, 167-178.

Schmidt M, Niewiesk S, Heeney J, Aguzzi A, Rethwilm A (1997b). Mouse model to study the replication of primate foamy viruses. *J. Gen. Virol.* 78 (Pt 8), 1929-1933.

Schwantes A, Ortlepp I, Löchelt M (2002). Construction and functional characterization of feline foamy virus-based retroviral vectors. *Virology.* 301(1), 53-63.

Schwantes A, Truyen U, Weikel J, Weiss C, Löchelt M (2003). Application of chimeric feline foamy virus-based retroviral vectors for the induction of antiviral immunity in cats. *J. Virol.* 77(14), 7830-42.

Schweizer M, Turek R, Hahn H, Schliephake A, Netzer KO, Eder G, Reinhardt M, Rethwilm A, Neumann-Haefelin D (1995). Markers of foamy virus infections in monkeys, apes, and accidentally infected humans: Appropriate testing fails to confirm suspected foamy virus prevalence in humans. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 11, 161–170.

Schweizer M, Schleer H, Pietrek M, Liegibel J, Falcone V, Neumann-Haefelin D (1999). Genetic stability of foamy viruses: long-term study in an African green monkey population. *J. Virol.* 73, 9256–9265.

Sekaly RP (2008). The failed HIV Merck vaccine study: a step back or a launching point for future vaccine development? *J. Exp. Med.* 205(1), 7-12.

Seth A, Ourmanov I, Kuroda MJ, Schmitz JE, Carroll MW, Wyatt LS, Moss B, Forman MA, Hirsch VM, Letvin NL (1998). Recombinant modified vaccinia virus Ankara-simian immunodeficiency virus gag pol elicits cytotoxic T lymphocytes in rhesus monkeys detected by a major histocompatibility complex class I/peptide tetramer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95(17), 10112-6.

Siegismund CS, Hohn O, Kurth R, Norley S (2009). Enhanced T- and B-cell responses to simian immunodeficiency virus (SIV)agm, SIVmac and human immunodeficiency virus type 1 Gag DNA immunization and identification of novel T-cell epitopes in mice via codon optimization. *J. Gen. Virol.* 90(Pt 10), 2513-8.

Small E, Demkow T, Gerritsen W, Rolland F, Hoskin P, Smith D, et al. (2009). A phase III trial of GVAX immunotherapy for prostate cancer in combination with docetaxel versus docetaxel plus prednisone in symptomatic, castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Genitourinary Cancers Symposium.*

Soneoka Y, Cannon PM, Ramsdale EE, Griffiths JC, Romano G, Kingsman SM, Kingsman AJ (1995). A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res.* 23(4), 628-33.

Swack NS & Hsiung GD (1975). Pathogenesis of simian foamy virus infection in natural and experimental hosts. *Infect. Immun.* 12, 470-474.

Switzer WM, Salemi M, Shanmugam V, Gao F, Cong M. E, Kuiken C, Bhullar V, Beer BE, Vallet D, Gautier-Hion A, Tooze Z, Villinger F, Holmes EC, Heneine W (2005). Ancient co-speciation of simian foamy viruses and primates. *Nature.* 434, 376-380.

Taylor JA, Vojtech L, Bahner I, Kohn DB, Laer DV, Russell DW, Richard RE (2008). Foamy virus vectors expressing anti-HIV transgenes efficiently block HIV-1 replication. *Mol. Ther.* 16(1), 46-51.

Trobridge GD, Josephson N, Vassilopoulos G, Mac J, Russell DW (2002). Improved foamy virus vectors with minimal viral sequences. *Mol. Ther.* 6(3), 321-8.

Trobridge GD & Russell DW (2004). Cell cycle requirements for transduction by foamy virus vectors compared to those of oncovirus and lentivirus vectors. *J. Virol.* 78, 2327-2335.

Trobridge GD, Miller DG, Jacobs MA, Allen JM, Kiem HP, Kaul R, Russell DW (2006). Foamy virus vector integration sites in normal human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103(5), 1498-503.

Vanichseni S, Tappero JW, Pitisuttithum P, Kitayaporn D, Mastro TD, Vimutisunthorn E, van Griensvan F, Heyward WL, Francis DP, Choopanya K; Bangkok Vaccine Evaluation Group (2004). Recruitment, screening and characteristics of injection drug users participating in the AIDS VAX B/E HIV vaccine trial, Bangkok, Thailand. *AIDS.* 18(2), 311-6.

Venkatesh LK & Chinnadurai G (1993). The carboxy-terminal transcription enhancement region of the human spumaretrovirus transactivator contains discrete determinants of the activator function. *J. Virol.* 67(7), 3868-76.

Wagner A, Doerks A, Aboud M, Alonso A, Tokino T, Flügel RM, Löchelt M (2000). Induction of cellular genes is mediated by the Bell transactivator in foamy virus-infected human cells. *J. Virol.* 74(10), 4441-7.

Wang X, Yu J, Sreekumar A, Varambally S, Shen R, Giacherio D, Mehra R, Montie JE, Pienta KJ, Sanda MG, Kantoff PW, Rubin MA, Wei JT, Ghosh D, Chinnaiyan AM (2005). Autoantibody signatures in prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* 353(12), 1224-35.

Watanaveeradej V, Benenson MW, Souza MD, Sirisopana N, Nitayaphan S, Tontichaivanich C, Amphapit R, Renzullo PO, Brown AE, McNeil JG, Robb ML, Birx DL, Tovanabutra S, Carr JK, McCutchan FE (2006). Molecular epidemiology of HIV Type 1 in preparation for a Phase III prime-boost vaccine trial in Thailand and a new approach to HIV Type 1 genotyping. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 22(8), 801-7.

- Watkins** DI, Burton DR, Kallas EG, Moore JP, Koff WC (2008). Nonhuman primate models and the failure of the Merck HIV-1 vaccine in humans. *Nat. Med.* 14(6), 617-21.
- Wiktorowicz** T, Peters K, Armbruster N, Steinert AF, Rethwilm A (2009). Generation of an improved foamy virus vector by dissection of cis-acting sequences. *J. Gen. Virol.* 90, 481-487.
- Wolfe** ND, Switzer WM, Carr JK, Bhullar VB, Shanmugam V, Tamoufe U, Prosser AT, Torimiro JN, Wright A, Mpoudi-Ngole E, McCutchan FE, Birx DL, Folks TM, Burke DS, Heneine W (2004). Naturally acquired simian retrovirus infections in central African hunters. *Lancet* 363, 932-37.
- Wu** M, Chari S, Yanchis T, Mergia A (1998). cis-Acting sequences required for simian foamy virus type 1 vectors. *J. Virol.* 72(4), 3451-4.
- Wu** M & Mergia A (1999). Packaging cell lines for simian foamy virus type 1 vectors. *J. Virol.* 73(5), 4498-501.
- Wu** X, Li Y, Crise B, Burgess SM (2003). Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* 300, 1749-1751.
- Xin** KQ, Urabe M, Yang J, Nomiyama K, Mizukami H, Hamajima K, Nomiyama H, Saito T, Imai M, Monahan J, Okuda K, Ozawa K, Okuda K (2001). A novel recombinant adeno-associated virus vaccine induces a long-term humoral immune response to human immunodeficiency virus. *Hum. Gene Ther.* 12(9), 1047-61.
- Yu** SF & Linial ML (1993). Analysis of the role of the bel and bet open reading frames of human foamy virus by using a new quantitative assay. *J. Virol.* 67(11), 6618-24.
- Yu** SF, Baldwin DN, Gwynn SR, Yendapalli S, Linial ML (1996). Human foamy virus replication: A pathway distinct from that of retroviruses and hepadnaviruses. *Science.* 271, 1579-1581.
- Yu** SF, Sullivan MD, Linial ML (1999). Evidence that the human foamy virus genome is DNA. *J. Virol.* 73(2), 1565-72.
- Zemba** M, Wilk T, Rutten T, Wagner A, Flügel RM, Löchelt M (1998). The carboxy-terminal p3Gag domain of the human foamy virus Gag precursor is required for efficient virus infectivity. *Virology.* 247, 7-13.
- Zucali** JR, Ciccarone T, Kelley V, Park J, Johnson CM, Mergia A (2002). Transduction of umbilical cord blood CD34+ NOD/SCID-repopulating cells by simian foamy virus type 1 (SFV-1) vector. *Virology.* 302(2), 229-35.

7.2 Internetquellen

- **RKI - EpiBul 48/2009; EpiBul 46/2011; EpiBul 47/2012**
https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/epid_bull_form.html
- **RKI - Krebs in Deutschland 2007/2008 -**
http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_node.html
- **UNAIDS - Global report 2013 -**
<http://www.unaids.org/en/resources/campaigns/globalreport2013/globalreport/>
- **iavireport.org Volume 17, Nr. 2**
(CMV-based vaccine elicits a new kind of T-cell response in macaques)
<http://www.iavireport.org/Back-Issues/Pages/IAVI-Report-17-%282%29-Research-Briefs.aspx>

8. Publikationen

Paper

Virology 2014, 448, S. 65–73

A novel small animal model to study the replication of simian foamy virus *in vivo*

Rico Blochmann¹, Christoph Curths¹, Cheick Coulibaly², Klaus Cichutek², Reinhard Kurth¹,

Stephen G. Norley¹, Norbert Bannert¹, Uwe Fiebig¹

¹ Center for HIV and other Retroviruses, Robert Koch-Institute, Berlin, Germany

² Paul-Ehrlich-Institute, Langen, Germany

Poster

EUROPRISE Network Annual conference 14. – 17. November, 2011, Prag

Development of replicating foamy viral vectors capable of prolonged antigen presentation

Rico Blochmann, Reinhard Kurth, Steve Norley, Uwe Fiebig

Robert Koch-Institute, Nordufer 20, 13353 Berlin, Germany

EUROPRISE Network Annual conference 16. – 18. November, 2010, Lisabon

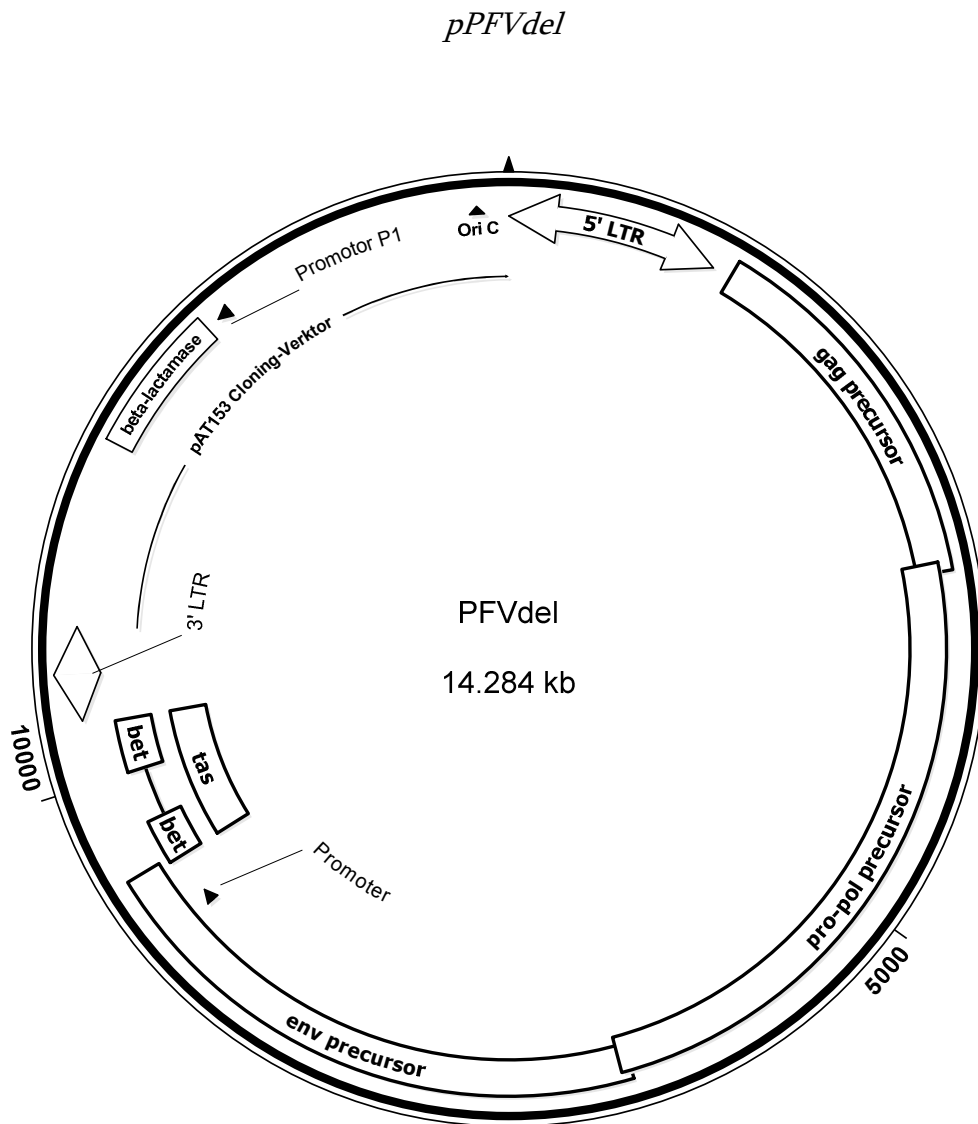
Development of a new vaccine strategy based on modified foamy viral vectors

Rico Blochmann, Reinhard Kurth, Steve Norley, Uwe Fiebig

Robert Koch-Institute, Nordufer 20, 13353 Berlin, Germany

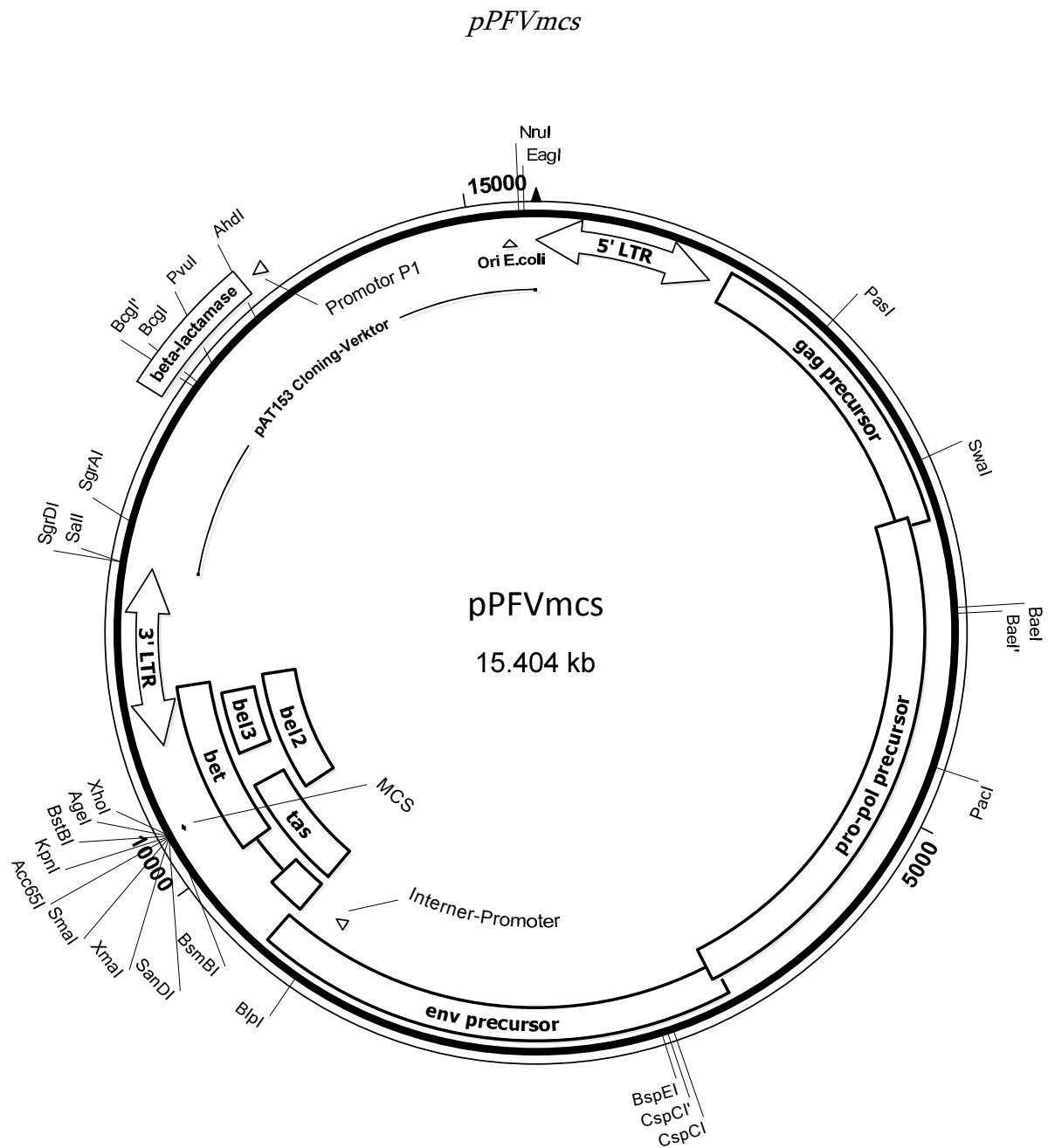
9. Curriculum Vitae

Der Lebenslauf ist in der Online-Version
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten



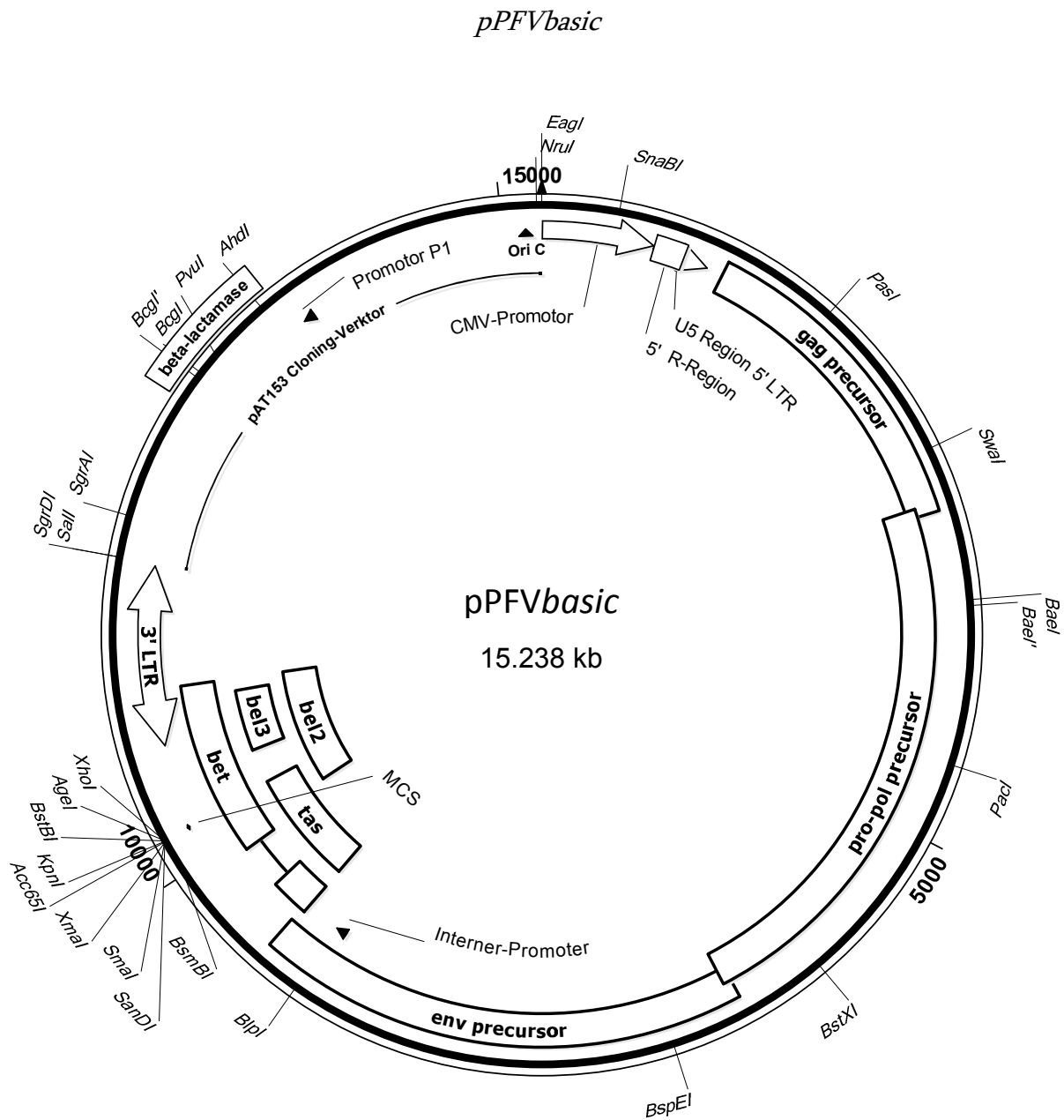
Vektorkarte der PFV Negativkontrolle PFVdel

Dieser Klon ist zufällig entstanden und beinhaltet eine große Deletion in der 3'LTR. Dadurch wurden wichtige, für die Replikation essentielle Sequenzen deletiert. Dieser Vektor zeigte keine Replikationskompetenz *in vitro*.



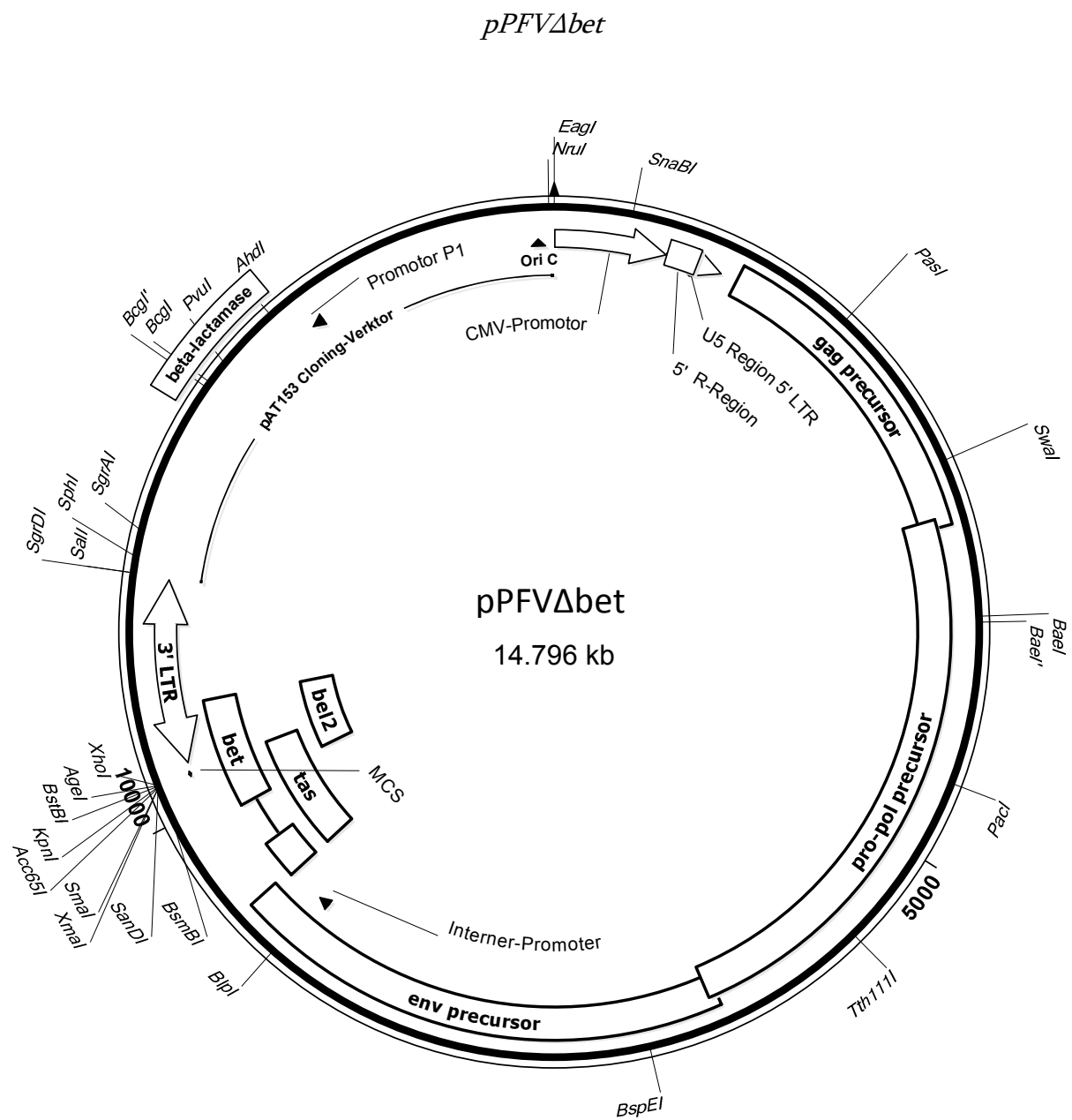
Vektorkarte des viralen Basis-Vektors pPFVmcs

Zu sehen ist die Lage des Klonierungsvektors pAT153. Weiterhin sind die einzelnen Gene *gag*, *pol*, *env*, *tas* und *bet* des viralen Genoms aufgeführt, welche sich zwischen den LTR-Sequenzen befinden. Ebenfalls ist die Lage des Internen Promotors und der eingefügten MCS eingezeichnet. Zudem wurden die *singlet cutter* RE-Schnittstellen der MCS und des Vektors aufgeführt. Der Vektor hat eine Größe von 15.404 bp.



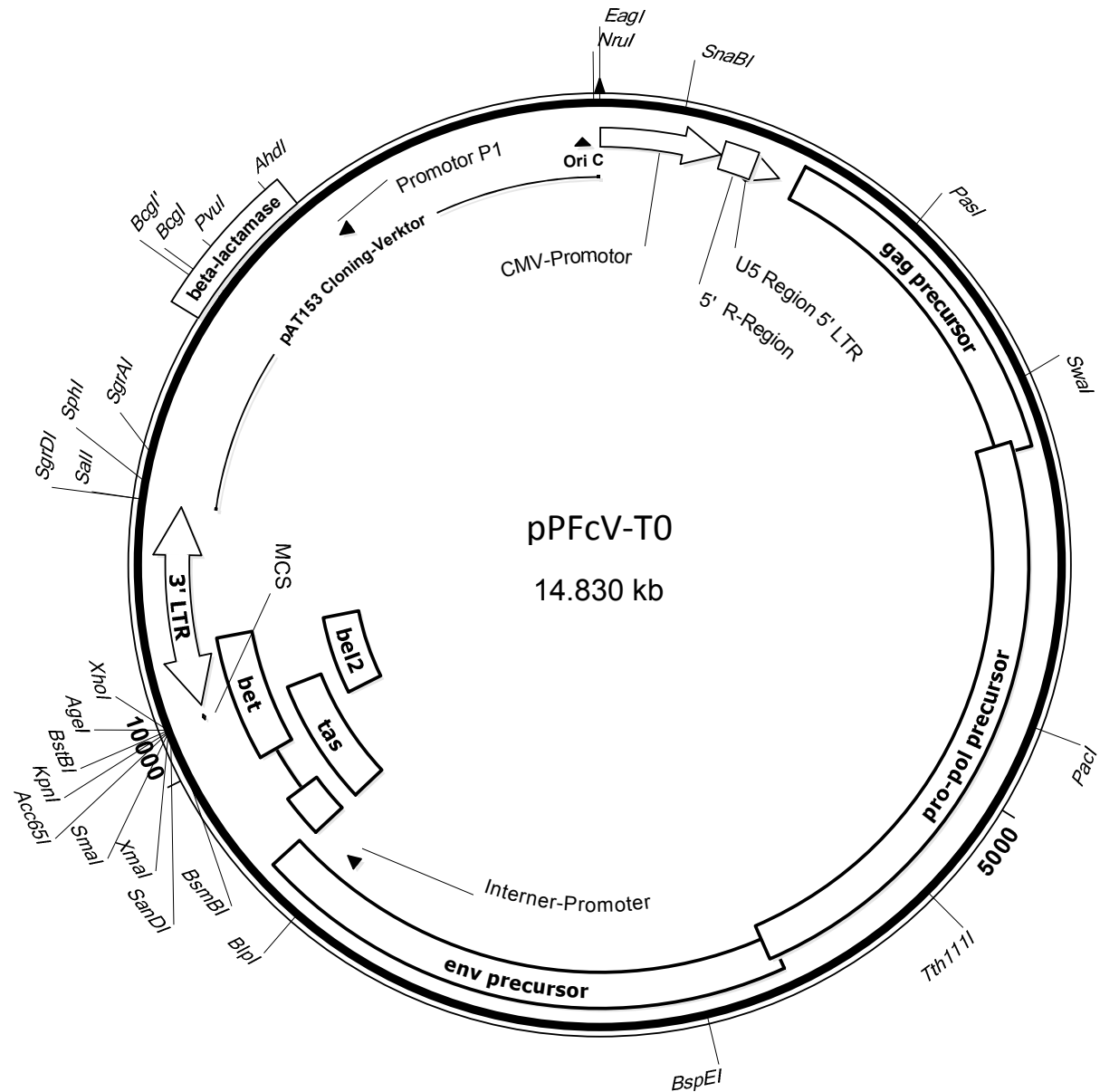
Vektorkarte des viralen Basis-Vektors pPFVbasic

Dieser Klon hat den Vektor pPFV_{mcs} zur Basis. Zu sehen ist die Lage des Klonierungsvektors pAT153. Weiterhin sind die einzelnen Gene *gag*, *pol*, *env*, *tas* und *bet* des viralen Genoms aufgeführt, welche sich zwischen den LTR-Sequenzen befinden. Die 5'LTR wurde teilweise durch ein CMV-EI-Promotorelement ersetzt. Ebenfalls ist die Lage des Internen Promotors und der eingefügten MCS eingezeichnet. Zudem wurden die *singlet cutter* RE-Schnittstellen der MCS und des Vektors aufgeführt. Der Vektor hat eine Größe von 15.238 bp.

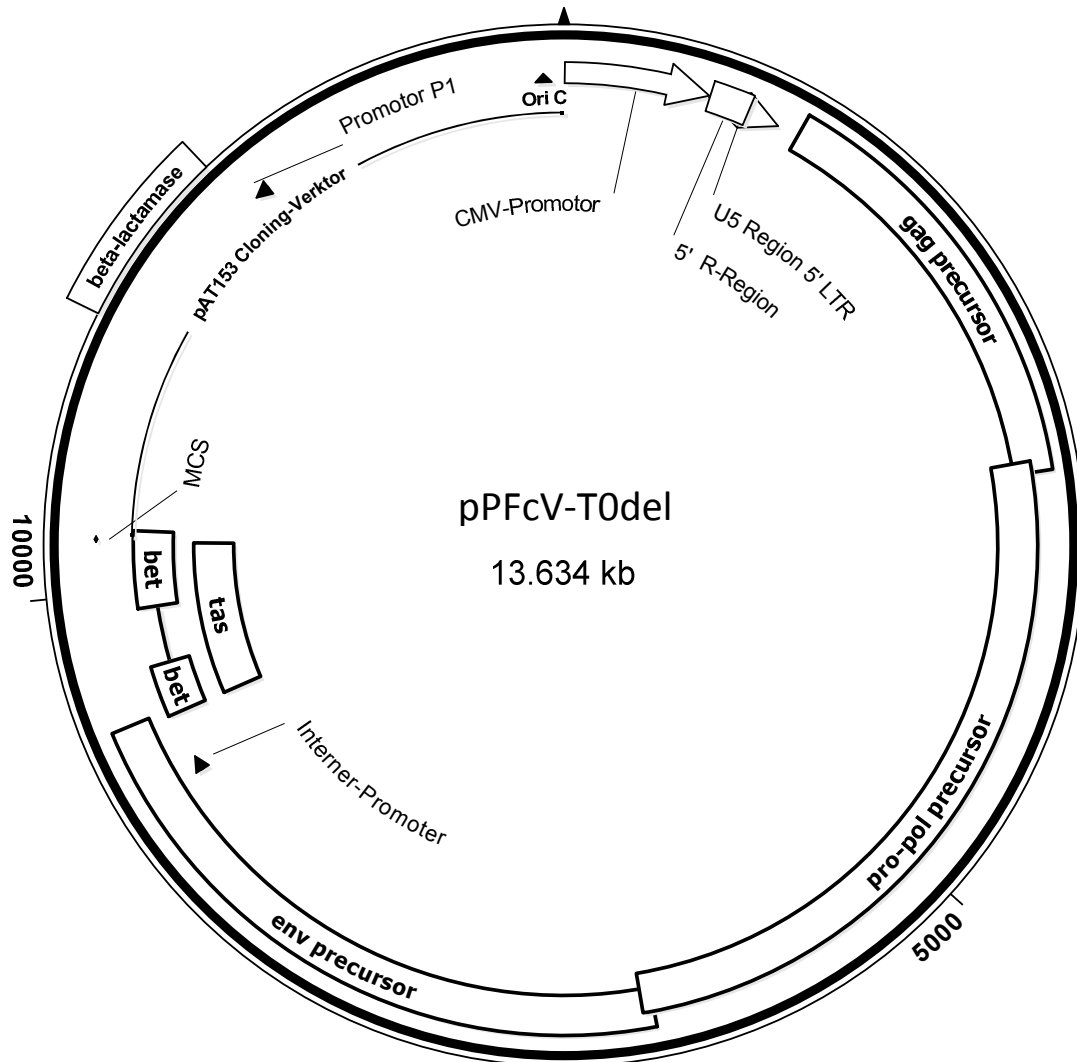


Vektorkarte des viralen Basis-Vektors pPFVΔbet

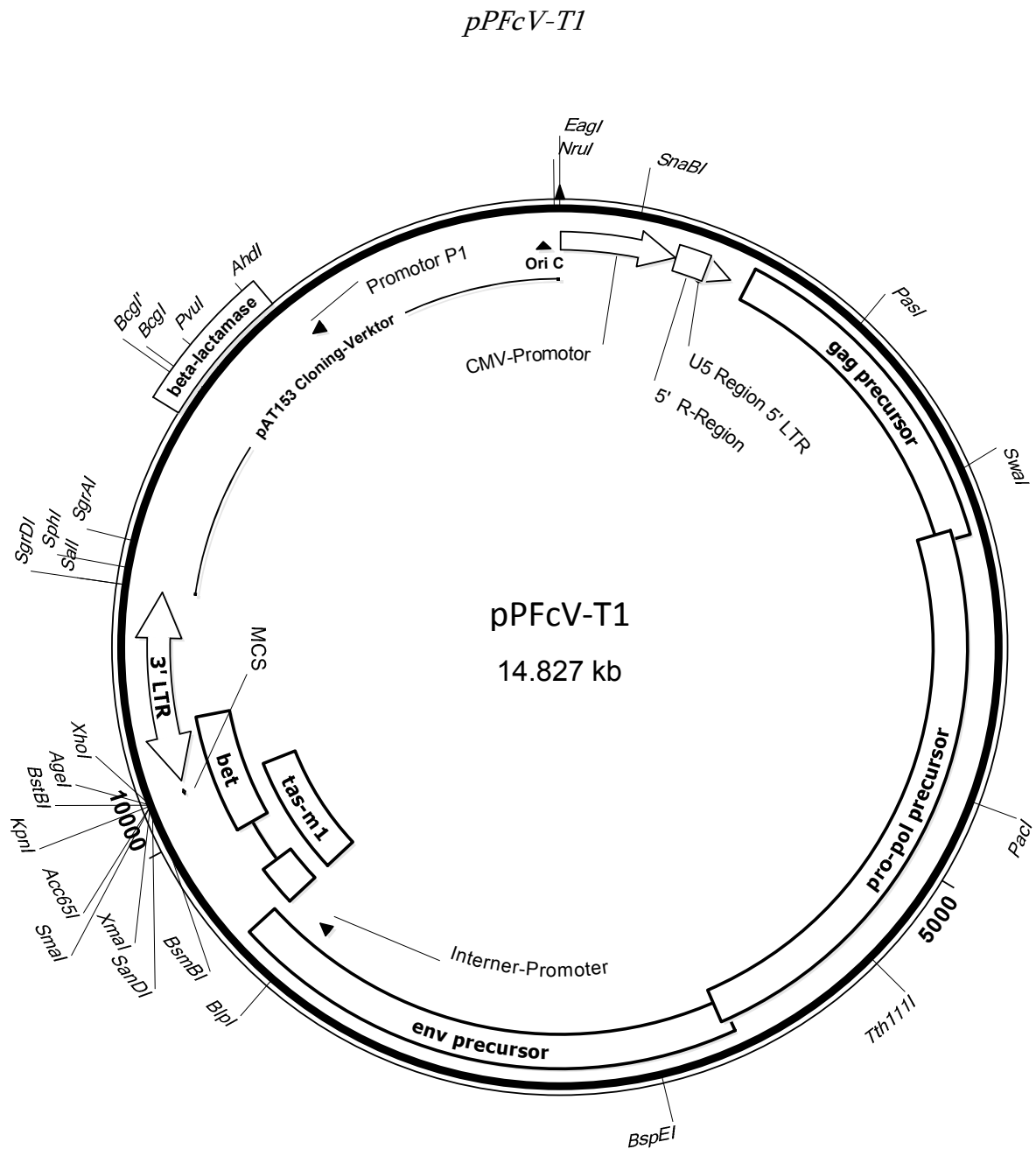
Dieser Klon hat den Vektor pPFVbasic zur Basis. Zu sehen ist die Lage des Klonierungsvektors pAT153. Weiterhin sind die einzelnen Gene *gag*, *pol*, *env*, *tas* und Δbet des viralen Genoms aufgeführt, welche sich zwischen den LTR-Sequenzen befinden. Die 5'LTR wurde teilweise durch ein CMV-EI-Promotorelement ersetzt. Ebenfalls ist die Lage des Internen Promotors und der eingefügten MCS eingezeichnet. Zudem wurden die *singel cutter* RE-Schnittstellen der MCS und des Vektors aufgeführt. Aus diesem viralen Genom wurde teilweise der *bet*-Leserahmen entfernt. Der Vektor hat eine Größe von 14.796 bp.

pPFcV-T0**Vektorkarte des viralen Basis-Vektors pPFcV-T0**

Dieser Klon hat den Vektor pPFV Δ bet zur Basis. Zu sehen ist die Lage des Klonierungsvektors pAT153. Weiterhin sind die einzelnen Gene *gag*, *pol*, *env*, *tas* und Δ *bet* des viralen Genoms aufgeführt, welche sich zwischen den LTR-Sequenzen befinden. Die 5'LTR wurde teilweise durch ein CMV-EI-Promotorelement ersetzt. Ebenfalls ist die Lage des Internen Promotors und der eingefügten MCS eingezeichnet. Zudem wurden die *singlet cutter* RE-Schnittstellen der MCS und des Vektors aufgeführt. Aus diesem viralen Genom wurde teilweise der *bet*-Leserahmen entfernt. Der Vektor hat eine Größe von 14.830 bp.

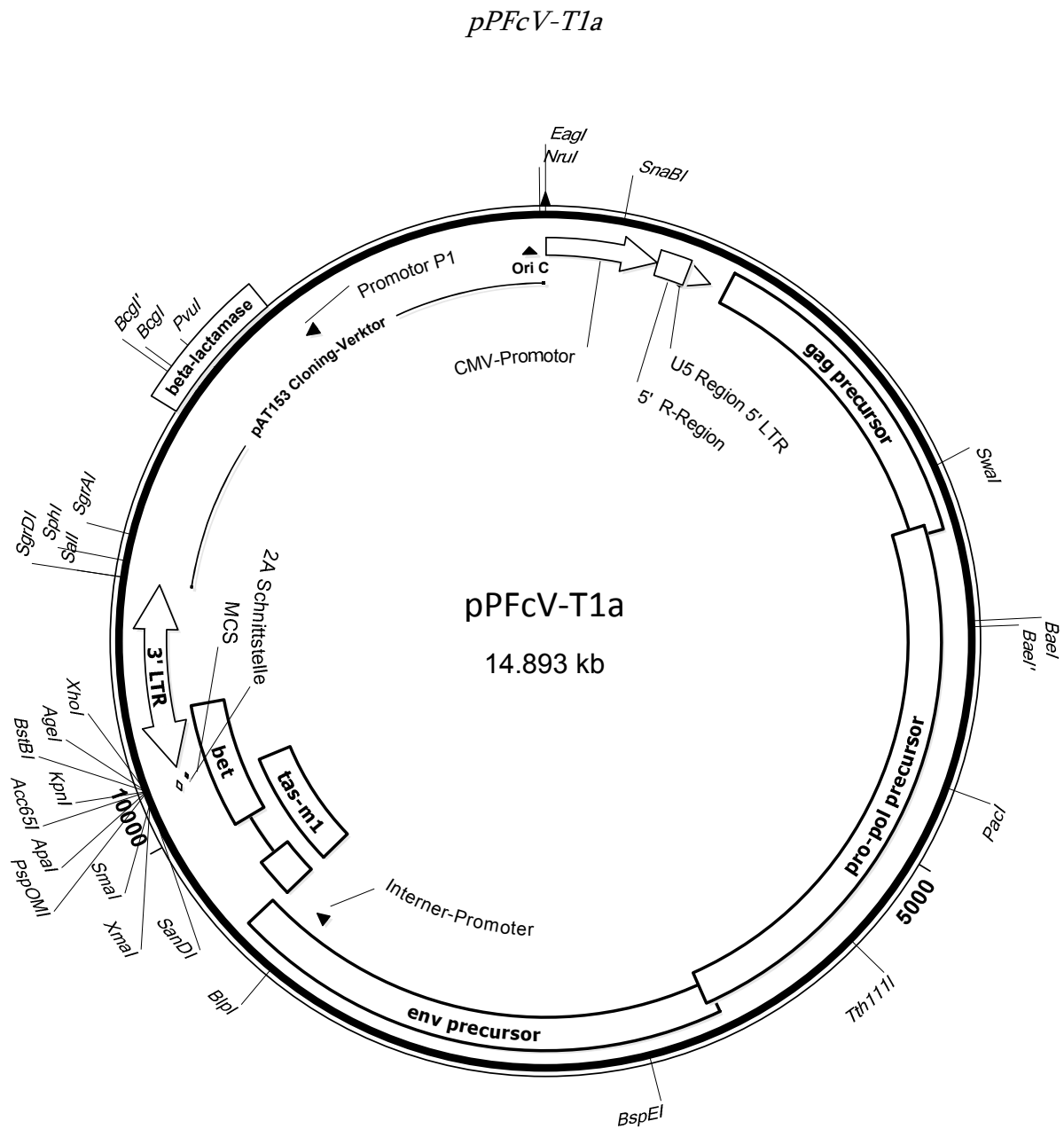
pPFcV-T0del**Vektorkarte der Basisvektor-Negativkontrolle PFcV-T0del**

Diesem Klon wurde die komplette 3'LTR entfernt. Dadurch wurden wichtige, für die Replikation essentiellen, Sequenzen deletiert. Dieser Vektor zeigte keine Replikationskompetenz *in vitro*.



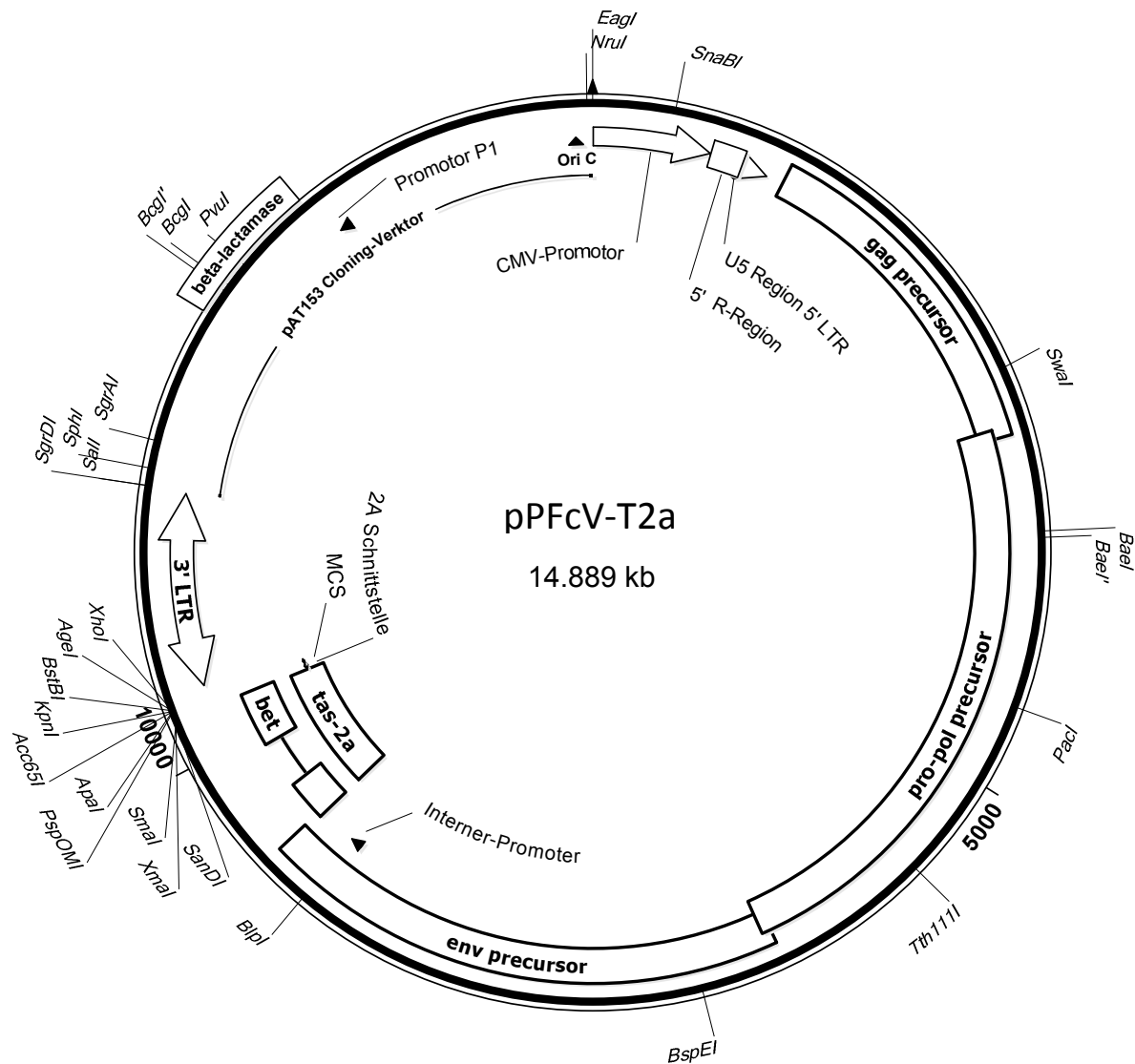
Vektorkarte des viralen Basis-Vektors pPFcV-T1

Dieser Klon hat den Vektor pPFV Δ bet zur Basis. Zu sehen ist die Lage des Klonierungsvektors pAT153. Weiterhin sind die einzelnen Gene *gag*, *pol*, *env*, *tasm1* und Δ *bet* des viralen Genoms aufgeführt, welche sich zwischen den LTR-Sequenzen befinden. Die 5'LTR wurde teilweise durch ein CMV-EI-Promotorelement ersetzt. Ebenfalls ist die Lage des Internen Promotors und der eingefügten MCS eingezeichnet. Zudem wurden die *singlet cutter* RE-Schnittstellen der MCS und des Vektors aufgeführt. Aus diesem viralen Genom wurde teilweise der *bet*-Leserahmen entfernt. Der Vektor hat eine Größe von 14.827 bp.

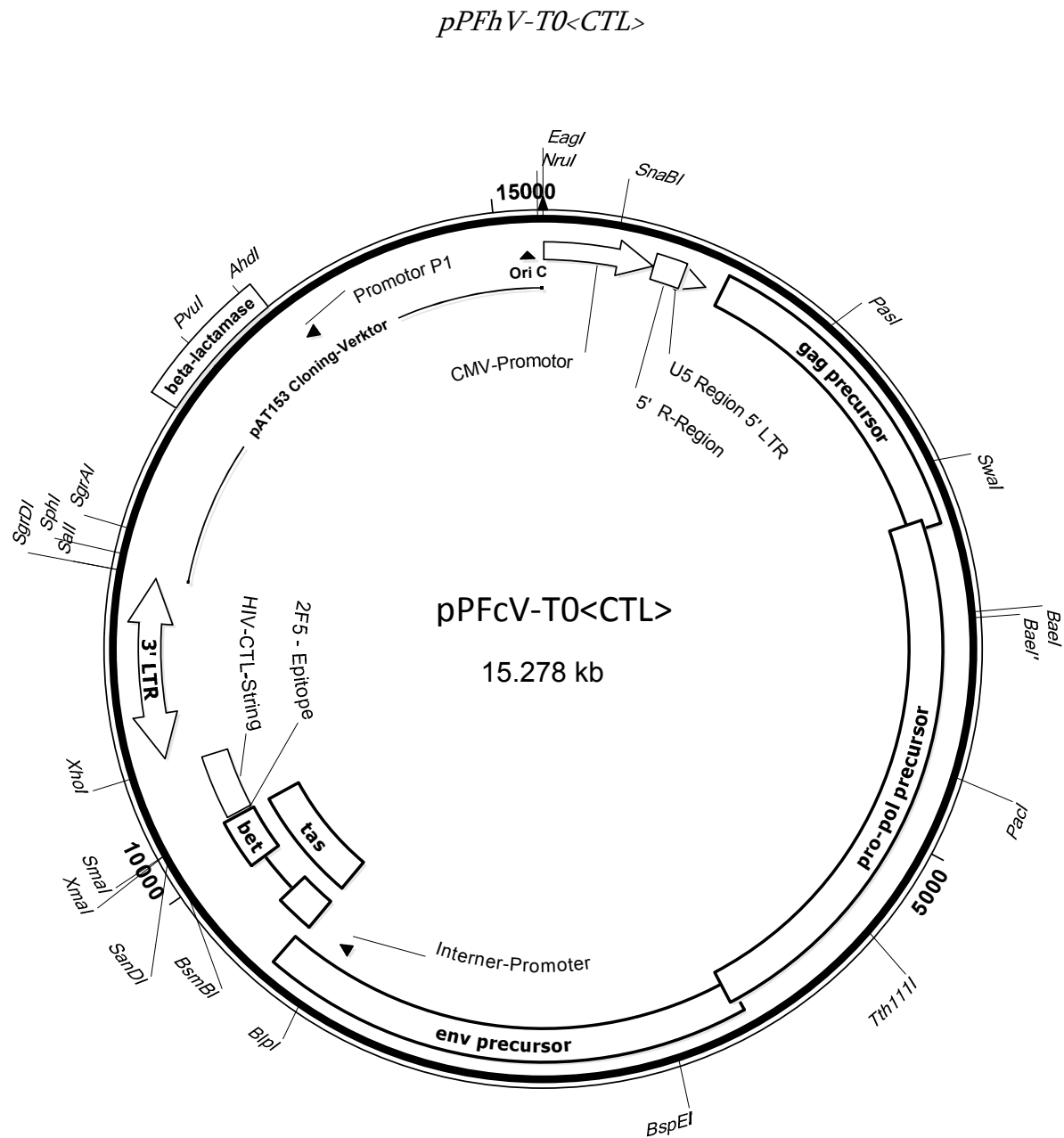


Vektorkarte des viralen Basis-Vektors pPFcV-T1a

Dieser Klon hat den Vektor pPFcV-T1 zur Basis. Zu sehen ist die Lage des Klonierungsvektors pAT153. Weiterhin sind die einzelnen Gene *gag*, *pol*, *env*, *tasm1* und Δbet des viralen Genoms aufgeführt, welche sich zwischen den LTR-Sequenzen befinden. Die 5'LTR wurde teilweise durch ein CMV-EI-Promotorelement ersetzt. Ebenfalls ist die Lage des Internen Promotors und der eingefügten 2A Schnittstelle, sowie der MCS eingezeichnet. Zudem wurden die *single cutter* RE-Schnittstellen der MCS und des Vektors aufgeführt. Aus diesem viralen Genom wurde teilweise der *bet*-Leserahmen entfernt. Der Vektor hat eine Größe von 14.893 bp.

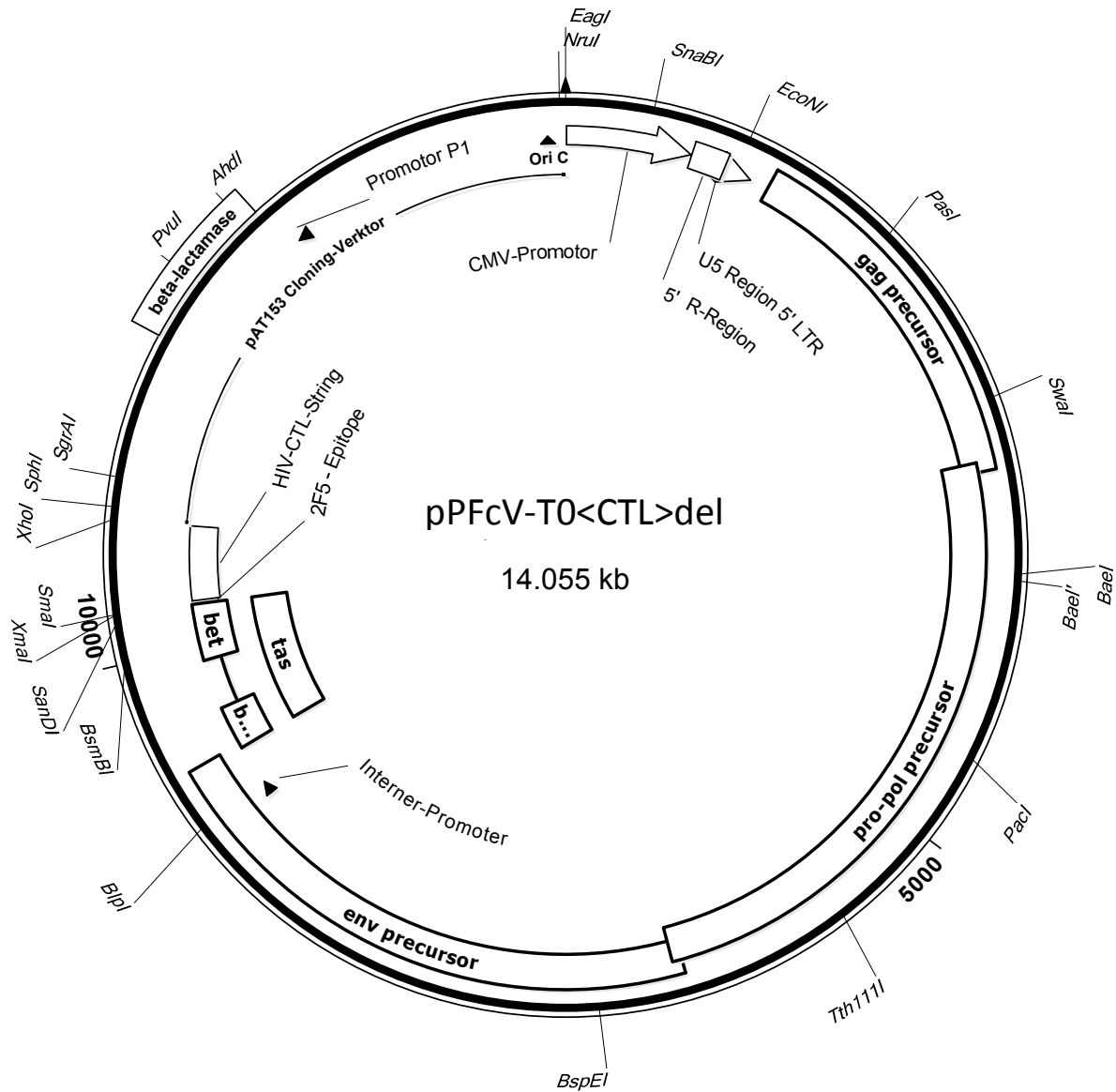
pPFcV-T2a**Vektorkarte des viralen Basis-Vektors pPFcV-T2a**

Dieser Klon hat den Vektor pPFcV-T0 zur Basis. Zu sehen ist die Lage des Klonierungsvektors pAT153. Weiterhin sind die einzelnen Gene *gag*, *pol*, *env*, *tas2a* und Δbet des viralen Genoms aufgeführt, welche sich zwischen den LTR-Sequenzen befinden. Die 5'LTR wurde teilweise durch ein CMV-EI-Promotorelement ersetzt. Ebenfalls ist die Lage des Internen Promotors und der eingefügten 2A Schnittstelle, sowie der MCS eingezeichnet. Zudem wurden die *singlet cutter* RE-Schnittstellen der MCS und des Vektors aufgeführt. Aus diesem viralen Genom wurde teilweise der *bet*-Leserahmen entfernt. Der Vektor hat eine Größe von 14.889 bp.



Abgebildet ist die Vektorkarte des viralen Impfvectors *pPFhV-T0<CTL>*.

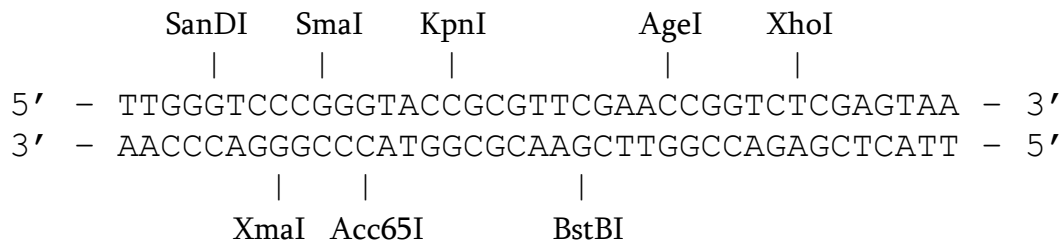
Dieser Klon hat den Vektor *pPFcV-T0* zur Basis. Zu sehen ist die Lage des Klonierungsvektors *pAT153*. Weiterhin sind die einzelnen Gene *gag*, *pol*, *env*, *tas* und Δbet des viralen Genoms aufgeführt, welche sich zwischen den LTR-Sequenzen befinden. Die 5'LTR wurde teilweise durch ein CMV-EI-Promotorelement ersetzt. Ebenfalls ist die Lage des Internen Promotors eingezeichnet. In die MCS des Vektors *pPFcV-T0* wurde die Sequenz des 2F5-HIV-CTL-strings eingefügt. Als Schnittstellen wurden *XmaI* und *XhoI* der MCS verwendet. Die Lage im viralen Genom wurde in der Karte dargestellt. Der Vektor hat eine Größe von 15.278 bp.

pPFhV-T0<CTL>del**Vektorkarte der Impfvektor-Negativkontrolle PFhV-T0<CTL>del**

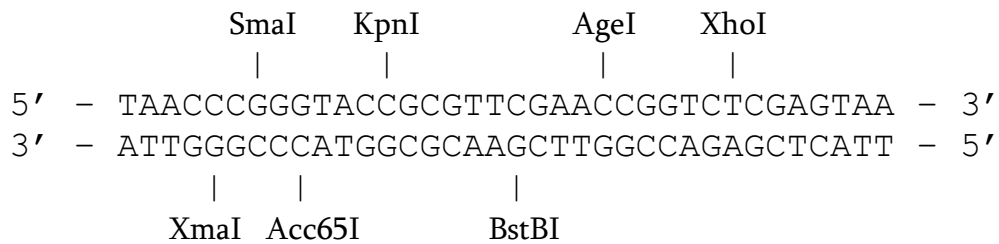
Diesem Klon wurde die komplette 3'LTR entfernt. Dadurch wurden wichtige, für die Replikation essentiellen, Sequenzen deletiert. Dieser Vektor zeigte keine Replikationskompetenz *in vitro*.

10.2 Verwendete MCS-Sequenzen, Oligonukleotide und Primer

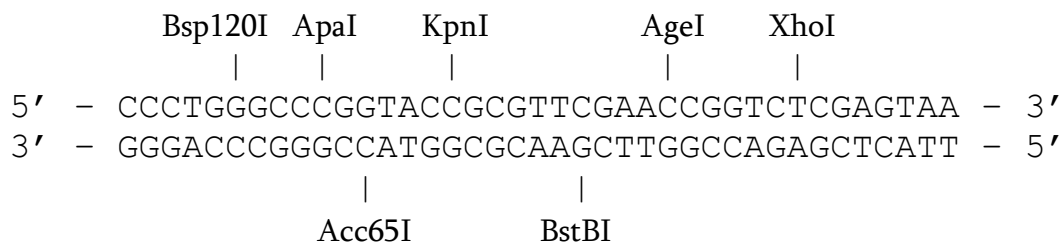
Sequenz der in dieser Arbeit verwendeten MCS-1 der Klone PFVbasic & 26 mit RE-Schnittstellen



Sequenz der in dieser Arbeit verwendeten MCS-2 der Klone PFcV 30 & 31 mit RE-Schnittstellen



Sequenz der in dieser Arbeit verwendeten MCS-2A der Klone PFcV 32-34 mit RE-Schnittstellen



Liste I: Oligonukleotide

Nr.	Bezeichnung	Oligonukleotid Sequenz 5' ▶ 3'
o1	Tas-naiv (+ Strang)	GTCCCCCTCTGGGTCAGGTGAACATTCAGTTTTATAACCCGGGTAC
o2	Tas-naiv (- Strang)	CCGGGTTATAAACTGAATGTTACCTGACCCAGAGGGGG
o3	Tas <i>m1</i> (+ Strang)	GTCCCGGTTATAGAGTTAGAACAGGACTGGAGTAACCCGGGTAC
o4	Tas <i>m1</i> (- Strang)	CCGGGTTACTCCAGTCCTGTTCTAACTCTATAACCGG
o5	Bet-2A (+ Strang)	CCGGTAACCAGCTGTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACG TCGAGTCCAACCCTGGGCCCGGTAC
o6	Bet-2A (- Strang)	CGGGCCAGGGTTGGACTCGACGTCTCCCGCCAACTTGAGAAGGTCAAA ATTCAACAGCTGGTTAC
o7	Tas-2A (+ Strang)	CCGGGCAGCTGTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTCGA GTCCAACCCTGGGCCCGGTAC
o8	Tas-2A (- Strang)	CGGGCCAGGGTTGGACTCGACGTCTCCCGCCAACTTGAGAAGGTCAAA ATTCAACAGCTGC

Liste II: Klonierungs-Primer

Nr.	Bezeichnung	Primer Sequenz 5' ▶ 3'
11	SanD-MCS1 For	AAGGGTCCCGGTACCGCGTTTCGAACCGGTCTCGAGTAAGAATTA TTATCAGATTCTAACTTGCTGTCAGGCTG
12	Sal-MCS1 Rev	AGCGTCGACGGTATCGCCAATTGT
13	FF-CMV For	ACGGCCGAGCTTCCCATTGCATAC
14	FF-CMV Rev	CGAGTAGTGAAGAGAGCTCCCGTTCACTAAACGAGCTC
15	PF-CMV For	GGGAGCTCTCTCACTACTCGCTGCGTCG
16	PF-CMV Rev	GAGGTGAAGGTGCCCTGGGATGAATCC
17	Kpn-Bet-2F5-PSCA For	CGGGTACCTCTGAGCTGGACAAGTGGGCCATGAAGGCTGTGCTGC TTGCC
18	Age-Bet-PSCA-stp Rev	GAGACCGGTTAGAGCTGGCCGGGTCCCCAGAGC
19	3'PPT For	AACCGGTCTCGAGTAAGCAGCTATGGAAGCTTATGGACC
20	Kpn-Bet-2F5-GFP For	CGGGTACCTCTGAGCTGGACAAGTGGGCCATGGTGAGCAAGCAGAT TCCTG
21	Age-GFP-stp Rev	GAGACCGGTTACACCCACTCGTGCAGGC
22	Xma-Bet-2F5-CTL For	GTCCCGGGTGTGAGCTGGACAAGTGGGCCCTTAGATCTCCCGCCGCC ACC
23	Xho-CTL-stp Rev	TACTCGAGTCAGTCCAATCCCAGCAAAGGG
24	Apa-Bet-2F5-CTL For	ATGGGCCCGAGCTGGACAAGTGGGCTCTTAGATCTCCCGCCGCCA CC
25	Bet-Beck For	CTACTTGAAGAGTCCAGCAACCTACC
26	ORF2 Rev	CTCGTTACTTCTCTCTGAGGTCC

Liste III: Sequenzierungs-Primer

Nr.	Bezeichnung	Sequenzierungs-Primer Sequenz 5' ▶ 3'	Position in pPFVbasic
s1	Bone-CMV For	TCATAATGGGGAAGGCCATCC	15173..15193
s2	PFV-mRNA For	CTGCGTTCGAGAGTGTACGAGAC	700..721
s3	PFV-seq2 For	AGCATAGCGGGAGGCATATA	1094..1113
s4	PFV-seq4 For	AAATCCTTTTGTGAAGAAG	1895..1914
s5	PFV-seq5 For	GTA CT CAGAATCAA AATCAA	2695..2714
s6	PFV-seq6 For	GATTATCCTCCTCGCCCTCA	3496..3515
s7	PFV-seq7 For	ATTGAGTGGTCTGAAGAAA	4297..4316
s8	PFV-seq8 For	TAAGAAAAGCCTCTTAAAC	5097..5116
s9	PFV-seq9 For	TCAGTACTCCTTATCACCCC	5897..5916
s10	PFV-seq10 For	TCAGGTATTAGGACCTGTAA	6697..6716
s11	PFV-seq11 For	AAGGTAAAATGCTCTGTTT	7497..7516
s12	PFV-seq12 For	GGAATGTTTGCTGTACAACA	8294..8313
s13	PFV-seq13 For	AGCTGAGCTCCTTCGACTGG	9094..9113
s14	PFV-seq14 For	TTCTACCAGTTGCTCAGAAG	9894..9913
s15	PFV-seq15 For	GAAGCTTATGGACCTCAGAG	10691..10710
s16	PFV-seq17 Rev	AATTTACAAATAAACCCGAC	1057..1076
s17	PFV-seq18 Rev	GGTCTGTAAGAACTACTATA	1494..1513
s18	PFV-seq19 Rev	TTTATTACATTTCCAAGCTG	2295..2314
s19	PFV-seq20 Rev	TACAAGTTATTGTTGCCCT	3096..3115
s20	PFV-seq21 Rev	CATCAGCTGTAAACAATGCT	3897..3916
s21	PFV-seq22 Rev	ACATAGAAAATTTTAATTCT	4497..4516
s22	PFV-seq23 Rev	CAATAAAGGTTGGCAATTTT	5497..5516
s23	PFV-seq24 Rev	TCAACACCTTAAGTACAGTA	6297..6316
s24	PFV-seq25 Rev	TTCTTTATATTTTACTAAAT	7107..7126
s25	PFV-seq26 Rev	CTTGATACAAAGAATAGACT	7894..7913
s26	PFV-seq27 Rev	ACATATGACATAATCTTGTC	8694..8713
s27	PFV-seq28 Rev	ACATTTGACTTCTCTTTTGG	9494..9513
s28	PFV-seq29 Rev	TTTCTTCATCAGTACCATGA	10291..10310
s29	PFV-seq30 Rev	CTCTGAGGTCCATAAGCTTC	10691..10710
s30	LTR-PFV Rev	AAGGGTCCATCTGAGTCACT	11060..11079
s31	PFV-seq Rev	AAGCTGTCTGCGTTAAGGAAAGAT	11383..11406
s32	PFV-seq16 Rev	TCCTAATGCAGGAGTCGCAT	11882..11901
s34	M13 For	GTAAAACGACGGCCAG	-
s35	M13 Rev	CAGGAAACAGCTATGAC	-

10.3 Peptidsequenzen und Peptidpools des HIV-CLT-Peptid-Sets

Liste IV: Peptidsequenzen des Peptid-Sets: HIV-CTL-Epitop-String

Name	Sequenz
HIV_1	GPELDKWALRSPAAT
HIV_2	KWALRSPAATMERYL
HIV_3	SPAATMERYLKDQQL
HIV_4	MERYLKDQQLLEITP
HIV_5	KDQQLLEITPIGLAP
HIV_6	LEITPIGLAPPPIVPG
HIV_7	IGLAPPPIPVGEIYKR
HIV_8	PIPVGEIYKRWIILG
HIV_9	EIYKRWIILGLNKIV
HIV_10	WIILGLNKIVRMYNL
HIV_11	LNKIVRMYNLTMKCR
HIV_12	RMYNLTMKCRIQRGP
HIV_13	TMKCRIQRGPGRAFV
HIV_14	IQRGPGRAFVTIGKA
HIV_15	GRAFVTIGKASFEFA
HIV_16	TIGKASFEFAACTPY
HIV_17	SFEFAACTPYDINQM
HIV_18	ACTPYDINQMLRPQV
HIV_19	DINQMLRPQVPLRPM
HIV_20	LRPQVPLRPMTYKAV
HIV_21	PLRPMTYKAVDLSHF
HIV_22	TYKAVDLSHFLKEKG
HIV_23	DLSHFLKEKGGLILK
HIV_24	LKEKGGLILKEPVHG
HIV_25	GLILKEPVHGVYHPD
HIV_26	EPVHGVYHPDIVIYQ
HIV_27	VYHPDIVIYQYMDDL
HIV_28	IVIYQYMDDLGSIPN
HIV_29	YMDDLGSIPNPLLGL
HIV_30	MDDLGSIPNPLLGLD

Die oben genannten Peptide wurden in Peptidpools vereinigt. Nachfolgend ist die Aufteilung der Peptide in den jeweiligen Pools aufgeführt.

Pool	CTL Peptides				
Pool 1	1	2	3	4	5
Pool 2	6	7	8	9	10
Pool 3	11	12	13	14	15
Pool 4	16	17	18	19	20
Pool 5	21	22	23	24	25
Pool 6	26	27	28	29	30
Pool 7	1	7	13	19	25
Pool 8	2	8	14	20	26
Pool 9	3	9	15	21	27
Pool 10	4	10	16	22	28
Pool 11	5	11	17	23	29
Pool 12	6	12	18	24	30

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die hier vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

.....

Rico Blochmann

Berlin, den 31. März 2014