

Aus dem Lehrstuhl
für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Prof. Dr. Dr. André Gessner
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Untersuchungen zur Infektionseffizienz der HIV-Vakzinekandidaten
EHV-C und NYVAC-C in über Monozyten generierten dendritischen
Zellen**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Julia Johanna Eva Dobmeier
aus Gleißenberg

2013

Aus dem Lehrstuhl
für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Prof. Dr. Dr. André Gessner
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Untersuchungen zur Infektionseffizienz der HIV-Vakzinekandidaten
EHV-C und NYVAC-C in über Monozyten generierten dendritischen
Zellen**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Julia Johanna Eva Dobmeier
aus Gleißenberg

2013

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Ralf Wagner
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Bernd Salzberger
Tag der mündlichen Prüfung:	11. Juni 2013

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Ausmaß und Folgen von HIV-Epidemie und AIDS.....	1
1.2	Die Bedeutung der Entwicklung eines Impfstoffs gegen HIV.....	2
1.3	Ein Impfstoff gegen HIV-eine große Herausforderung.....	3
1.3.1	Probleme bei der Impfstoffentwicklung.....	3
1.3.2	Unterschiedliche Vakzinierungskonzepte.....	4
1.3.3	Virale Vektoren.....	4
1.4	Equines Herpesvirus 1 (EHV-1).....	5
1.4.1	Allgemeines.....	5
1.4.2	Replikationszyklus und Genexpression.....	5
1.5	New York Vaccinia Virus (NYVAC).....	8
1.5.1	Allgemeines.....	8
1.5.2	Replikationszyklus und Genexpression.....	8
1.6	Dendritische Zellen.....	10
1.7	Zielsetzung.....	11
2	Material und Methoden.....	12
2.1	Vakzinekandidaten.....	12
2.1.1	Equines Herpesvirus-HIV-C.....	12
2.1.2	New York Vakzinia Virus-HIV-C.....	12
2.2	Kultivierung von HEK 293T-Zellen.....	13
2.3	Gewinnung von PBMCs (<i>peripher blood mononuclear cells</i>) aus Buffy Coat.....	13
2.4	Generieren von MDDCs (<i>monocytes derived dendritic cells</i>) aus CD14 ⁺ Monozyten.....	13
2.5	Nachweis der Expression früher und später Gene von EHV-C und NYVAC-C.....	14
2.5.1	Infektion von HEK 293T-Zellen und MDDCs.....	14
2.5.2	RNA-Arbeitstechniken.....	15
2.5.2.1	RNA-Isolation.....	15
2.5.2.2	Untersuchung isolierter RNA bezüglich DNA-Kontamination.....	16
2.5.2.3	Konzentrationsbestimmung isolierter RNA mittels Spektralphotometer.....	17
2.5.2.4	Reverse Transkription.....	17
2.5.2.5	Qualitative Analyse revers transkribierter RNA.....	18

2.5.3	Quantifizierung revers transkribierter RNA mittels real-time PCR.....	18
2.5.3.1	Prinzip des LightCyclers™ und der SYBR® Green Methode.....	18
2.5.3.2	Schmelzkurvenanalyse.....	19
2.5.3.3	Auswahl der geeigneten Primer für die real-time PCR.....	19
2.5.3.4	Vorbereiten der Proben und Wahl der geeigneten PCR-Bedingungen.....	21
2.5.3.5	Analyse mittels relativer Quantifizierung.....	22
2.6	Western-Blot-Analyse.....	23
2.7	Infektion von HEK 293T-Zellen und MDDCs mit Farbstoff markiertem EHV-C und NYVAC-C.....	25
2.7.1	Verwendung von CFDA-SE als Farbstoff.....	25
2.7.2	Generierung von Farbstoff markiertem EHV-C und NYVAC-C.....	26
2.7.3	Nachweis der Infektion mit CFDA-SE markiertem Virus in der FACS- Analyse.....	27
2.7.4	Nachweis der Bildung des Polyproteins GagPolNef mittels intrazellulärer FACS-Färbung.....	27
2.7.5	Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Infektion mittels CFDA-SE markierten Viren.....	28
3	Ergebnisse.....	29
3.1	Ausbeute von immaturren MDDCs nach deren Generierung aus CD14 ⁺ Monozyten.....	29
3.2	Aussäen und Wachstum von HEK 293T-Zellen.....	29
3.3	Nachweis der Expression früher und später Gene von EHV-C und NYVAC-C in MDDCs und HEK 293T-Zellen mittels LightCycler™-Analyse.....	30
3.3.1	RNA-Isolation aus virusinfizierten MDDCs und HEK 293T-Zellen 4 hpi und 8 hpi mittels RNeasy®-MiniKit mit DNase-Verdau und reverse Transkription in cDNA.....	30
3.3.2	RNA-Isolation aus HEK 293T-Zellen mittels RNeasy®-MiniKit mit DNase- Verdau unter Verwendung von RNase-Inhibitor und EDTA sowie reverse Transkription in cDNA.....	33
3.3.3	RNA-Isolation mittels TRI-REAGENT™ aus virusinfizierten MDDCs und HEK 293T-Zellen 4 hpi und 8 hpi mit DNase-Verdau.....	35
3.3.4	Photometrische Konzentrationsbestimmung isolierter RNA zur Bestimmung der Ausgangsmenge für die reverse Transkription.....	37

3.3.5 Reverse Transkription der mittels TRI-REAGENT™ isolierten RNA in cDNA.....	37
3.3.6 Mittels LightCycler™ gewonnene Daten zur Bestimmung der relativen Quantifizierung früher und später Gene von EHV-C und NYVAC-C.....	39
3.3.6.1 Bestimmung des Crossing Points der Gene gag, F17R und EICP0 während ihrer Amplifikation mittels LightCycler™ zur relativen Quantifizierung.....	39
3.3.6.2 Ermitteln der PCR-Effizienzen aus den Crossing Points und den cDNA-Konzentrationen zur relativen Quantifizierung.....	43
3.3.6.3 Exemplarische Darstellung der Schmelzkurven von amplifizierten Genprodukten infizierter MDDCs und HEK 293T-Zellen anhand des Gens gag und daraus ermittelte Schmelzpunkte.....	45
3.3.7 Nachweis und Vergleich der Expression früher und später Gene mittels relativer Quantifizierung.....	46
3.3.7.1 Expression der frühen Gene IE und EICP0 und des späten Gens gpD von EHV-C.....	47
3.3.7.2 Expression des frühen Gens E3L und des späten Gens F17R von NYVAC-C.....	49
3.3.7.3 Expression des Gens gag von HIV kodiert von EHV-C und NYVAC-C.....	51
3.4 Nachweis der Bildung des GagPolNef-Polyproteins von HIV in EHV-C und NYVAC-C infizierten MDDCs mittels Western-Blot-Analyse.....	52
3.5 Nachweis der Infektion von HEK 293T-Zellen und MDDCs mittels Farbstoff markiertem EHV-C und NYVAC-C.....	54
3.5.1 Nachweis der Infektion mittels fluoreszenzmikroskopischer Analysen.....	54
3.5.2 Nachweis der Infektion mittels FACS-Analyse.....	55
4 Diskussion.....	58
4.1 Vergleich der RNA-Isolationsverfahren mit RNeasy®-MiniKit und mit TRI-REAGENT™ in Kombination mit RNeasy®-MiniKit.....	58
4.2 Vergleich unterschiedlicher DNase-Verdau-Methoden.....	59
4.3 Geeignete RNA-Isolationszeitpunkte für die frühen beziehungsweise späten Gene von EHV-C und NYVAC-C.....	60
4.4 Vergleich der Expression der frühen und späten Gene von EHV-C mit der Expression der frühen und späten Gene von NYVAC-C in HEK 293T-Zellen.....	61

4.5	Expression der frühen Gene IE, EICP0 und des späten Gens gpD von EHV-C in MDDCs.....	62
4.6	Expression des frühen Gens E3L, des späten Gens F17R von NYVAC-C sowie des Gens gag von HIV kodiert von NYVAC-C in MDDCs.....	62
4.7	Nachweis der Infektion von HEK 293T-Zellen und MDDCs durch CFDA-SE markiertes EHV-C und durch CFDA-SE markiertes NYVAC-C.....	65
5	Zusammenfassung.....	67
6	Ausblick.....	69
7	Anhang.....	70
8	Abkürzungsverzeichnis.....	75
9	Literaturverzeichnis.....	81
10	Danksagung.....	86
11	Eidesstattliche Erklärung.....	87

1 Einleitung

*„No child should be born with HIV. No child should be an orphan because of HIV.
No child should die due to lack of access to treatment”*
(Ebube Sylvia Taylor, 11 Jahre alt, auf dem United Nations Millennium Development Goals Summit 2010)¹

1.1 Ausmaß und Folgen von HIV-Epidemie und AIDS

Das einleitende Zitat aus dem Jahr 2010 zeigt die verzweifelten Wünsche der Betroffenen angesichts von HIV und steht trotz vieler Anstrengungen im Gegensatz zu den noch geringen Möglichkeiten der Wissenschaft, geeignete Therapie- und Präventionsmaßnahmen gegen das humane Immundefizienz-Virus (HIV) zu entwickeln. Bis heute gibt es keinen protektiven Impfstoff oder eine adäquate preiswerte Therapie. Deshalb sollten uns Ebube Sylvia Taylors Worte herausfordern, mit aller Kraft die Entwicklung geeigneter Strategien zur Bekämpfung von HIV voranzutreiben.

Ende 2009 lebten geschätzt 33,3 Millionen Menschen weltweit mit dem HI-Virus. Mit zwei Millionen Todesfällen pro Jahr stellt HIV die viertgrößte Todesursache dar.² Zwar sinkt seit 1999 aufgrund zunehmender Präventionsmaßnahmen die Anzahl der jährlichen Neuinfektionen kontinuierlich - 2,6 Millionen Neuinfektionen 2009 gegenüber 3,1 Millionen Neuinfektionen 1999 -, doch ist die Anzahl der HIV-positiven Personen von 1999 bis 2009 um etwa 27 % angestiegen.¹

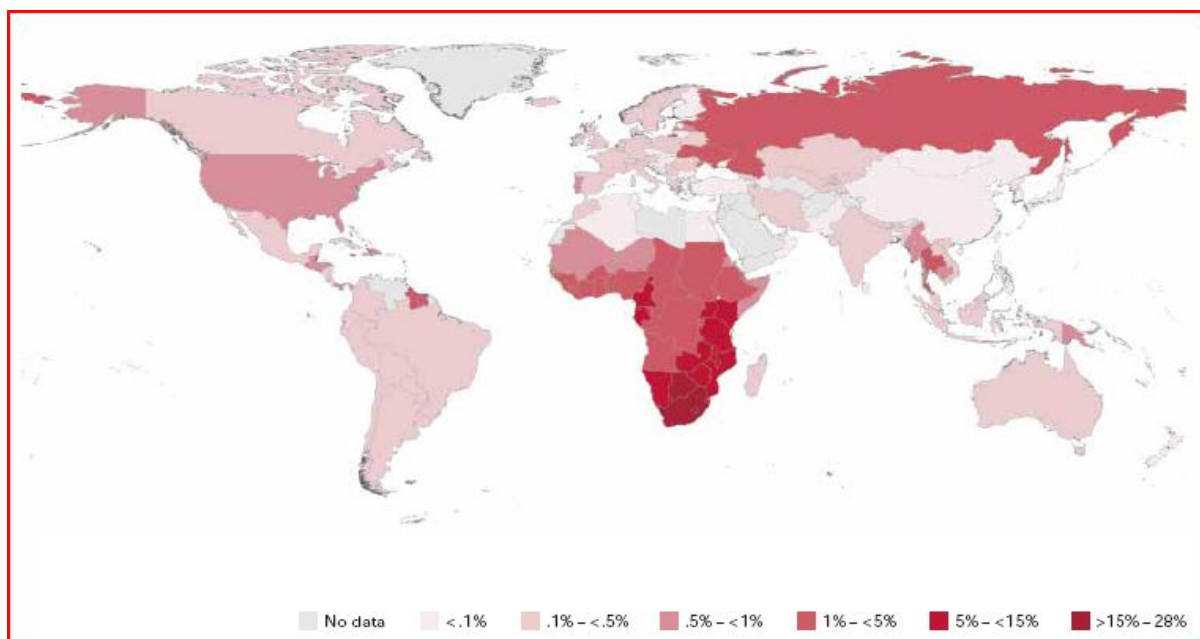


Abbildung 1.1
HIV-Prävalenz weltweit, UNAIDS 2009³

Besonders stark betroffen sind die afrikanischen Länder südlich der Sahara. In diesen Ländern lebten im Jahre 2009 22,5 Millionen HIV-infizierte Menschen. Das sind zwei Drittel aller HIV-positiv getesteten Personen weltweit. Mit 1,3 Millionen Todesfällen 2009 beziehungsweise mit 72 % aller HIV-bedingten Todesfälle führen die afrikanischen Länder die Spitze der Mortalitätsstatistik an.¹ Während die AIDS (*acquired immune deficiency syndrome*)-bedingten Todesfälle in Nordamerika und in West- und Zentraleuropa nach Einführung der antiretroviralen Therapie 1996 schnell abnahmen und sich mit etwa 35.000 Todesfällen pro Jahr auf einem stabilem Niveau halten, gestaltet sich die Situation in den afrikanischen Ländern südlich der Sahara problematischer. Erst im Jahre 2005 konnte dort nach Ausweitung der antiretroviralen Therapie eine Abnahme der AIDS-bedingten Todesfälle erreicht werden. Dazu muss erwähnt werden, dass 2007 lediglich 2 % und auch nach deutlichem Zuwachs 2009 lediglich 37 % der Menschen Zugang zur antiretroviralen Therapie hatten.¹

In Osteuropa und Zentralasien dagegen nimmt die Anzahl der jährlichen HIV-Neuinfektionen seit dem Jahr 2000 mit einer Verdreifachung bis 2009 zu, was vor allem durch die Zunahme des i.v. Drogenabusus und durch Prostitution bedingt ist. Dabei sind 90 % der gemeldeten HIV-Neuinfektionen aus Russland und der Ukraine. Auch die AIDS-bedingten Todesfälle nehmen in diesen Regionen zu.¹

1.2 Die Bedeutung der Entwicklung eines Impfstoffes gegen HIV

Eine weltweit fundierte Präventionsarbeit gegen die HIV-Infektion und wirksame Therapiemöglichkeiten wie die hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART) haben in vielen Ländern zu abnehmenden HIV-Inzidenzen und zu einer Reduzierung AIDS-bedingter Todesfällen geführt.¹

In den westlichen Industrienationen sieht man HIV wegen dieser Maßnahmen mittlerweile als chronische Erkrankung an.² HAART kann das HI-Virus im Plasma unter die Nachweisgrenze senken. Außerdem lässt sich unter der antiretroviralen Therapie ein prognostisch wichtiger Anstieg der CD4⁺ T-Zellen beobachten. Allerdings ist diese effektive Therapie mit der Gefahr zahlreicher Nebenwirkungen und Resistenzbildungen verbunden.⁴ 95 % der neuinfizierten Menschen leben zudem in Ländern mit niedrigem und mittlerem Einkommen.² Das bedeutet, dort ist die Therapie aufgrund hoher Kosten und fehlender Infrastruktur den Menschen nur eingeschränkt zugänglich.⁵

Präventionsmaßnahmen verlaufen inkonsequent, weil logistische und ökonomische Hindernisse sowie kulturelle Widerstände Verhaltensänderungen bei den Menschen erschweren und folglich keinen effizienten Schutz vor einer HIV-Infektion ermöglichen.^{2,6}

Die Infektion mit dem HI-Virus bleibt eine der größten Epidemien weltweit und *die* Herausforderung auch im 21. Jahrhundert. Nur die Entwicklung eines Impfstoffes vereint effektive Protektion gegen HIV oder AIDS und ökonomische Gesichtspunkte. Die Herstellung einer geeigneten Vakzine stellt rein wissenschaftlich eine schwierige Aufgabe dar, aber ist letztlich als soziale und humanitäre Leistung unserer Generation zu verstehen.

1.3 Ein Impfstoff gegen HIV- eine große Herausforderung

1.3.1 Probleme bei der Impfstoffentwicklung

Die Ursachen für die Probleme, innerhalb der Jahrzehnte langen Forschung einen effektiven Impfstoff gegen HIV zu entwickeln, sind vielfältig.⁷⁻⁸ Die wichtigsten werden nachfolgend kurz dargestellt.

Bei der Entwicklung eines wirksamen Impfstoffes steht die Wissenschaft einer großen genetischen Vielfalt des HI-Virus gegenüber. Die hohe Mutationsrate des HI-Virus mit ausgeprägter Fehlerrate der reversen Transkriptase und fehlender Korrekturfunktion der RNA-Polymerase führt zu einer ausgeprägten genetischen Variabilität in jedem einzelnen infizierten Individuum.⁸⁻⁹ Von den beiden HIV-Typen HIV-1 und HIV-2 kann HIV-1 in die Hauptgruppen M („major“), N („non M, non O“), O („outlier“) und P unterteilt werden. Die Hauptgruppe M wiederum schlüsselt sich in 9 Subtypen oder Klassen („clades“) auf, denen weitere Untergruppen zugeordnet sind. Infiziert sich eine Person mit mehreren Subtypen können rekombinante Subtypen, sogenannte Mosaikformen entstehen.^{2, 8} Zwischen den Subtypen zeigen sich deutliche Unterschiede in den Aminosäuresequenzen des viralen Env-Glycoproteins von 25-35 % beziehungsweise innerhalb dieser Subtypen von 20 %.^{2,9}

Problematisch ist auch, dass HIV besonders CD4⁺ T-Helferzellen infiziert, die eine zentrale Schlüsselstelle in der Immunantwort darstellen. Durch Aktivierung zytotoxischer T-Zellen (CTL) tragen die T-Helferzellen zu ihrer eigenen Zerstörung bei.^{8, 10}

Im Gegensatz zu anderen Viren, bei denen nach akuter Infektion eine bleibende Immunantwort gebildet wird oder die im Rahmen latenter Infektionen vom Immunsystem adäquat kontrolliert werden, führt eine HIV-Infektion mit Ausnahme von einzelnen Langzeitüberlebenden zu keiner schützenden oder effektiv kontrollierenden

Immunantwort.^{8, 10} Wegen der genannten Schwierigkeiten gestaltet sich die Entwicklung eines Impfstoffs zur Verhinderung einer direkten Infektion mit HIV äußerst diffizil.⁷ In den Vordergrund rückt daher häufig die Kontrolle der Ausbreitung einer HIV-Infektion und die Verhinderung des Ausbruchs von AIDS.⁷

1.3.2 Unterschiedliche Vakzinierungskonzepte

Bisher wurden mehrere Impfstoffe unterschiedlicher immunologischer Strategien gegen HIV entwickelt und einige davon bereits in klinischen Studien untersucht.⁸

Die komplexen immunologischen Gegebenheiten erfordern es, bei der Impfstoffentwicklung mehrere Ansätze in einem Grundkonzept zu vereinen.

Dafür verwendet man unterschiedliche Impfstoffarten, die diverse Immunreaktionen, humoral wie zellulär, hervorrufen. Gleichzeitig müssen möglichst viele HIV-Subtypen erfasst werden, um der hohen Virusvariabilität gerecht zu werden. Hüllproteine wie Env, Strukturproteine wie Gag und Pol sowie regulatorische Gene wie tat, rev und nef bilden Ziele der Immunantwort.⁸

Zwar riefen Lebendimpfstoffe als SIV delta-nef-Mutante beim Affen eine protektive Immunantwort hervor, wurden jedoch wegen Sicherheitsbedenken beim Menschen nicht getestet. Totimpfstoffe als chemisch inaktivierte HI-Viren erzeugten nur eine geringe Immunogenität und allenfalls eine geringe humorale Immunantwort. Virus-like particles (VLPs) oder Pseudovirionen sind nicht infektiöse und nicht replikationsfähige Partikel. Studien zeigten, dass diese meist nur eine mäßige Immunantwort ausbilden.² Rekombinant synthetisierte virale Proteine, sogenannte Proteinvakzine, wie gp120 oder p24 sowie Peptidvakzine sind chemisch hergestellt und weisen definierte immunogene Epitope auf. Auch sie zeigen teils zu geringe Immunantworten.² DNA-Impfstoffe führen mittels sogenannter prime-boost-Strategie zur Induktion hoher Antikörpertiter und einer ausgeprägten Immunantwort zytotoxischer T-Zellen. Dabei erfolgt die initiale Immunisierung mit dem DNA-Impfstoff. Sekundär setzt man andere Impfstoffverfahren wie Proteinvakzine oder virale Vektoren als sogenannte Auffrischimpfung ein.^{2, 8}

1.3.3 Virale Vektoren

Bei viralen Vektoren handelt es sich um Impfstoffe, die rekombinante HIV-Gene wie gag, env, pol, nef enthalten. Nach Expression der Antigene, Prozessierung und Präsentation über MHC Klasse I-Moleküle soll mit ihnen eine CD8⁺ T-Zell-Antwort erzielt werden. Zusätzlich

lässt sich nach Phagozytose apoptotischer transduzierter Zellen durch antigenpräsentierende Zellen über eine sogenannte „Cross-Präsentation“ eine CD8⁺ T-Zell-Antwort induzieren. Die Präsentation der extrazellulären Antigene erfolgt nicht über MHC Klasse II, sondern über MHC Klasse I-Moleküle. Einen wesentlichen limitierenden Faktor für die Immunogenität rekombinanter Vektorimpfstoffe bildet die bereits zuvor bestehende Immunität gegen den Vektor selbst. Gut erforschte virale Vektoren sind Adenoviren oder Poxviridae wie MVA und NYVAC.^{2, 8} Als Basis für ein neues Vektorsystem wurde das Equine Herpes Virus Typ 1 (EHV-1) entwickelt. In der klinischen Phase I-Studie EuroVacc 02 zeigte das prime boost-Verfahren DNA-C in Kombination mit NYVAC-C gute Ergebnisse bezüglich einer Immunogenität mit starken T-Zell-Antworten.¹¹

1.4 Equines Herpesvirus 1 (EHV-1)

1.4.1 Allgemeines

Das Equine Herpes Virus EHV-1 gehört wie die Herpes Simplex Viren 1 und 2, VZV und BHV-1 zu den Alphaherpesvirinae, einer Unterfamilie der Herpesviridae. EHV-1 ist weltweit verbreitet und verursacht bei Pferden neben Infektionen der oberen Atemwege vor allem Aborte und neurologische Erkrankungen.¹²⁻¹³ Obwohl EHV-1 *in vivo* lediglich bei Pferden zu Infektionen führt, ist es gelungen, *in vitro* zahlreiche Zelllinien unterschiedlicher Species, auch der humanen, zu transduzieren.¹⁴

1.4.2 Replikationszyklus und Genexpression

Der Replikationszyklus von EHV-1 gleicht dem der Alphaherpesvirinae und ist in der Abbildung 1.2 nach Mettenleiter schematisch dargestellt. Das Eindringen von EHV-1 in die Zelle kann je nach Zelltyp auf zwei unterschiedliche Weisen erfolgen. Nach Kontakt der Glykoproteine gB und gC in der Virushülle von EHV-1 mit dem zellulären Rezeptor Heparansulfat, einem Glykosaminoglykan, und nachfolgender Bindung von Glykoprotein gD an einen bisher unbekanntem Rezeptor kommt es zur Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran. Die zweite Möglichkeit ist die Aufnahme des Virus in die Zelle mittels Endozytose.¹⁵⁻¹⁷ Beide Mechanismen führen zu einer erfolgreichen Zellinfektion.¹⁶ Das Nukleokapsid wird nach Aufnahme in das Zytoplasma über die Mikrotubuli zum Zellkern befördert. Vermutlich spielt dabei die Wechselwirkung von Proteinen des Virusteguments mit

den Mikrotubuli eine wichtige Bedeutung.¹⁷⁻¹⁸ Über die Kernporen wird das Virusgenom aus dem sich öffnenden Viruskapsid in den Nukleus eingeschleust.¹⁷ Hier findet in einer zeitlich festgelegten Abfolge die kaskadenartige Expression der immediate early (IE), early (E) und late (L) Gene statt.^{13, 19} EHV-1 besitzt lediglich ein immediate early Gen, das für vier Polypeptide codiert.²⁰ Das größte dieser Genprodukte ist ein regulatorisches Phosphoprotein, das sowohl seine eigene Expression reguliert als auch die Transkription der nachfolgenden frühen Gene intiiert.^{13, 19} Die Transkription des immediate early Gens geschieht mittels wirtseigener RNA-Polymerase II unter Beteiligung von transkriptionsaktivierenden Proteinen des Virusteguments.^{17, 19} Die Expression der frühen Gene findet etwa zwei bis drei Stunden nach Infektion, vor und unabhängig von der Replikation der viralen DNA statt.¹⁹ Die Aufgabe dieser frühen Genprodukte besteht in der Initiierung der DNA-Replikation, die etwa vier Stunden nach Infektion beginnt¹³, und in der nachfolgenden Aktivierung der Transkription später Gene. Vier der frühen Gene, die regulatorische Funktionen besitzen, sind EICP22, EICP27, EICP0 und TR2.¹² Da die Expression der späten Gene erst nach Beginn der DNA-Replikation eingeleitet wird, führt ein Block im Replikationszyklus zu einer verminderten Bildung der späten Genprodukte.¹⁹ Die Synthese neuer DNA verläuft dabei mittels viruskodierter DNA-Polymerase. Die späten Gene kodieren hauptsächlich für Strukturproteine des Virus wie die Kapsidproteine, die etwa sechs Stunden nach Infektion gebildet werden.¹³ In das Kapsid wird das replizierte Virusgenom verpackt. Während des Austritts des Nukleokapsids aus dem Kern erhält dieses in einem Knospungsprozess eine Hülle von der inneren Kernmembran. Man bezeichnet das auch als primäre Umhüllung. Vermittelt wird der Prozess durch Virusproteine.^{17, 21} Nach dem Verschmelzen der primären Hülle mit der äußeren Kernmembran wird das Viruskapsid hüllenlos in das Zytoplasma freigesetzt. Hier lagern sich die Tegumentproteine an das Viruskapsid an. Danach erfolgt die sekundäre Umhüllung durch Knospung in Vesikel des Trans-Golgi-Apparates. Die viruseigenen Glykoproteine der Vesikelmembran nehmen Kontakt mit den Tegumentproteinen auf und die umhüllten Viruspartikel werden zur Plasmamembran transportiert. Hier erfolgt nach Verschmelzung der Vesikelmembran mit der Plasmamembran die Freisetzung der Viruspartikel, die einen weiteren Infektionszyklus einleiten können.^{17, 21}

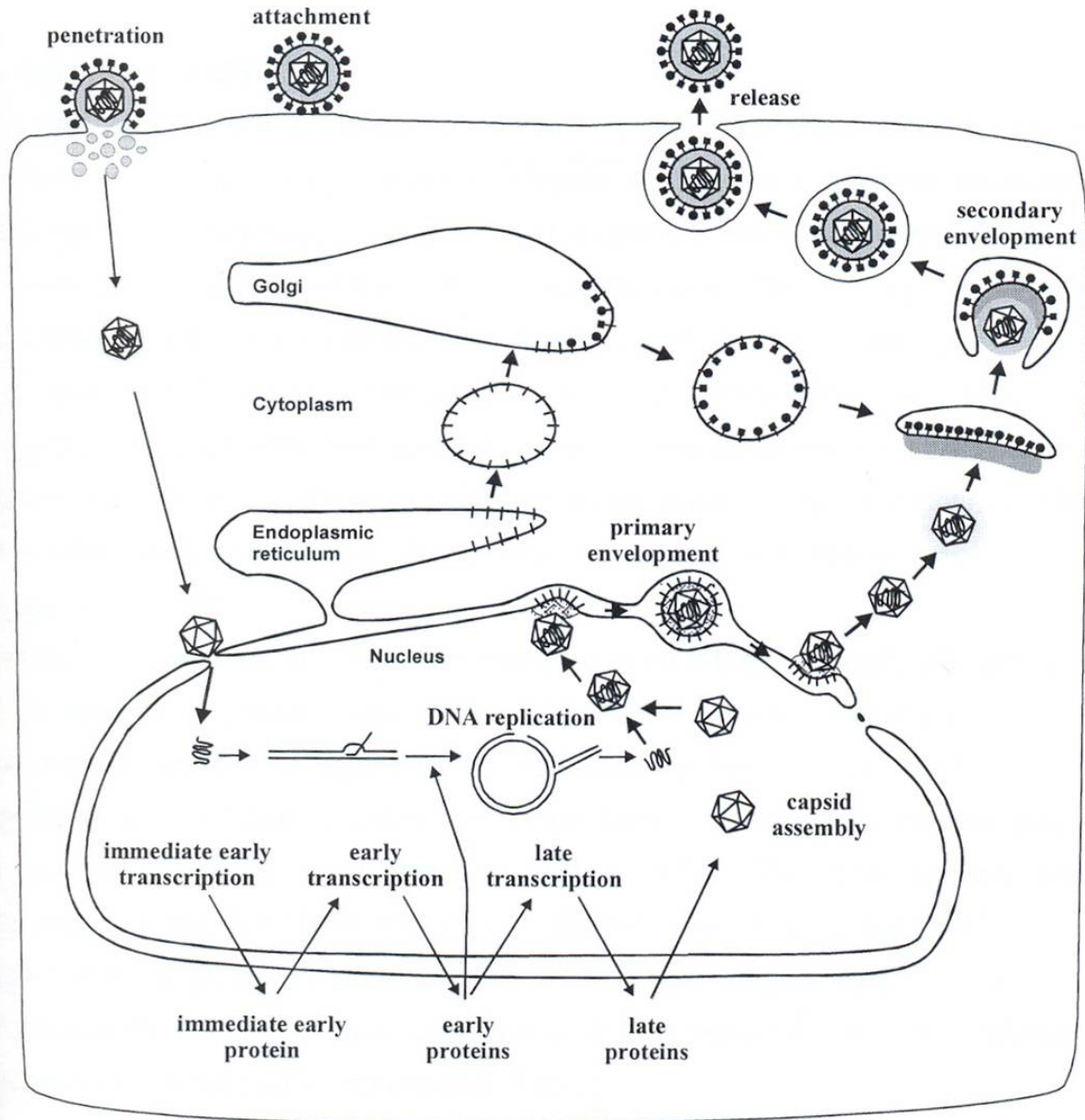


Abbildung 1.2
 Replikationszyklus von Alphaherpesvirinae, Mettenleiter, T.C. 2002²¹

1.5 New York Vaccinia Virus (NYVAC)

1.5.1 Allgemeines

Bereits Ende des 18. Jahrhunderts entdeckte Edward Jenner erstmals das Vaccinia Virus als Impfstoff gegen die Pockenkrankheit. Durch eine weltweite Impfkampagne konnte die Pockenkrankheit ab 1958 unter Einsatz des Impfstoffes Vaccinia Virus als bisher einzige Infektionskrankheit ausgerottet werden. 1980 erklärte die WHO die Pocken als eradiziert.²²⁻²⁴

Heute gewinnt das Vaccinia Virus an Bedeutung sowohl in der Entwicklung rekombinanter Vektorimpfstoffe gegen Infektionskrankheiten als auch in der Krebsforschung.²⁵

Die Familie der Poxviridae lässt sich in die Unterfamilie der Entomopoxvirinae und der Choropoxvirinae einteilen. Letztere untergliedert sich in sechs verschiedene Gattungen. Der Gattung Orthopoxvirus gehören unter anderem das ausgerottete Variolavirus und das Vaccinia Virus an.²⁴

NYVAC wurde aus dem Stamm Kopenhagen des Vaccinia Virus generiert und ist durch Entfernung von 18 sogenannten Open Reading Frames, die für Aminosäuresequenzen kodieren, in seiner Virulenz stark abgeschwächt.²⁶

1.5.2 Replikationszyklus und Genexpression

Nach Adsorption an die Zellmembran kann das Virus mittels zweier verschiedener Mechanismen in die Zelle aufgenommen werden. Entweder verschmilzt die Virushülle direkt mit der Plasmamembran oder das Virus gelangt über Endozytose und darauffolgender Fusion der Virushülle mit der Endosomenmembran in die Zelle.²⁴ Das Viruscore wird dabei in das Zytoplasma freigesetzt und über die Mikrotubuli in perinukleäre Regionen transportiert.²⁷

Dort finden die Genexpression und Virusreplikation des Vaccinia Virus in einem kaskadenartigen Ablauf im Zytoplasma der Zellen statt. Die Transkription der frühen Gene, die etwa die Hälfte aller transkribierten Gene ausmachen, ereignet sich wenige Minuten nach Infektion der Zelle.²⁸ Im Viruscore werden die für die Transkription nötige viruseigene RNA-Polymerase sowie der Transkriptionsfaktor VETF (*Vacciniavirus early transcription factor*) mit in die Zelle geführt.²⁴ Die entstehenden frühen Proteine sind an der folgenden DNA-Replikation, der Nukleotidbildung und an der Transkription intermediärer Gene beteiligt.²⁸

Das in dieser Arbeit untersuchte frühe Gen E3L kodiert für Proteine, die an dsRNA binden und dadurch die Proteinkinase PKR inhibieren. Die Proteinkinase PKR induziert Apoptose in

HeLa-Zellen.²⁹ Erst nach der Transkription der frühen Gene wird das Virusgenom aus dem Viruscore in das Zytoplasma der Zelle freigegeben. Hier beginnt etwa zwei Stunden nach Infektion die DNA-Replikation.³⁰ Die Zellregion im Zytoplasma, in der die DNA-Replikation stattfindet, wird von Membranen des Endoplasmatischen Retikulums umhüllt. Es entstehen sogenannte „Minikerne“.²⁴ Studien zeigten, dass dieser Umhüllungsprozess für eine effiziente DNA-Replikation notwendig ist.³⁰ In jeder infizierten Zelle entstehen etwa 10.000 neue DNA-Kopien.²⁴ Die DNA-Replikation ist die Voraussetzung für die Transkription intermediärer Gene. So entwickeln sich Genprodukte, die als regulatorische Proteine für die Transkription späterer Gene nötig sind.^{24, 27} Die späteren Gene kodieren einerseits für Strukturproteine, die für die Bildung neuer Virionen nötig sind und andererseits für Enzyme, die in das Virion verpackt nach Infektion einer neuen Zelle die Transkription der frühen Gene induzieren.²⁷ Der Transkriptionsfaktor VLTF-X, der bei der Transkription späterer Gene beteiligt ist, konnte als Protein der Wirtszelle identifiziert werden.²⁸ Für die Untersuchung der Expression späterer Gene von NYVAC-C wurde F17R gewählt. Das Gen wird als DNA-bindendes Viruscoreprotein exprimiert und ist für die proteolytische Prozessierung viraler Strukturproteine verantwortlich.³¹

Bei der Bildung der Virionen entstehen zunächst sogenannte *intracellular mature virions* (IMVs). Dabei umgibt eine Membran, die Lipide und Proteine enthält, die Viruscorekomponenten und verpackt die dsDNS darin. Die Mehrzahl der IMVs wird im Rahmen der Zellyse freigesetzt. Die verbleibenden IMVs gelangen entlang von Mikrotubuli zur Zellperipherie. Dort werden sie von einer doppelten Membran umschlossen, die aus dem trans-Golgi-Apparat oder von Endosomen stammt, und als *intracellular enveloped virions* (IEVs) bezeichnet. Die IEVs erreichen entlang der Mikrotubuli und anschließend über Actinausläufer die Plasmamembran. Nach Fusion der äußeren IEV-Membran mit der Zellmembran wird das Virus entweder als *extracellular enveloped virus* (EEV) freigesetzt oder bleibt als *cell-associated enveloped virus* (CEV) an der Zelloberfläche zurück.^{24, 27} CEVs können die Bildung von Actinausläufern von der Zelloberfläche aktivieren und darüber in nicht infizierte Zellen gelangen.²⁷

Durch den Attenuierungsprozess ist NYVAC in seiner Fähigkeit, in menschlichen Zellen zu replizieren, stark eingeschränkt. Trotzdem haben Studien gezeigt, dass es sein Potential nicht verloren hat, effektive Immunantworten gegen rekombinante Antigene hervorzurufen.²⁶

1.6 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen sind antigenpräsentierende Zellen und nehmen als Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem eine Schlüsselposition in der Induktion von Immunantworten ein.³²

Paul Langerhans entdeckte sie 1868 in menschlicher Haut, beschrieb sie jedoch als kutane Nervenzellen. Erst vor etwa 40 Jahren erforschten Steinman und Cohn sie erneut und bezeichneten sie aufgrund ihrer charakteristischen Gestalt mit vielen feinen Zellfortsätzen als dendritische Zellen.³³⁻³⁴

Dendritische Zellen stammen von hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark ab. Aus diesen Stammzellen entwickeln sich sowohl myeloide als auch lymphoide CD34⁺ Vorläuferzellen, deren weitere Differenzierung je nach Zytokineinfluß festgelegt ist.³³ Myeloide Vorläuferzellen differenzieren zu Monozyten, die unter GM-CSF und IL-4 zu immaturren dendritischen Zellen und unter M-CSF zu Makrophagen ausdifferenzieren. Myeloide Vorläuferzellen können unter Einwirkung von GM-CSF, IL-4 und TGF β zu Langerhans-Zellen differenzieren, lymphoide Vorläuferzellen zu T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und plasmazytoiden dendritischen Zellen.³² Myeloide und plasmazytoide dendritische Zellen machen nur 0,5-2 % aller peripheren mononuklären Blutzellen aus.³⁵ Zu Studienzwecken lassen sich *in vitro* aus Monozyten unter Zugabe von GM-CSF und IL-4 eine größere Anzahl immaturer dendritischer Zellen generieren. Sie werden als *Monocyte Derived Dendritic Cells* bezeichnet (MDDCs).³⁵

Immature dendritische Zellen halten sich im Gewebe auf. Sie haben die besondere Fähigkeit, verschiedene Antigene wie apoptotisches und nekrotisches Zellmaterial, Bakterien oder Viren über verschiedene Endozytotechniken wie Pinozytose, rezeptorvermittelte Endozytose oder Phagozytose aufzunehmen. Nach der Antigenaufnahme reifen sie in einem kontinuierlichen Prozess zu maturaen dendritischen Zellen. Dabei induzieren und regulieren Pathogene wie LPS, Bakterien-DNA und das spezifische Zytokinprofil in der Zellumgebung ihre Maturierung. Am Ende verlieren maturaerte dendritische Zellen ihre Fähigkeit zur Antigenaufnahme und wandern aus dem peripheren Gewebe in die lymphatischen Organe. Dort werden spezifische Oberflächenmarker wie HLA-DR und costimulatorische Moleküle, die bei der T-Zellinteraktion agieren (wie CD80, CD83, CD86, CD40, CCR-7), hochreguliert. Damit zeichnen sie sich durch das einzigartige Potential der Antigenpräsentation gegenüber T-Zellen aus.^{32, 34}

Eine zentrale Rolle für die Generierung einer adäquaten zellulären Immunantwort gegen HIV spielt die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen durch dendritische Zellen. Neben der MHC-Klasse II vermittelten Präsentation von internalisierten Virusbestandteilen an CD4⁺ T-Helfer-Zellen gelingt es ihnen mittels „Cross-Präsentation“ auch CD8⁺ T-Zellantworten zu induzieren.³⁶

1.7. Zielsetzung

Das equine Herpesvirus (EHV) ist im Gegensatz zu dem New York Vakzinia Virus (NYVAC) in der Lage über Monozyten generierte dendritische Zellen (MDDCs) effizient zu maturieren.³⁷ Diese Maturierung ist neben der Antigenexpression für die nachgelagerte T-Zellantwort unabdingbar.

Verschiedene Gründe wie z. B. unzureichende Infektion der Zielzelle durch das Virus, Block in der viralen Expression, Expression von antiinflammatorischen Genen und zuletzt auch die Expression der HIV-Antigene können eine unzureichende Maturierung der MDDCs bewirken.³⁸⁻⁴⁰

Ziel dieser Arbeit war es, die Infektion von MDDCs mittels EHV-C und NYVAC-C (HIV Antigen-exprimierende virale Vektoren) hinsichtlich ihrer Infektion und Antigenexpression in MDDCs zu untersuchen. Anhand von FACS Analysen der infizierten Zellen, der Expression von frühen und späten Genen der viralen Vektoren und der Antigenexpressionsmessung (Gag) in MDDCs sollten Rückschlüsse auf die Maturierung der MDDCs gewonnen werden.

Weiter sollen diese Erkenntnisse bei der Generierung und Verwendung neuer viraler Vektoren für die zukünftige Impfstoffentwicklung berücksichtigt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Vakzinekandidaten

2.1.1 Equines Herpesvirus-HIV-C

Den viralen Vektor EHV-C für diese Arbeit entwickelte und stellte freundlicherweise Helga Hofmann-Sieber et. al. zur Verfügung. EHV-C wurde mit Hilfe der BAC (Bacterial Artificial Chromosome)-Technologie und eines zweistufigen homologen Rekombinationsprozesses (RED-vermittelt) hergestellt.

Das sogenannte EHV-BAC (pRach) entsteht, wenn man ein mini F-Plasmid (miniaturisierte Form des prokaryotischen Fertilitätsplasmids) über homologe Rekombination anstelle des nicht essentiellen Glykoproteins 2 (gp2) in das Genom von EHV-1 einbringt. An den Genlocus des gfp Gens des mini F-Plasmids wird zunächst über homologe Rekombination das Transferkonstrukt eingefügt, das unter anderem das Zielgen sowie eine Kanamycinresistenzkassette als prokaryotischen Selektionsmarker trägt. Werden positive Klone selektiert, kann die Kanamycinresistenzkassette wieder entfernt werden. Durch Transfektion des EHV-BAC in eukaryotische Zellen kann Virus hergestellt werden. Für EHV-C wurde das Transfergen C-syngagpolnef von HIV-1 Subtyp C an Stelle des gfp Gens in das mini F-Plasmid eingefügt.⁴¹

2.1.2 New York Vaccinia Virus-HIV-C

Das Donorplasmid pMA60gp120C/gagpolnef-C14, ein pUC-Derivat, produzierte Aventis Pasteur in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Hans Wolf und Prof. Dr. Ralf Wagner für die Bildung von NYVAC-C. Es besitzt zwei flankierende Sequenzen, zwischen denen sich die Gene gp120 und gagpolnef von HIV-1 clade C sowie zwei synthetisch hergestellte E/L-Promotoren mit entgegengesetzter Orientierung befinden. Mit der Calcium-Phosphat-Methode wurden 1°CEF-Zellen mit dem Plasmid transfiziert und gleichzeitig mit NYVAC mit einer MOI (multiplicity of infection) von 10 infiziert. Auf diese Weise entstanden rekombinante Viren.

Für die Arbeit stellte Aventis Pasteur freundlicherweise den viralen Vektor NYVAC-C zur Verfügung.^{37, 42}

2.2 Kultivierung von HEK 293T-Zellen

Die HEK (*human embryonal kidney*) 293T-Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen (BD Falcon™) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und alle drei bis vier Tage im Verhältnis 1:25 gesplittet.

Als Medium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS) (PAN™ biotech GmbH), 1 % Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) verwendet. Sämtliche Zellkulturmedien und Antibiotika stammten, wenn nicht anders erwähnt, von der PAN™ biotech GmbH.

2.3 Gewinnung von PBMCs (*peripher blood mononuclear cells*) aus Buffy-Coat

Unter PBMCs (*peripher blood mononuclear cells*) versteht man die mononukleären Zellen des peripheren Blutes, wie etwa Monozyten, B- und T-Lymphozyten. Leukozyten und Thrombozyten lassen sich als Buffy-Coat zusammenfassen.

Zur Isolierung der PBMCs wurden 50 ml einer humanen Blutkonserve 3:1 mit P2 (PBS; 2 % FKS) verdünnt und 15 Minuten bei 1000 x g ohne Bremse über einen Ficoll Dichtegradienten aufgetrennt. Die isolierten Phasen wurden zweimal in 40 ml P2-Puffer gewaschen (10 Minuten, 5 °C, 300 x g) und anschließend wurde die Zellzahl bestimmt.

2.4 Generieren von MDDCs (*monocytes derived dendritic cells*) aus CD14⁺ Monozyten

Die Gewinnung von CD14⁺ Monozyten zur Generierung von MDDCs erfolgte über das Prinzip der positiven Selektion mittels magnetischer Zellseparation (*Magnetic Cell Sorting*, MACS[®], Milteny Biotec). Dabei konnten die CD14⁺ Monozyten mit Hilfe von CD14 MicroBeads (Milteny Biotec), die spezifisch an CD14⁺ Zellen binden, selektiv gewonnen werden.

Zunächst wurden jeweils 1*10⁸ PBMCs in ein 15 ml Falcon Tube gegeben und für 10 Minuten bei 5 °C und 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 800 µl MACS-Puffer resuspendiert. 200 µl CD14 MicroBeads wurden dazugegeben und für 15 Minuten bei 5 °C inkubiert. Anschließend wurde das zehnfache Volumen an MACS-Puffer zugeführt und für 10 Minuten bei 5 °C und 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert.

Die Säule für die Separation (MS Säulen, Miltenyi Biotec) wurde in einen Magneten (MiniMACS[®] Magnet, Miltenyi Biotec) gesetzt und zunächst mit 500 µl MACS-Puffer

gespült. Anschließend wurde die bereits hergestellte Zellsuspension auf die Säule aufgetragen. Die Wirkung des Magneten hält dabei die an die MicroBeads gebundenen CD14⁺ Zellen an der Säule zurück. Dreimaliges Waschen mit 500 µl MACS-Puffer sollte nicht gebundene Zellen entfernen. Danach wurde die Säule aus dem Magneten genommen und in ein 15 ml Falcon Tube gestellt. Mit Hilfe eines Stempels wurde 1 ml MACS-Puffer durch die Säule gedrückt. So wurden die an die Säule gebundenen Zellen in das Falcon Tube überführt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 5 °C und 300 x g wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml DC-Medium gelöst. Die Zellen wurden danach ausgezählt und auf $1 \cdot 10^6$ Zellen/ ml mit DC-Medium eingestellt.

Anschließend wurden die CD14⁺ Zellen innerhalb von fünf Tagen in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ ml DC-Medium bei 37 °C unter Zugabe der Zytokine IL-4 und GM-CSF (je 500 U/ml) in 75 cm² Zellkulturflaschen (BD Falcon™) zu immaturren MDDCs kultiviert. Nach drei Tagen wurde das DC-Medium gewechselt und erneut die oben genannten Zytokine zugegeben.³⁷

2.5 Nachweis der Expression früher und später Gene von EHV-C und NYVAC-C

2.5.1 Infektion von HEK 293T-Zellen und MDDCs

Zur Infektion wurden jeweils $1,5 \cdot 10^6$ HEK 293T-Zellen in Petrischalen ausgesät und für 20 Stunden bei 37 °C inkubiert. In einem Vorversuch konnte gezeigt werden, dass sich Zellen innerhalb von 20 Stunden etwa verdoppeln, also zum Infektionszeitpunkt etwa $3 \cdot 10^6$ Zellen vorliegen.

Für die RNA-Isolation wurden in jedes well einer 6-well-Zellkulturschale $3 \cdot 10^6$ immaturre MDDCs, für die Western-Blot-Analyse $1 \cdot 10^6$ immaturre MDDCs ausgesät.

Die immaturren MDDCs und die HEK 293T-Zellen wurden mit EHV-C und NYVAC-C mit einer MOI von 10 infiziert. Für die Infektion wurde eine EHV-C-Impfstoffcharge mit einem Titer von $7,5 \cdot 10^7$ beziehungsweise $3,5 \cdot 10^8$ pfu/ml und eine NYVAC-C-Impfstoffcharge mit einem Titer von $1 \cdot 10^8$ pfu/ml verwendet.

Vier beziehungsweise acht Stunden nach Inkubation bei 37 °C erfolgte die Ernte der infizierten Zellen für die RNA-Isolation und die Western-Blot-Analyse.

2.5.2 RNA-Arbeitstechniken

Vor der Arbeit mit RNA wurden der Arbeitsplatz und die verwendeten Geräte mit 1 %-iger SDS-Lösung behandelt. Das geschah mit RNase-freien Materialien, Reagenzien und Handschuhen.

2.5.2.1 RNA-Isolation

Vier beziehungsweise acht Stunden nach der Infektion mit EHV-C und NYVAC-C erfolgte die Isolation und Aufreinigung der Gesamt-RNA mittels drei verschiedener Verfahren: (i) mittels RNeasy[®]-MiniKit (Quiagen) mit DNase-Verdau während der RNA-Isolation, (ii) mittels RNeasy[®]-MiniKit mit DNase-Verdau im Anschluß an die RNA-Isolation und (iii) mittels TRI-REAGENT[™] (Sigma-Aldrich[®]) und anschließender Verwendung des RNeasy[®]-MiniKits mit DNase-Verdau während der RNA-Isolation.

Bei der RNA-Isolation mit dem RNeasy[®]-MiniKit wurden die Zellen vier beziehungsweise acht Stunden nach Infektion durch Zugabe von 350 µl RLT-Puffer (Quiagen) lysiert. Dieser war zuvor mit β-Mercaptoethanol in einer Konzentration von 10 µl/ml (1:1000) versetzt worden. Die anschließende Isolation und Aufreinigung der RNA erfolgte nach dem Protokoll „RNeasy[®] Mini Protocol for Isolation of Total RNA from Animal Cells (Spin Protocol)“ von Quiagen. Die isolierte RNA wurde in 50 µl RNase-freiem H₂O (Quiagen) aufgenommen und bei –80 °C gelagert.

Der DNase-Verdau während der RNA-Isolation wurde nach dem Protokoll „Optional On-Column DNase Digestion with RNase-Free DNase Set“ von Quiagen durchgeführt:

Der DNase-Verdau im Anschluss an die RNA-Isolation erfolgte mit der DNase I recombinant, RNase-free[®] und dem Protokoll (Version Juli 2005) von Roche[®]. 20 µg der jeweils erhaltenen RNA-Probe wurden mit DEPC behandeltem H₂O auf ein Volumen von 40 µl aufgefüllt. Dazu kamen 5 µl RNase freie DNase I (10 U/µl, Roche[®]) und 5 µl Inkubationspuffer (400 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 60 mM MgCl₂, pH 7,9; Roche[®]). Die Inkubation der Suspension erfolgte für eine Stunde bei 37 °C, danach für 10 Minuten bei 95 °C, um das Enzym zu inaktivieren. Variabel verlief die Zugabe von 1 µl eines RNase-Inhibitors (50 U/µl, Roche[®]) während des DNase-Verdaus oder die Zugabe von 0,8 µl EDTA (0,5 mol/l), um die DNase nach Inkubation zu inaktivieren.

Bei der RNA-Isolation mit TRI-REAGENT[™] (Sigma-Aldrich[®]), einer Mischung aus Guanidinthiocyanat und Phenol, wurden zunächst vier beziehungsweise acht Stunden nach

Infektion die Zellen geerntet und für fünf Minuten bei Raumtemperatur und 300 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände verworfen und die Zellpellets für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit je 1 ml TRI-REAGENT™ inkubiert. TRI-REAGENT™ lysiert die Zellen und bewirkt eine effektive Trennung von RNA, DNA und Proteinen. Nach Zugabe von 133 µl Chloroform wurde für etwa 15 Sekunden mit der Hand kräftig geschüttelt, für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur und 12.000 x g zentrifugiert. Dabei erfolgte eine Auftrennung des Gemisches in drei Phasen, einer oberen wässrigen Phase mit RNA, einer mittleren Phase mit DNA und einer unteren organischen Phase, die Proteine enthält. Die wässrige obere Phase wurde abgenommen und mit demselben Volumen an 70 %-igem Ethanol (in nucleasefreiem H₂O) homogenisiert. 700 µl der erhaltenen Suspension wurden auf die RNeasy® Säule gegeben. Dabei schafft Ethanol die optimalen Bedingungen für eine effektive Bindung der RNA an die Membran der RNeasy® Säule. Alle folgenden Schritte der RNA-Isolation wurden nach dem erwähnten Protokoll von Qiagen weitergeführt. Der DNase-Verdau erfolgte dabei auf der RNeasy® Säule ebenfalls nach obigem Protokoll. Die RNA-Isolation mit TRI-REAGENT™ erfolgte nach dem Protokoll von Sigma-Aldrich® modifiziert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Alexander Kliche aus der Arbeitsgruppe Prof. Ralf Wagner.

2.5.2.2 Untersuchung isolierter RNA bezüglich DNA-Kontamination

Zur Detektion von DNA-Verunreinigungen isolierter RNA wurde eine PCR mit β-actin-Primern durchgeführt. In die PCR eingesetzt wurde dafür ein Reaktionsansatz aus 12,5 µl GoTaq® Green Master Mix (dNTPs, MgCl₂, Reaktionspuffer; Promega), jeweils 2,5 µl *forward* und *reverse* β-actin-Primer (10 µM; Invitrogen™), 1 µl RNA-Probe nach DNase-Verdau beziehungsweise 1µl β-actin-Plasmid (0,17 nM, 1:100 verdünnt, 363 bp, Positivkontrolle) und 6,5 µl nukleasefreies H₂O. Nach Versetzen mit DNA-Probenpuffer wurden die PCR-Produkte auf ein in TBE-Puffer befindliches Agarosegel (Sigma-Aldrich®) mit 1 %-igem Ethidiumbromid (Roth®) aufgetragen. Unter Spannung von 90 Volt wurden die vorhandenen PCR-Produkte und der DNA-Marker (100 bp DNA-Leiter) nach ihrer Größe aufgetrennt. Unter UV-Licht konnten die Proben anschließend auf DNA-Verunreinigungen untersucht werden.

Die PCR-Bedingungen wurden in Anlehnung an die Empfehlungen von Promega (GoTaq® Green Master Mix, Usage Information) gestaltet. Als PCR-Gerät wurde das Perkin Elmer Gene Amplification PCR System 2400 verwendet.

Tabelle 2.1
PCR-Protokoll in Anlehnung an die Empfehlungen von Promega (GoTaq® Green Master Mix, Usage Information)

PCR-Bedingungen	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	94°C	5 min
2. Amplifizierung (25 Zyklen)	94°C	30 sec
	50°C	40 sec
	72°C	1 min
3. Elongation	72°C	5 min

2.5.2.3 Konzentrationsbestimmung isolierter RNA mittels Spektralphotometer

Mittels Spektralphotometer (BioRad) konnte die Konzentration und Reinheit der isolierten RNA ermittelt werden. Dazu wurde 1 µl der jeweiligen RNA-Probe mit DEPC behandeltem H₂O 1:50 verdünnt und die UV-Absorption im Wellenlängenbereich von 260 nm und 280 nm in Quarzküvetten (BioRad) photometrisch gemessen. Aus der ermittelten Extinktion bei der Wellenlänge von 260 nm ließ sich mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes ($E = \epsilon \times c \times d$) die RNA-Konzentration errechnen ($1 A_{260} = 40 \mu\text{g ssRNA/ml}$).

Über das Verhältnis A_{260}/A_{280} ist die Reinheit der RNA zu bestimmen. Bei einem Wert zwischen 1,8 und 2,0 liegt reine RNA vor. Werte unter 1,8 weisen auf Verunreinigungen mit aromatischen Verbindungen wie Phenol oder aromatische Aminosäuren hin. Werte über 2,0 geben Auskunft über Verunreinigungen mit Salzen oder Nukleotiden infolge eines Abbaus von RNA durch RNasen.⁴³

2.5.2.4 Reverse Transkription

Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung wurde die DNA-freie RNA mit Hilfe des Super-ScriptTMIII First-Strand Synthesis System for RT-PCR (InvitrogenTM) in cDNA umgeschrieben. Im Reaktionsansatz wurden je nach vorhandener RNA-Konzentration 1 µg beziehungsweise 2 µg RNA, 1 µl Oligo (dT)₂₀-Primer (50 µM) und 1 µl dNTPmix (10 mM) vorgelegt und dieser wurde mit nucleasefreiem Wasser auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt.

Zur Denaturierung wurden die Ansätze im Thermoblock für fünf Minuten auf 65 °C erhitzt. Um eine Neubildung der Sekundärstrukturen zu verhindern, wurden die Proben anschließend auf Eis gelagert. Zum Reaktionsansatz wurden 10 µl eines Mastermixes pipettiert, der aus 2 µl 10x RT-Puffer (200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl), 4 µl MgCl₂ (25 mM), 2 µl DTT (0,1 M), 1 µl RNaseOUT™ (40 U/µl) und 1 µl SuperScript™ III Reverse Transkriptase (200 U/µl) bestand. Während der Inkubation der Proben im Thermoblock für 50 Minuten bei 50 °C erfolgte die reverse Transkription mit cDNA-Synthese. Anschließend wurde das Enzym für 15 Minuten bei 70 °C inaktiviert. Die aus der reversen Transkription gewonnene cDNA wurde bei –20 °C gelagert.

2.5.2.5 Qualitative Analyse revers transkribierter RNA

Zur qualitativen Quantifizierung der Ausgangs-cDNA revers transkribierter RNA für die nachfolgende real-time PCR wurde eine PCR mit β-actin Primern unter den in 2.5.2.2 aufgeführten Bedingungen durchgeführt. Waren spezifische Signale vorhanden, ließ sich die cDNA in die real-time PCR einsetzen.

2.5.3 Quantifizierung revers transkribierter RNA mittels real-time PCR

Die real-time PCR zur Quantifizierung revers transkribierter RNA wurde mit dem LightCycler™ System 1.2 (Roche®) durchgeführt. Verwendet wurde das DYNAmo™ Capillary SYBR® Green qPCR Kit (Finnzymes; New England Biolabs®). Die Datenanalyse erfolgte mit der LightCycler™ Software 4.0 (Roche®). Statistische Berechnungen und graphische Darstellungen wurden mit dem Programm Excel (Microsoft®) durchgeführt.

2.5.3.1 Prinzip des LightCyclers™ und der SYBR® Green Methode

Mit dem LightCycler™ System (Roche®) kann über die Fluoreszenzsignale des Farbstoffes SYBR® Green I die Amplifikation einer Nukleinsäure während des PCR-Laufes gemessen und gleichzeitig am Computermonitor angezeigt werden. SYBR® Green I ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich in kleinen Furchen doppelsträngiger DNA einlagert. Ungebunden fluoresziert der Farbstoff nur schwach. Bei Bindung an doppelsträngige DNA zeigt er jedoch ein starkes Fluoreszenzsignal. Da während der real-time PCR die DNA-Menge ansteigt, werden immer mehr Farbstoffmoleküle gebunden. Proportional zur ansteigenden

DNA-Menge nimmt auch das Fluoreszenzsignal zu. Nach jedem PCR-Zyklus misst der LightCycler™ die Fluoreszenz der einzelnen Proben.

Nur in der logarithmisch-linearen Phase der Amplifikationskurve, die sich aus der Verdoppelung der DNA während der PCR ergibt, kann man quantitative Aussagen über die Menge an Ausgangs-cDNA treffen. Den ersten Zyklus, in dem das logarithmisch ansteigende Fluoreszenzsignal signifikant nachzuweisen ist, legt die LightCycler™ Software als Crossing Point fest. Er ist definiert als die Zykluszahl, bei der die gemessene Leuchtintensität zum ersten Mal höher ist als die Hintergrundfluoreszenz. Über den Crossing Point lässt sich auf die Ausgangskonzentration der eingesetzten cDNA schließen.⁴⁴⁻⁴⁶

2.5.3.2 Schmelzkurvenanalyse

Da SYBR® Green I auch unspezifisch an Primer-Dimere oder Nebenprodukte bindet, die sich während der PCR-Reaktion bilden, lässt sich der dadurch verursachte Fluoreszenzanstieg zunächst nicht von dem des spezifischen PCR-Produkts unterscheiden. Erst nach Abschluss der PCR-Reaktion kann mittels einer Schmelzkurvenanalyse die Differenzierung zwischen spezifischem Produkt und Primer-Dimeren oder Nebenprodukten erfolgen. Dazu wird am Ende jeder PCR-Reaktion die Temperatur in der Probenkammer kontinuierlich auf 95 °C angehoben und zugleich das Fluoreszenzsignal in den einzelnen Kapillaren gemessen. Sobald die doppelsträngige DNA bei ansteigender Temperatur zu denaturieren beginnt und sich in ihre Einzelstränge auftrennt, wird das gebundene SYBR Green I freigesetzt. Die damit verbundene plötzliche Fluoreszenzabnahme wird aufgezeichnet. Aus der ersten Ableitung dieser Daten erhält man die Schmelztemperatur. Kleinere Fragmente wie Primer-Dimere oder unspezifische PCR-Produkte weisen meist eine geringere Schmelztemperatur auf als spezifische. Da jedes PCR-Produkt seinen eigenen spezifischen Schmelzpunkt besitzt, ist eine Differenzierung von unspezifischen und spezifischen doppelsträngigen DNA-Produkten mit der Schmelzkurvenanalyse möglich.⁴⁴⁻⁴⁵

2.5.3.3 Auswahl der geeigneten Primer für die real-time PCR

Für das Design der Primer erfolgte zunächst das Sequence Editing des Genoms NYVAC-C sowie des Genoms EHV-1 des pRacH Stammes mittels des Programms Husar Heidelberg Unix Sequence Analysis Resource. Die Sequenz von NYVAC mit einer Länge von 191.737 bp wurde 1992 von Tartaglia et al. veröffentlicht und ist in der NCBI Datenbank mit

der Acc.No. m35027.gb_vi5 zu finden. Die Genomsequenz von EHV-1 (pRacH) stellte freundlicherweise Klaus Osterrieder zur Verfügung. Das Primer-Design erfolgte mit dem Programm Gene Runner Version 3.05., die Synthese von der Firma Invitrogen™. Die Primer besitzen eine Länge von 20 bis 23 Nukleotiden und generieren 200- bis 400-bp große DNA-Fragmente. Die Annealing-Temperatur der Primer wurde entsprechend ihrer Schmelztemperatur ausgewählt.

Tabelle 2.2

Für die real time-PCR verwendeten Primer mit jeweiliger Nukleotidsequenz, Annealing-Temperatur sowie Länge des entstehendes Amplikons.

Das Primer-Design erfolgte mit dem Programm Gene Runner Version 3.05. Die Primer wurden von der Firma Invitrogen™ synthetisiert.

Name des Primers	Primersequenzen	Annealing-Temperatur	Länge des Amplikons
gag	fp (5'-3'): CCA TGC AGA TCC TGA AGG ACA C rp (3'-5'): GGT CTT GAA GAA CCT GTC GAC G	55 °C	320 bp
E3L	fp (5'-3'): GAT CTA TAT TGA CGA GCG TTC rp (3'-5'): CTC TCT TAG TTA TTT GGC AGT AC	55 °C	299 bp
F17R	fp (5'-3'): TAT ATC AAT ACC AAA GAA GGA AG rp (3'-5'): AGT CTA GAA GCT ACA TTA TCG C	55 °C	259 bp
IE	fp (5'-3'): CGA CAG CGA TAC CGA GAC CT rp (3'-5'): TTC GTC GCT GTC GCT GTC GT	62 °C	213 bp
EICP0	fp (5'-3'): TTT TTG GCC GTG GAT TCT GG rp (3'-5'): AGT TCT GCT TGG ACG ATG AG	62 °C	308 bp
gpD	fp (5'-3'): TTG CGG ATT GTT ACT GCT ACG rp (3'-5'): ATA ACA CGG CGA TAC AGT CC	55 °C	346 bp
β-actin	fp (5'-3'): GGT GGG CAT GGG CCA GAA GG rp (3'-5'): GAT GGG CAC AGT GTG GGT GAC	55 °C	363 bp

2.5.3.4 Vorbereiten der Proben und Wahl der geeigneten PCR-Bedingungen

Für alle LightCycler™-Analysen wurde das DYNAMO™ Capillary SYBR® Green qPCR Kit (Finnzymes; New England Biolabs®) verwendet. Ein Reaktionsansatz, hergestellt aus jeweils 1 µl der unter 2.5.3.3 dargestellten Primer (10 µM, *forward* und *reverse*), 2 µl nukleasefreiem H₂O und 5 µl Mastermix des DYNAMO™ Capillary SYBR® Green qPCR Kits (*Tbr* DNA polymerase, SYBR® green I, PCR Puffer, 6 mM MgCl₂, dNTP Mix mit dUTP), wurde in LightCycler™ Glaskapillaren pipettiert und jeweils 1 µl der aus der reversen Transkription gewonnenen cDNA zugefügt. Die verschlossenen Glaskapillaren wurden für 30 Sekunden bei 2500 rpm zentrifugiert und im LightCycler™ vermessen. Für die LightCycler™-Analysen wurden entsprechend der *Annealing*-Temperatur der verwendeten Primer unterschiedliche PCR-Protokolle (Tab. 2.3 und 2.4) verwendet:

Tabelle 2.3
LightCycler™ PCR-Protokoll bei Verwendung der Primer IE und EICP0 für die Amplifizierung der entsprechenden Gene von EHV-C

PCR-Prozess/Zyklus	Temperatur	Inkubationszeit	Temperaturänderung
Denaturierung	95 °C	600 sec	20 °C/sec
Amplifizierung 45 Zyklen			
Denaturierung	95 °C	10 sec	20 °C/sec
Annealing (Primerhybridisierung)	62 °C	12 sec	20 °C/sec
Elongation	72 °C	15 sec	20 °C/sec
Schmelzkurve			
Denaturierung	95 °C	30 sec	20 °C/sec
Reannealing	40 °C	30 sec	20 °C/sec
Denaturierung	95 °C	0 sec	0,2 °C/sec
Abkühlen	40 °C	30 sec	20 °C/sec

Tabelle 2.4

LightCycler™ PCR-Protokoll bei Verwendung der Primer β -actin, gag, gpD, E3L und F17R für die Amplifizierung der entsprechenden Gene von EHV-C und NYVAC-C

PCR-Prozess/Zyklus	Temperatur	Inkubationszeit	Temperaturänderung
Denaturierung	95 °C	600 sec	20 °C/sec
Amplifizierung 45 Zyklen			
Denaturierung	95 °C	10 sec	20 °C/sec
Annealing (Primerhybridisierung)	55 °C	12 sec	20 °C/sec
Elongation	72 °C	15 sec	20 °C/sec
Schmelzkurve			
Denaturierung	95 °C	30 sec	20 °C/sec
Reannealing	40 °C	30 sec	20 °C/sec
Denaturierung	95 °C	0 sec	0,2 °C/sec
Abkühlen	40 °C	30 sec	20 °C/sec

2.5.3.5 Analyse mittels relativer Quantifizierung

Bezüglich der in der real-time PCR ermittelten Genexpression lassen sich quantitative Aussagen treffen. Mit der mathematischen Formel nach Pfaffl (Abb. 2.1) ist die relative Quantifizierung der Genexpression des Zielgens möglich.

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta\text{CP}_{\text{Zielgen}} (\text{Kontrolle} - \text{Probe})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta\text{CP}_{\text{Referenzgen}} (\text{Kontrolle} - \text{Probe})}}$$

Abbildung 2.1

Formel nach Pfaffl (2001)⁴⁷ zur relativen Quantifizierung der Genexpression eines Zielgens bezogen auf ein Referenzgen

E: Effizienz, CP: Crossing Point

Dabei wird die Expression des Zielgens auf die Expression eines Referenzgens bezogen oder normalisiert. Als Referenzgene dienen vor allem sogenannte „Housekeeping Gene“. Sie werden als nicht regulierte Gene in allen kernhaltigen Zellen in konstanter Menge exprimiert. In dieser Arbeit wurde das „Housekeeping Gen“ β -actin als interne Kontrolle ausgewählt. In einer Probe werden also gleichzeitig die Expression des Zielgens und die des Referenzgens erfasst. Auch Fehler beim Umgang mit der Probe, etwa bei der reversen Transkription oder

beim Pipettieren, betreffen beide Gene gleichermaßen. Die Normalisierung der Expression des Zielgens auf die des Referengens kann diese Fehler ausgleichen.

Zusätzlich wird das Zielgen auf ein Kontrollgen oder vergleichendes Gen bezogen. Auf diese Weise sind die einzelnen Proben untereinander zu normieren. In dieser Arbeit wurde dazu das Gen mit der höchsten Expression verwendet.

Außerdem sind für die relative Quantifizierung die unterschiedlichen real-time PCR-Effizienzen zu berücksichtigen. Die Effizienz einer PCR beschreibt, wie effektiv eine DNA-Matrize während der PCR vervielfältigt wurde. Im Idealfall verdoppelt sich die DNA-Matrize in jedem PCR-Zyklus ($E=2$). Das kommt jedoch nur selten vor, meistens liegt die PCR-Effizienz unter zwei. Um unterschiedliche DNA-Proben nach der real-time PCR bezüglich ihrer Kopienzahl miteinander vergleichen zu können, muss für jede Probe die PCR-Effizienz bestimmt werden. Daher wurde für jede cDNA-Probe eine Verdünnungsreihe (1:20, 1:10, 1:5 und unverdünnt) hergestellt und wie unter 2.5.3.4 beschrieben in die LightCycler™-Analyse eingesetzt. Nach dem PCR-Lauf wurden die ermittelten Crossing Points in einer logarithmischen Funktion gegen die Verdünnungsstufen dargestellt. Es entstand eine Regressionsgerade oder Standardkurve. Aus der negativen Steigung der Geraden ließ sich die PCR-Effizienz nach der Formel $E=10^{-1/\text{Steigung}}$ berechnen.⁴⁷⁻⁴⁹

2.6 Western-Blot-Analyse

Vier beziehungsweise acht Stunden nach Infektion von MDDCs und HEK 293T-Zellen mit EHV-C und NYVAC-C wurde die Western-Blot-Analyse durchgeführt. Zu $1 \cdot 10^6$ der infizierten Zellen wurde jeweils 300 μl SDS Probenpuffer zugegeben. Durch Erhitzen der Proben für drei Minuten bei 95 °C löste sich die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine. Die Proteine wurden anschließend mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bei 25 mA entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Dafür wurde SDS-PAGE Laufpuffer verwendet. Die Gelapparaturen stammten von der Firma Biometra.³⁷

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden in einer „semidry-Blotting“-Apparatur (BioRad) aus dem Trenngel auf eine 45 μm Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell) übertragen. Das geschah mit einem leitfähigen Transferpuffer. Nach Anlegen einer Spannung von 15 V und einer Stromstärke von 0,15 A für 50 bis 60 Minuten wanderten die Proteine Richtung Anode und wurden auf die Nitrozellulosemembran geblottet.

Vor der Detektion der Zielproteine mittels spezifischer Antikörper müssen freie, unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran blockiert werden. Dazu wurde

diese in einer 5 %igen Magermilch-TBS-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für jeweils 10 Minuten zweimal mit TBS und einmal mit TTBS gewaschen.

Der primäre Antikörper (CB-4/1 Anti HIV-1 C-Clade p24, monoklonaler Maus-Antikörper), der gegen ein Epitop des p24-Proteins gerichtet ist, wurde anschließend mit einer Verdünnung von 1:1000 auf die Nitrozellulosemembran gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran für jeweils 10 Minuten zweimal mit TBS und einmal mit TTBS gewaschen. Danach wurde der sekundäre, alkalische Phosphatase (AP)-konjugierte anti-Maus-Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 zugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Erneutes Waschen entfernte nicht gebundenen Antikörper. Die Farbreaktion erfolgte durch Zugabe von 400 µl NBT/BCIP-Färbereagenz (Roche®), dem Substrat der Alkalischen Phosphatase, in 20 ml AP-Färbepuffer. Der Farbstoff präzipitiert dabei an der Stelle des Zielproteins.³⁷

Die bei der Western-Blot-Analyse als Positiv- und Negativkontrolle verwendeten RK13-Zellen stellte freundlicherweise die Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ralf Wagner zur Verfügung.

Tabelle 2.5

Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese³⁷

Einzelkomponenten	Sammelgel (5 %)	Trenngel (12,5 %)
1,88 M Tris/HCl pH 8,8	-	3,6 ml
0,625 M Tris/HCl pH 6,8	1,2 ml	-
0,5 % SDS-Lösung	1,2 ml	3,6 ml
H ₂ O _{bidest.}	2,61 ml	3,3 ml
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamine)	6 µl	15 µl
10 % Ammoniumpersulfat (APS)	30 µl	90 µl
30 % Acrylamid- 0,8 % Bisacrylamid-Stammlösung	0,99 ml	7,5 ml

2.7 Infektion von HEK 293T-Zellen und MDCCs mit Farbstoff markiertem EHV-C und NYVAC-C

2.7.1 Verwendung von CFDA-SE als Farbstoff

CFDA-SE (Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester) ist ein lipophiles, nur gering bis nicht fluoreszierendes Molekül, das passiv in Zellen diffundiert. Innerhalb der Zelle spalten intrazelluläre Esterasen beide Acetatgruppen ab, wodurch das stark grün fluoreszierende CFSE (Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester) entsteht. CFSE bindet unter Abspaltung der Succinimidylgruppe kovalent an Aminreste cytoplasmatischer Proteine, wie Lysin- oder Argininseitenketten, und lässt sich bei Bindung an langlebige intrazelluläre Moleküle sogar monatelang stabil innerhalb der Zelle zurückhalten. Das Emissionsmaximum liegt bei 517 nm, das Excitationsmaximum bei 492 nm.⁵⁰

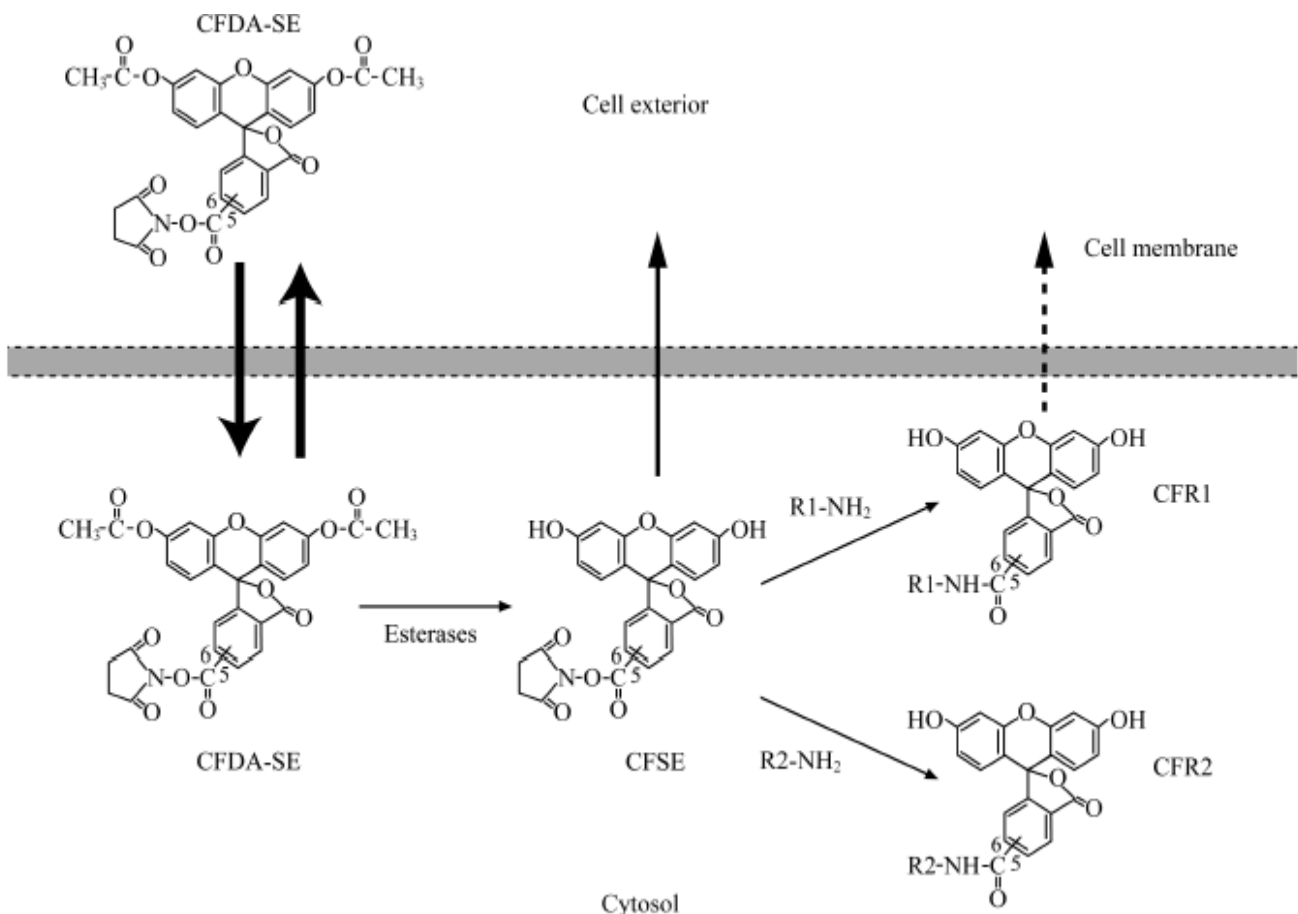


Abbildung 2.2
Schematische Darstellung der biochemischen Abläufe bei der Anfärbung der Zellen mit CFDA-SE (Wang, 2005).⁵⁰

Nach Eintritt von CFDA-SE in die Zellen erfolgt die Abspaltung beider Acetatgruppen durch intrazelluläre Esterasen. Dadurch entsteht das stark grün fluoreszierende CFSE, das unter Abspaltung der Succinimidylgruppe kovalent an Aminreste cytoplasmatischer Proteine bindet.

Das Anfärben von Zellen mit CFDA-SE ist eine weit verbreitete Methode unter anderem zur Analyse der Proliferation von Lymphozyten. In Studien wurden bereits MDDCs mit CFDA-SE markierten HIV-VLPs infiziert.⁵¹⁻⁵²

In dieser Arbeit wurden die Vakzinekandidaten EHV-C und NYVAC-C mit CFDA-SE markiert, um die Infektion der Zellen direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop und mittels FACS-Analyse nachzuweisen.

2.7.2 Generierung von Farbstoff markiertem EHV-C und NYVAC-C

10 µl CFDA-SE (10µM; Invitrogen™) wurden zu 40 µl EHV-C eines Titers von $8 \cdot 10^8$ beziehungsweise $3,5 \cdot 10^8$ pfu/ml und 40 µl der Verdünnung zu 160 µl NYVAC-C eines Titers von $1 \cdot 10^8$ pfu/ml gegeben. Als Negativkontrolle wurde BSA (Bovines-Serum-Albumin; Sigma-Aldrich®) mitgeführt. 100 mg BSA wurden in 9 ml PBS gelöst, steril filtriert, und mit 10 µl der CFDA-SE-Verdünnung (10 µM) angereichert.

Zur Bindung des Farbstoffes an das Virus wurden alle Ansätze für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Um ungebundenes CFDA-SE zu entfernen, wurden die Proben anschließend für eine Stunde über Ultrazentrifugation (Ultrazentrifuge von Beckman Coulter) bei 23.500 rpm und einer Rotortemperatur von 25 °C aufgereinigt. Dazu wurden die Ansätze (außer die BSA-Probe) mit 9 ml PBS aufgefüllt, in ein Ultrazentrifugenröhrchen vorgelegt und mit Ausnahme der NYVAC-C-Probe mit 2 ml einer steril filtrierten 30 %igen Saccharoselösung (8,29 g Saccharose in 25 ml Miliporwasser) unterschichtet. Als Kontrolle für die ohne Saccharosekissen aufgereinigten Proben wurden 40 µl der CFDA-SE-Lösung (10 µM) ohne Saccharosekissen mitgeführt.

Der Überstand jeder Probe, der eventuell überschüssiges CFDA-SE enthielt, wurde verworfen und das Pellet mit EHV-C beziehungsweise NYVAC-C dem ursprünglichen Volumen entsprechend in 40 µl beziehungsweise 160 µl PBS, das BSA-Pellet in 200 µl PBS und das CFDA-SE-Pellet in 40 µl PBS aufgenommen.

Im Anschluss wurden $5 \cdot 10^5$ HEK 293T-Zellen beziehungsweise MDDCs infiziert und nach 12 Stunden Inkubation geerntet. Nach Zentrifugation für fünf Minuten bei 300 x g und Raumtemperatur wurde das Pellet in 1 ml FACS-Puffer gelöst und bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Anschließend fand die Analyse der Proben mittels FACS und unter dem Fluoreszenzmikroskop statt. Bei ausgewählten Proben wurde außerdem eine intrazelluläre p24-FACS-Färbung durchgeführt.

2.7.3 Nachweis der Infektion mit CFDA-SE markiertem Virus in der FACS-Analyse

Während der FACS-(Fluorescence Activated Cell Sorting)-Analyse passieren Zellen einen Laserstrahl. Dabei wird die Streuung des auf die Zelle treffenden Lichts detektiert, das ein Maß für die strukturellen Eigenschaften der Zelle auf molekularer Ebene ist. Das Vorwärtsstreulicht FSC (Forward Scatter) charakterisiert die Größe der Zelle, das Seitwärtsstreulicht SSC (Side Scatter) die Granularität der Zelle. Diese Messwerte lassen sich als Punktwolkendiagramm (Dot-Plot) graphisch darstellen, wobei jede einzelne Zelle als Punkt abgebildet wird. Auf der X-Achse ist das Vorwärtsstreulicht, auf der Y-Achse das Seitwärtsstreulicht aufgetragen. Während der FACS-Analyse lassen sich mittels Photodetektor Fluoreszenzsignale von Fluorochrom gekoppelten Antikörpern detektieren. Sie binden an bestimmte Merkmale der Zelloberfläche wie CD (Cluster of Differentiation) oder an intrazelluläre Antigene. Der Laserstrahl regt die Fluorochrome an und diese entsenden ein Fluoreszenzsignal, das der entsprechende Photodetektor je nach Wellenlänge misst. Auch wenn unterschiedliche Fluorochrome verschiedene Emissionsspektren besitzen, die von den jeweiligen Photodetektoren erfasst werden, können sich die Fluoreszenzsignale teilweise überlagern. Verwendet man mehrere Fluoreszenzfarbstoffe, müssen sie also gegeneinander kompensiert werden.⁵³

Das Absorptionsmaximum des Fluorochroms CFSE liegt bei 492 nm, das Emissionsmaximum bei 517 nm. Sein Fluoreszenzsignal wird daher über den Fluoreszenzkanal FL1 des FACS-Gerätes detektiert.

Zum Nachweis der Infektion von MDDCs und HEK 293T-Zellen mit CFDA-SE markiertem Virus wurden die einzelnen Proben wie unter 2.7.2 beschrieben in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen und bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt. Die Proben wurden anschließend im FACS-Gerät (Beckman Coulter; Epics XL.MCL) analysiert.

2.7.4 Nachweis der Bildung des Polyproteins GagPolNef mittels intrazellulärer FACS-Färbung

Mittels intrazellulärer FACS-Färbung war es möglich die Bildung des HIV-1 Polyproteins GagPolNef von EHV-C und NYVAC-C infizierten MDDCs beziehungsweise HEK 293T-Zellen zu messen. Zunächst wurden die Zellen als Pellet vorgelegt und zweimal mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurden sie für fünf Minuten bei 5 °C und 300 x g zentrifugiert und die Überstände verworfen. Um eine unspezifische Bindung des

später hinzugefügten Antikörpers an die Fc-Rezeptoren der Zelloberfläche zu verhindern, wurden diese blockiert. Dazu wurden 100 µl FACS-Puffer und 5 µl Fc-Rezeptor-Blocker (MACS, Milteny Biotec) zum Zellpellet zugegeben, für 10 Minuten bei 5 °C inkubiert und gewaschen (s.o.). Durch Inkubation mit 250 µl Cytofix/Cytoperm (4 % PFA, 1 % Saponin in PBS) für 20 Minuten bei 5 °C wurde die Zellmembran permeabilisiert. Die Zellen wurden im Anschluss zweimal mit je 500 µl Perm/Wash (0,1% Saponin in PBS) für fünf Minuten bei 5 °C und 500 x g gewaschen. Die intrazelluläre Färbung erfolgte durch Zugabe von 100 µl Perm/Wash und 0,5 µl PE-gekoppeltem p24-Antikörper (Beckman Coulter) zum Zellpellet und Inkubation für 25 Minuten bei 5 °C im Dunkeln. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 500 µl Perm/Wash gewaschen und das Zellpellet in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert. Der Fluoreszenzkanal FL2 des FACS-Gerätes detektierte das Fluoreszenzsignal.

2.7.5 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Infektion mittels CFDA-SE markierten Viren

Etwa 15 Minuten vor dem Mikroskopieren wurden die Zellen, die mit CFDA-SE markiertem Virus infiziert und teils mit intrazellulärer p24-Protein-FACS-Färbung versehen waren, für fünf Minuten bei 5 °C und 300 x g abzentrifugiert. Die Zellen lagen somit als Pellet vor. Zugleich erfolgte das Abzentrifugieren der DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)-Stocklösung (Roche®) mit einer Konzentration von 1 µg/µl für fünf Minuten bei Raumtemperatur und 10.000 rpm. 4',6-Diamidino-2-phenylindol ist eine Verbindung, die sich in kleine Furchen der DNA einlagert und die Zellkerne farbig darstellt. Wird die Verbindung mit ultraviolettem Licht angeregt, fluoresziert es im sichtbaren Licht blau.

Der für die Färbung der Zellen verwendete Überstand wurde mit PBS 1:1000 (2 µl DAPI + 1998 µl PBS) verdünnt. Zum Zellpellet wurden jeweils 100 µl der hergestellten Verdünnung gegeben und unter Lichtausschluß gelagert. Anschließend erfolgte die Detektion unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMRX, RT Slider Spot diagnostic instruments inc., Software metaview 4.6 universal imaging cooperation).

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, die Infektionseffizienz der beiden Vektorsysteme EHV-C und NYVAC-C in MDDCs und HEK 293T-Zellen zu klären. Nach Infektion mit EHV-C und NYVAC-C wurde RNA isoliert und die Expression früher und später Gene mittels LightCycler™-Analyse ermittelt. Die Bildung des HIV-Polyproteins GagPolNef ließ sich mittels Western-Blot-Analyse darstellen. Zudem wurde eine Methode entwickelt, die Infektion der Zellen mit CFDA-SE markiertem EHV-C und NYVAC-C fluoreszenzmikroskopisch zu analysieren.

3.1 Ausbeute von immaturren MDDCs nach deren Generierung aus CD14⁺ Monozyten

Aus einer humanen Blutkonserve konnten durchschnittlich etwa $5 \cdot 10^8$ ($2-8,5 \cdot 10^8$) PBMCs isoliert werden. Aus diesen PBMCs wurden entsprechend dem beschriebenen Verfahren etwa $5,5 \cdot 10^7$ ($2-10 \cdot 10^7$) CD14⁺ Zellen gewonnen. Nach Zugabe der Zytokine IL-4 und GM-CSF reiften die CD14⁺ Zellen innerhalb von 5 Tagen zu etwa $3,5 \cdot 10^7$ ($1,4-5,7 \cdot 10^7$) immaturren MDDCs heran.

3.2 Aussäen und Wachstum von HEK 293T-Zellen

Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, war es wichtig, eine äquivalente Anzahl an MDDCs und HEK 293T-Zellen mit derselben Menge an Virus zu infizieren.

Damit zum Zeitpunkt der Infektion mit EHV-C und NYVAC-C etwa $3 \cdot 10^6$ HEK 293T-Zellen pro Petrischale vorlagen, wurden HEK 293T-Zellen unterschiedlicher Ausgangszellzahl 20 Stunden vor der Infektion in vier Petrischalen ausgesät.

Tabelle 3.1

Anzahl der HEK 293T-Zellen 20 Stunden nach Inkubation bei 37 °C und unterschiedlicher Ausgangszellzahl

	Anzahl an HEK 293T-Zellen			
Zeitpunkt der Aussaat	$1 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^6$
nach 20 h Inkubation bei 37°C	$2,9 \cdot 10^6$	$3,25 \cdot 10^6$	$5,8 \cdot 10^6$	$6,8 \cdot 10^6$

Bei den folgenden Versuchen wurden 20 Stunden vor der Infektion $1,5 \cdot 10^6$ HEK 293T-Zellen pro Petrischale ausgesät.

3.3 Nachweis der Expression früher und später Gene von EHV-C und NYVAC-C in MDDCs und HEK 293T-Zellen mittels LightCycler™-Analyse

Zur Bestimmung der Expression früher und später Gene von EHV-C und NYVAC-C mittels LightCycler™-Analyse war nach der Infektion von MDDCs und HEK 293T-Zellen die Isolation der RNA nötig. Dabei wurden die Ergebnisse zweier verschiedener RNA-Isolationsmechanismen miteinander verglichen: RNeasy®-MiniKit (Quiagen) versus RNA-Isolation mit TRI-REAGENT™ (Sigma-Aldrich®). Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt. Im Anschluß erfolgte die reverse Transkription von RNA in cDNA. Diese wurde zur Quantifizierung mittels real-time PCR verwendet, um die Expression früher und später Gene miteinander zu vergleichen.

3.3.1 RNA-Isolation aus virusinfizierten MDDCs und HEK 293T-Zellen 4 hpi und 8 hpi mittels RNeasy®-MiniKit mit DNase-Verdau und reverse Transkription in cDNA

Die ersten RNA-Isolationen aus EHV-C und NYVAC-C infizierten MDDCs und HEK 293T-Zellen erfolgten 4 hpi und 8 hpi mittels RNeasy®-MiniKit (Quiagen) mit DNase-Verdau, entweder während der RNA-Isolation direkt auf der RNeasy®-Säule (Quiagen) oder im Anschluß an die RNA-Isolation. In der Kontroll-PCR zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse. Bei DNase-Verdau nach der RNA-Isolation konnten in den verschiedenen RNA-Proben keine spezifischen DNA-Signale detektiert werden. Dies bedeutet, dass keine DNA-Verunreinigungen vorlagen (hier nicht dargestellt). Aus der erhaltenen RNA wurde dabei mittels reverser Transkriptase cDNA hergestellt (Abb. 3.1 c, Probe 2-11).

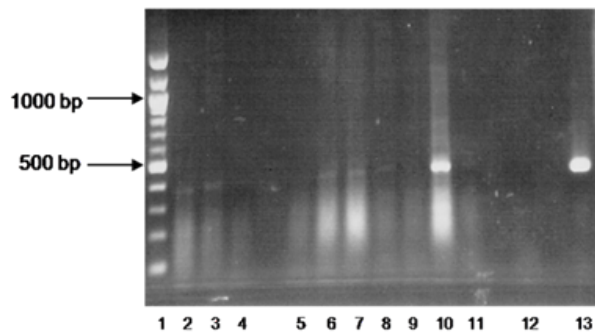
Beim DNase-Verdau auf der RNeasy®-Säule während der RNA-Isolation zeigten sich in den meisten RNA-Proben (Abb. 3.1 a, Probe 2,3,6,7,8,10) spezifische DNA-Signale. Diese Proben wurden einem erneuten DNase-Verdau unterzogen. In der anschließend durchgeführten Kontroll-PCR waren keine DNA-Signale mehr nachzuweisen (hier nicht dargestellt) und die RNA ließ sich mittels reverser Transkriptase in cDNA überführen (Abb. 3.1 b).

Der qualitative Nachweis entstandener cDNA erfolgte mit anschließender Kontroll-PCR. Darin wird die jeweilige DNA-Menge durch die Signalstärke dargestellt. Starke Signale sind Zeichen einer suffizienten Menge an cDNA, schwache Signale hingegen sprechen für geringe Mengen an cDNA.

Wurde die RNA mittels RNeasy[®]-MiniKit (Quiagen) isoliert, ließen sich unabhängig von der Methode des DNase-Verdau in der Kontroll-PCR nach reverser Transkription in den cDNA-Proben nur schwache DNA-Signale nachweisen (Abb. 3.1 b, c, Probe 2-11). Die Negativkontrolle H₂O (Abb. 3.1 a-c, Probe 12) zeigte in der Kontroll-PCR kein DNA-Signal, das als Positivkontrolle verwendete β -actin-Plasmid (0,17 nM, 363 bp, Abb. 3.1 a-c, Probe 13) ein starkes DNA-Signal.

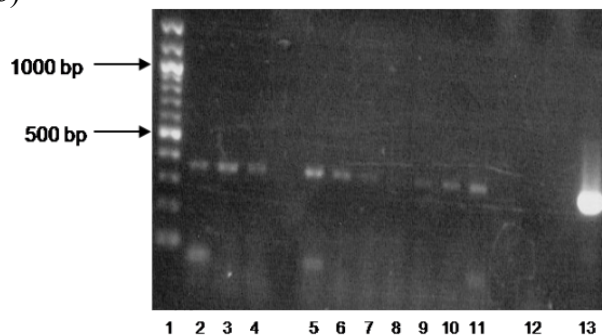
Wurden die cDNA-Proben anschließend in die real time PCR eingesetzt, lagen die Crossing Points erwartungsgemäß bei hoher Zykluszahl. Der Crossing Point ist definiert als die Zykluszahl, bei der das in der real-time PCR logarithmisch ansteigende Fluoreszenzsignal signifikant nachzuweisen ist. Liegen die Crossing Points bei hoher Zykluszahl, lässt dies auf eine niedrige Ausgangsmenge an cDNA schließen. Die Crossing Points der cDNA-Proben von Abbildung c lagen bei Zyklus 22 nur geringfügig unter der Negativkontrolle von Zyklus 29. Um aussagekräftige Ergebnisse in der LightCycler[™]-Analyse zu erhalten, sollte aber eine suffiziente Ausgangsmenge an cDNA vorliegen.

a)



Nr.	Zellen	Stimulans	Zeitpunkt der RNA-Isolation
1	Marker	-----	-----
2	HEK 293T	EHV-C	4 hpi
3	HEK 293T	NYVAC-C	4 hpi
4	MDDC	EHV-C	4 hpi
5	MDDC	NYVAC-C	4 hpi
6	HEK 293T	EHV-C	8 hpi
7	HEK 293T	NYVAC-C	8 hpi
8	MDDC	EHV-C	8 hpi
9	MDDC	NYVAC-C	8 hpi
10	HEK 293T	-----	4 hpi
11	MDDC	-----	4 hpi
12	H ₂ O, Negativkontrolle		
13	β-actin-Plasmid (0,17 nM; 363 bp) Positivkontrolle		

b)



c)

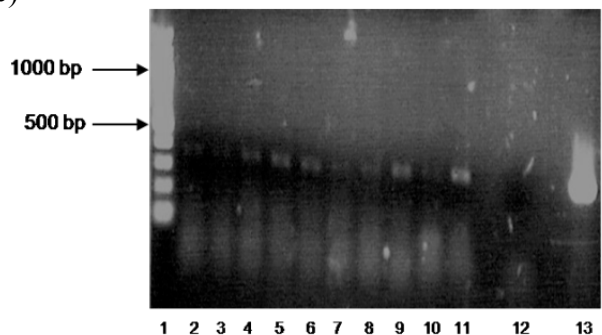


Abbildung 3.1

Kontroll-PCR nach dem DNase-Verdau während der RNA-Isolation (RNeasy®-Säule) virusinfizierter und nicht infizierter MDDCs und HEK 293T-Zellen (a) und nach reverser Transkription der RNA in cDNA (b, c)

a) In den Proben 2,3,6,7,8 ,10 konnte trotz DNase-Verdau ein spezifisches Signal auf Höhe 363 bp detektiert werden.

b) Die unter a) dargestellten Proben wurden vor der reversen Transkription einem zweiten erfolgreichen DNase-Verdau (Kontroll-PCR nicht dargestellt) unterzogen.

c) Die Proben stammten aus der reversen Transkription nach primär erfolgreichem DNase-Verdau (Kontroll-PCR nicht dargestellt). Die Proben 2 bis 11 zeigten jeweils nur ein schwaches spezifisches DNA-Signal auf Höhe von 363 bp.

Als Negativkontrolle wurde H₂O, als Positivkontrolle ein β-actin-Plasmid (0,17 nM, 363 bp) verwendet.

3.3.2 RNA-Isolation aus HEK 293T-Zellen mittels RNeasy®-MiniKit mit DNase-Verdau unter Verwendung von RNase-Inhibitor und EDTA sowie reverse Transkription in cDNA

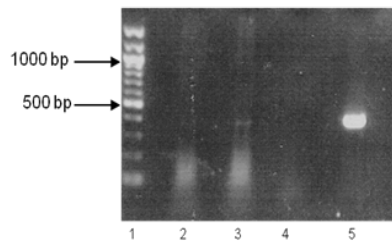
Eine mögliche Ursache für die Bildung geringer Mengen an cDNA bei der reversen Transkription ist eine niedrige RNA-Ausbeute wegen Verunreinigung des Versuchsablaufs mit RNasen. Auch könnte eine Zerstörung entstehender cDNA durch etwaige Restaktivitäten enthaltener DNase zugrunde liegen. Um das zu prüfen, wurde aus nicht infizierten HEK 293T-Zellen RNA isoliert und während der anschließenden DNase Behandlung ein RNase-Inhibitor und nach Wirkung der DNase EDTA zur Inhibierung vorhandener DNase verwendet.

Nach dem DNase-Verdau direkt auf der RNeasy®-Säule während der RNA-Isolation aus HEK 293T-Zellen (Abb. 3.2 a) zeigte sich vergleichbar mit den Ergebnissen aus 3.3.1 ein verbleibendes DNA-Signal auf Höhe von 363 bp. Daher wurden diese Proben erneut mit DNase behandelt. In der Kontroll-PCR konnte kein erkennbares DNA-Signal dargestellt werden (Abb. 3.2 b, Probe 2,3). Beim DNase-Verdau nach der RNA-Isolation aus HEK 293T-Zellen (Abb. 3.2 b, Probe 2-6) wurde ausgewählten RNA-Proben ein RNase-Inhibitor zugefügt (Abb. 3.2 b, Probe 2-5). Zu einer der RNA-Proben wurde nach Einwirkung der DNase zur vollständigen Deaktivierung des Enzyms zusätzlich EDTA gegeben (Abb. 3.2 b, Probe 5). Eine RNA-Probe erhielt weder einen RNase-Inhibitor noch EDTA (Abb. 3.2 b, Probe 6).

In der Kontrolle-PCR nach reverser Transkription zeigte sich für die gebildete cDNA aus der RNA, die mit RNase-Inhibitor und EDTA behandelt wurde (Abb. 3.2 c, Probe 5), ein stärkeres DNA-Signal als für die cDNA aus unbehandelter RNA (Abb. 3.2 c, Probe 6). Im Vergleich mit der Positivkontrolle (Abb. 3.2 c, Probe 8) konnten für alle cDNA-Proben lediglich schwache DNA-Signale dargestellt werden (Abb. 3.2 c, Probe 2-6). Auch nach Zugabe von RNA-Inhibitor und EDTA konnte keine ausreichende Ausgangsmenge an cDNA für die LightCycler™-Analyse gewonnen werden.

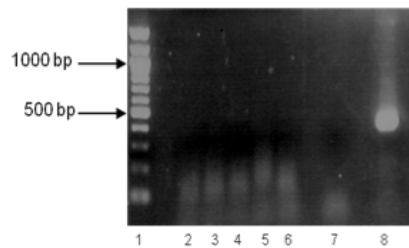
In den Kontroll-PCR mit β -actin spezifischen Primern wurde ein β -actin-Plasmid (0,17 nM, 363 bp) als Positivkontrolle und H₂O als Negativkontrolle verwendet (Abb. 3.2 a-c).

a)



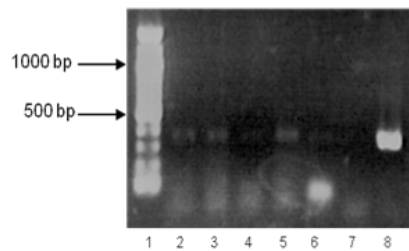
Nummer	Zellen
1	Marker
2	HEK 293T
3	HEK 293T
4	H ₂ O
5	β-actin-Plasmid (0,17 nM; 363 bp)

b)



Nummer	Zellen
1	Marker
2-6	HEK 293T
7	H ₂ O
8	β-actin-Plasmid (0,17 nM; 363 bp)

c)



Nummer	Zellen
1	Marker
2-6	HEK 293T
7	H ₂ O
8	β-actin-Plasmid (0,17 nM; 363 bp)

Abbildung 3.2

Kontroll-PCR nach dem DNase-Verdau während der RNA-Isolation (RNeasy®-Säule) (a) und nach der RNA-Isolation aus HEK 293T-Zellen unter Verwendung von RNase-Inhibitor und EDTA (b) sowie nach reverser Transkription von RNA in cDNA (c)

a) In Probe 2 konnte trotz DNase-Verdau ein spezifisches Signal, in Probe 3 ein schwaches Signal auf Höhe von 363 bp detektiert werden.

b) Bei den Proben 2 und 3 erfolgte ein zusätzlicher DNase-Verdau. Bei Probe 2 bis 5 wurde während des DNase-Verdau ein RNase-Inhibitor verwendet, bei Probe 5 zusätzlich EDTA, bei Probe 6 weder RNase-Inhibitor noch EDTA. In den Proben 2 bis 6 konnte kein spezifisches DNA-Signal auf Höhe von 363 bp dargestellt werden.

c) In allen Proben zeigt sich nur eine schwache spezifische DNA-Bande bei 363 bp.

Als Negativkontrolle wurde H₂O, als Positivkontrolle ein β-actin-Plasmid (0,17 nM, 363 bp) verwendet.

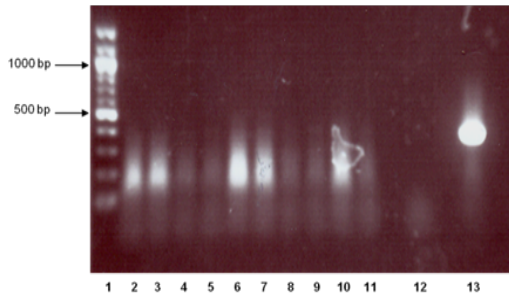
3.3.3 RNA-Isolation mittels TRI-REAGENT™ aus virusinfizierten MDDCs und HEK 293T-Zellen 4 hpi und 8 hpi mit DNase-Verdau

Da sich nach RNA-Isolation mittels RNeasy®-MiniKit (Quiagen) und anschließender reverser Transkription keine ausreichende Ausgangsmenge an cDNA für die LightCycler™-Analyse gewinnen ließ, wurde TRI-REAGENT™ (Sigma-Aldrich®) als alternatives RNA-Isolationsverfahren verwendet.

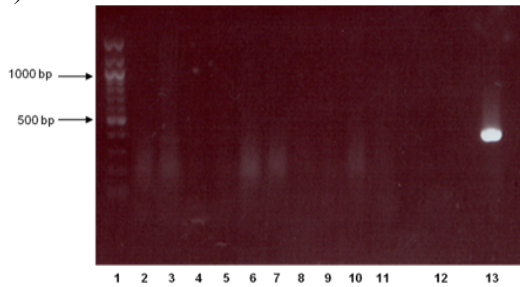
Nachdem HEK 293T-Zellen und MDDCs, die aus PBMCs von drei verschiedenen Probanden isoliert wurden, mit EHV-C und NYVAC-C infiziert worden waren, erfolgte 4 hpi und 8 hpi die RNA-Isolation mittels TRI-REAGENT™ (Sigma-Aldrich®) und anschließend der DNase-Verdau auf der RNeasy®-Säule. In der folgenden Kontroll-PCR mit spezifischen β -actin-Primern konnte kein DNA-Signal detektiert werden (Abb. 3.3. a-c, Probe 2-11). Das spricht für eine fehlende DNA-Verunreinigung isolierter RNA.

Als Positivkontrolle wurden ein β -actin-Plasmid (0,17 nM, 363 bp) und als Negativkontrolle H₂O verwendet (Abb. 3.3 a-c).

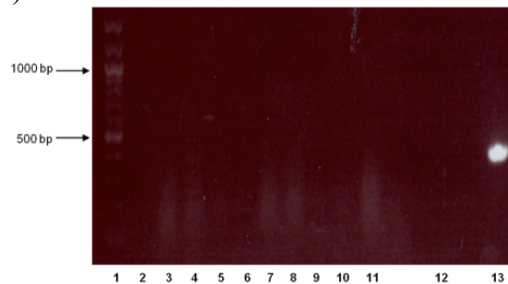
a)



b)



c)



Nr.	Zellen	Stimulans	Zeitpunkt der RNA-Isolation
1	Marker	----	----
2	HEK 293T	EHV-C	4 hpi
3	HEK 293T	NYVAC-C	4 hpi
4	MDDC	EHV-C	4 hpi
5	MDDC	NYVAC-C	4 hpi
6	HEK 293T	EHV-C	8 hpi
7	HEK 293T	NYVAC-C	8 hpi
8	MDDC	EHV-C	8 hpi
9	MDDC	NYVAC-C	8 hpi
10	HEK 293T	----	4 hpi
11	MDDC	----	4 hpi
12	H ₂ O, Negativkontrolle		
13	β-actin-Plasmid (0,17 nM; 363 bp) Positivkontrolle		

Abbildung 3.3

Kontroll-PCR nach dem DNase-Verdau während der RNA-Isolation aus MDDCs und HEK 293T-Zellen unter Verwendung von TRI-REAGENT™

a)-c) In den Proben 2 bis 11 zeigte sich kein spezifisches DNA-Signal auf Höhe von 363 bp.

Als Positivkontrolle wurde ein β-actin-Plasmid (0,17 nM, 363 bp) eingesetzt, als Negativkontrolle nucleasereifes H₂O verwendet.

3.3.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung isolierter RNA zur Bestimmung der Ausgangsmenge für die reverse Transkription

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA erfolgte mittels Spektralphotometer. Dabei entsprechen 1,0 A_{260} Einheiten 40 μg ss RNA/ml. Somit errechnet sich die Konzentration aus folgender Formel:

$$c(\text{RNA}) = E \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor von 50. (Formel 3.1)}$$

Die ermittelten Extinktionen lagen bei etwa 0,1 bis 0,7. Diese Werte beziehen sich auf die RNA, die mittels TRI-REAGENTTM isoliert wurde. Mit der Formel 3.1. konnten für die verschiedenen Proben RNA-Konzentrationen von 200 bis 1500 $\mu\text{g/ml}$ berechnet werden. In die reverse Transkription wurden 2 μg beziehungsweise 1 μg RNA eingesetzt. Aus der ermittelten RNA-Konzentration und der gewünschten RNA-Menge lässt sich das benötigte RNA-Volumen nach folgender Formel errechnen:

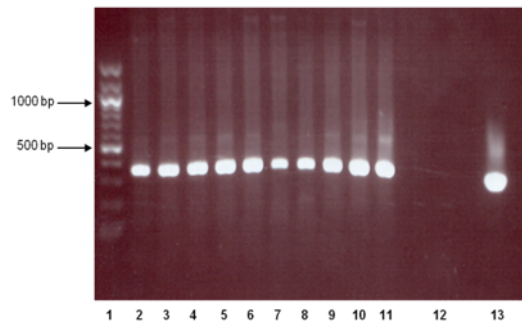
$$V(\text{RNA}) = n(\text{RNA}) \div c(\text{RNA}). \text{ (Formel 3.2)}$$

Das ermittelte und in die reverse Transkription eingesetzte Volumen lag zwischen 1 und 10 μl . Das Verhältnis A_{260}/A_{280} , das Rückschlüsse über die Reinheit der RNA erlaubt, beträgt bei Vorliegen reiner RNA idealerweise 1,8 bis 2,0. In dieser Arbeit ergaben sich Werte von 1,5 bis 1,8.

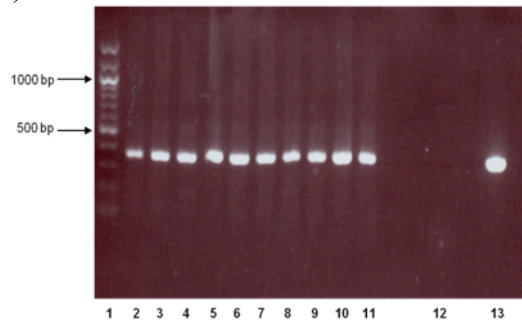
3.3.5 Reverse Transkription der mittels TRI-REAGENTTM isolierten RNA in cDNA

Die reverse Transkription der mittels TRI-REAGENTTM (Sigma-Aldrich[®]) isolierten RNA erfolgte wie in den vorherigen Versuchen (siehe 3.3.1 und 3.3.2) mit dem Super-ScriptTMIII First-Strand Synthesis System for RT-PCR von InvitrogenTM. Es wurden 2 μg RNA, bei einem Versuch aufgrund zu niedriger RNA-Konzentration 1 μg RNA, in die reverse Transkription eingesetzt. In der anschließenden Kontroll-PCR mit spezifischen β -actin-Primern zeigten sich im Vergleich zu den vorherigen Versuchen (siehe 3.3.1 und 3.3.2) starke spezifische DNA-Signale auf Höhe von 363 bp (Abb. 3.4 a-c, Probe 2 bis 11). Das wies auf eine suffiziente Ausgangsmenge an cDNA für die folgende LightCyclerTM-Analyse hin. Als Positivkontrolle wurde ein β -actin-Plasmid (0,17 nM, 363 bp), als Negativkontrolle H₂O verwendet.

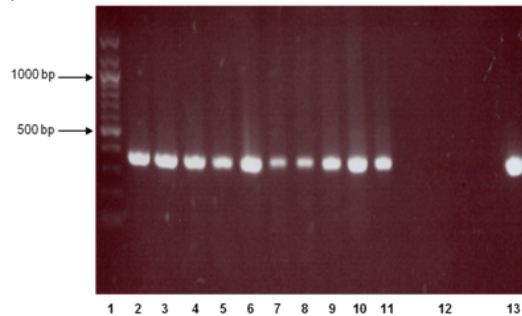
a)



b)



c)



Nr.	Zellen	Stimulans	Zeitpunkt der RNA-Isolation
1	Marker	-----	-----
2	HEK 293T	EHV-C	4 hpi
3	HEK 293T	NYVAC-C	4 hpi
4	MDDC	EHV-C	4 hpi
5	MDDC	NYVAC-C	4 hpi
6	HEK 293T	EHV-C	8 hpi
7	HEK 293T	NYVAC-C	8 hpi
8	MDDC	EHV-C	8 hpi
9	MDDC	NYVAC-C	8 hpi
10	HEK 293T	-----	4 hpi
11	MDDC	-----	4 hpi
12	H ₂ O, Negativkontrolle		
13	β-actin-Plasmid (0,17 nM; 363 bp) Positivkontrolle		

Abbildung 3.4

Kontroll-PCR nach reverser Transkription mittels TRI-REAGENT™ isolierter RNA in cDNA

a)-c) In den Proben 2 bis 11 konnten starke spezifische DNA-Signale auf Höhe von 363 bp nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle wurde ein β-actin-Plasmid (0,17 nM, 363 bp), als Negativkontrolle nucleasefreies H₂O verwendet.

3.3.6 Mittels LightCycler™ gewonnene Daten zur Bestimmung der relativen Quantifizierung früher und später Gene von EHV-C und NYVAC-C

Für vergleichende Aussagen über die Expression früher und später Gene von EHV-C und NYVAC-C, wurden diese mittels LightCycler™-Analyse und anschließender Verwendung der mathematischen Formel nach Pfaffl (siehe 2.5.3.5, Abb. 2.1) relativ quantifiziert. Hierzu wurden zunächst die jeweiligen Crossing Points der einzelnen Proben bestimmt.

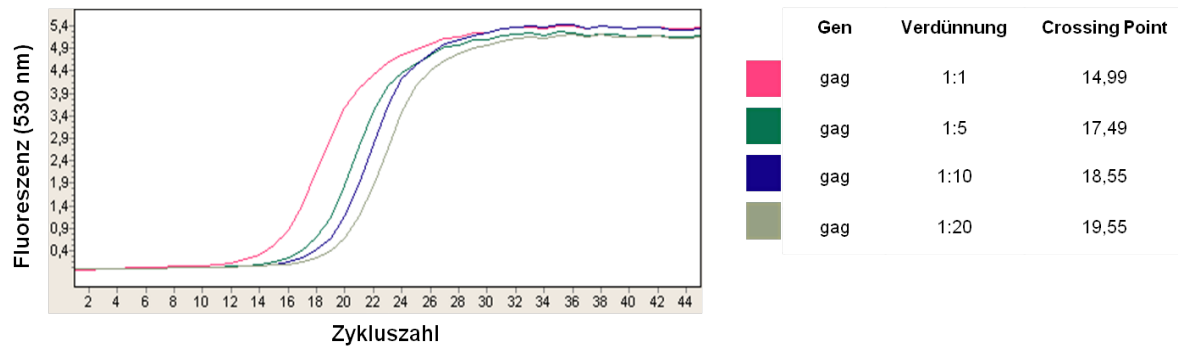
Aus den Crossing Points und den entsprechenden cDNA-Ausgangskonzentrationen ließen sich die PCR-Effizienzen bestimmen.

3.3.6.1 Bestimmung der Crossing Points der Gene gag, F17R und EICP0 während ihrer Amplifikation mittels LightCycler™ zur relativen Quantifizierung

Zur Ermittlung der Crossing Points wurde von den verschiedenen cDNA-Proben eine Verdünnungsreihe hergestellt. Die unterschiedlich verdünnten cDNA-Proben wurden mittels real-time PCR amplifiziert und die Crossing Points von der LightCycler™ Software 4.0 (Roche®) bestimmt. Der Crossing Point (CP) ist definiert als die Zykluszahl, bei der erstmals ein signifikantes Fluoreszenzsignal detektiert wird. Die Auswahl der Primer erfolgte in Abhängigkeit vom zu untersuchenden Genprodukt. Als Beispiel sind die Amplifikationskurven und ermittelten Crossing Points der Gene gag, F17R und EICP0 dargestellt.

Mittels real-time PCR wurden vier verschiedene Verdünnungsstufen des Gens gag amplifiziert und die jeweiligen CPs ermittelt. Die cDNA wurde mittels reverser Transkriptase aus der RNA hergestellt, die aus NYVAC-C infizierten MDDCs eines Spenders 4 hpi (Abb. 3.5 a) beziehungsweise 8 hpi (Abb. 3.5 b) isoliert wurde. Der CP der unverdünnten cDNA-Probe lag 4 hpi bei Zyklus 14,99 und 8 hpi bei Zyklus 15,22. Bei der 1:5 verdünnten cDNA-Probe befand sich der CP 4 hpi bei Zyklus 17,49 und 8 hpi bei Zyklus 17,65, bei einer 1:10 Verdünnung 4 hpi bei Zyklus 18,55 und 8 hpi bei Zyklus 18,74. Der CP der 1:20 verdünnten cDNA-Probe lag 4 hpi bei Zyklus 19,55 und 8 hpi bei Zyklus 19,73 (Abb. 3.5).

a)



b)

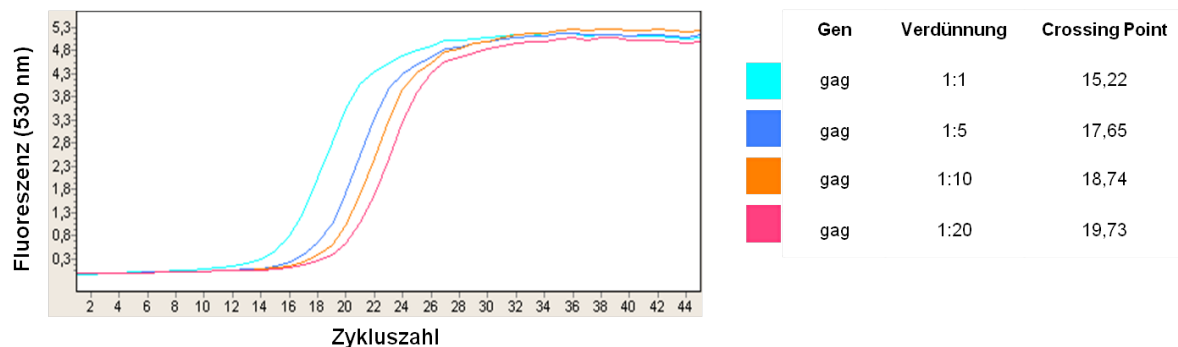


Abbildung 3.5

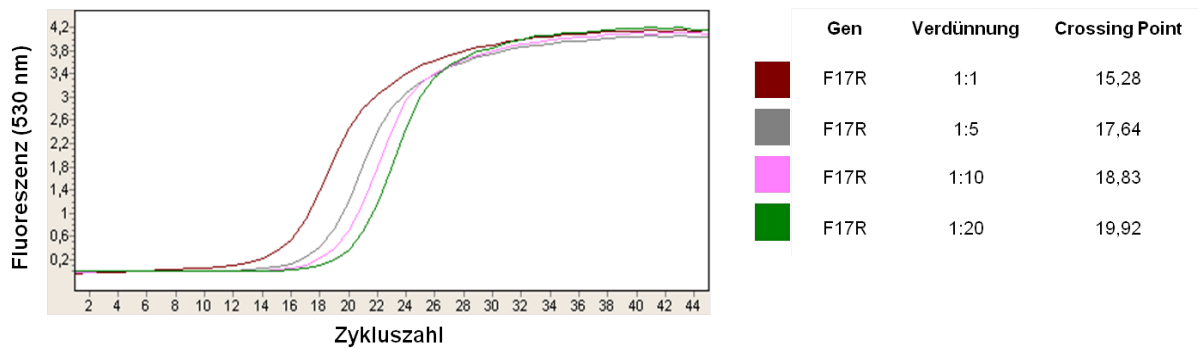
Amplifikationskurven der Verdünnungsreihe des Gens gag mit den jeweiligen Crossing Points

Die Amplifikationskurven der Verdünnungsstufen des Gens gag in der real-time PCR ist durch Auftragen des Fluoreszenzsignals (y-Achse) gegen die PCR-Zykluszahl (x-Achse) graphisch dargestellt. In der Tabelle ist der jeweilige Crossing Point aufgeführt. Die cDNA wurde mittels reverser Transkription aus RNA gewonnen, die aus NYVAC-C infizierten MDDCs eines Spenders a) 4 hpi und b) 8 hpi isoliert wurde.

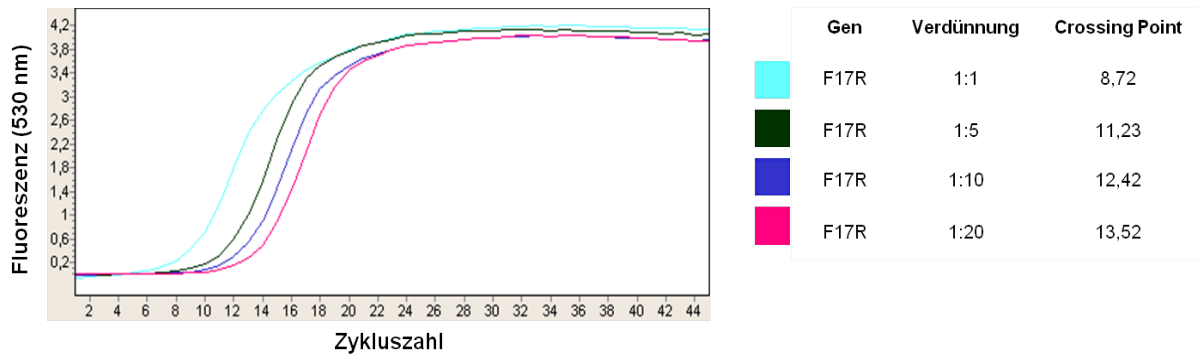
Nachfolgend sind die Amplifikationskurven der vier verschiedenen Verdünnungsstufen des Gens F17R sowie die ermittelten Crossing Points dargestellt (Abb. 3.6). Wurde die cDNA mittels reverser Transkription aus der RNA gewonnen, die aus NYVAC-C infizierten HEK 293T-Zellen 4 hpi (Abb. 3.6 a) und 8 hpi (Abb. 3.6 b) isoliert wurde, konnte für die unverdünnte cDNA-Probe 4 hpi ein CP bei Zyklus 15,28 und 8 hpi ein CP bei Zyklus 8,72 ermittelt werden. Bei der 1:5 verdünnten cDNA-Probe befand sich der CP 4 hpi bei Zyklus 17,64 und 8 hpi bei Zyklus 11,23, bei der 1:10 Verdünnung 4 hpi bei Zyklus 18,83 und 8 hpi bei Zyklus 12,42, bei der 1:20 Verdünnung 4 hpi bei Zyklus 19,92 und 8 hpi bei Zyklus 13,52 (Abb. 3.6 a, b).

Der CP der unverdünnten cDNA, die mittels reverser Transkriptase aus RNA von NYVAC-C infizierten MDDCs 4 hpi (Abb. 3.6 c) und 8 hpi (Abb. 3.6 d) gewonnen wurde, lag 4 hpi bei Zyklus 15,96 und 8 hpi bei Zyklus 16,08. Für die 1:5 verdünnte cDNA-Probe konnte der CP 4 hpi bei Zyklus 18,45 und 8 hpi bei Zyklus 18,66 ermittelt werden. Für die 1:10 Verdünnung ergab sich der CP 4 hpi bei Zyklus 19,56 und 8 hpi bei Zyklus 19,8, für die 1:20 Verdünnung 4 hpi bei Zyklus 20,67 und 8 hpi bei Zyklus 20,81 (Abb. 3.6 c, d).

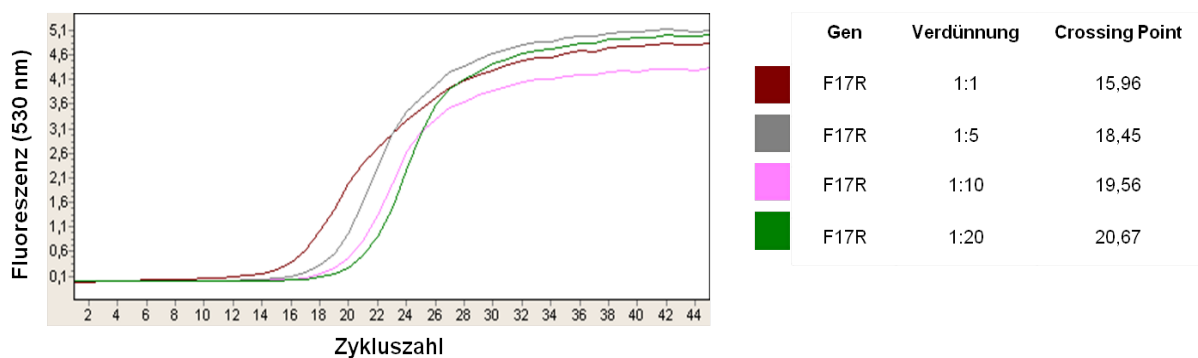
a)



b)



c)



d)

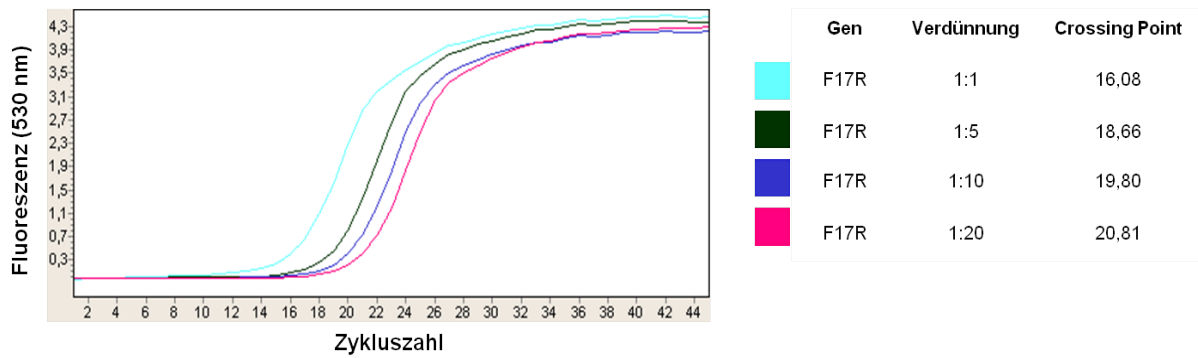


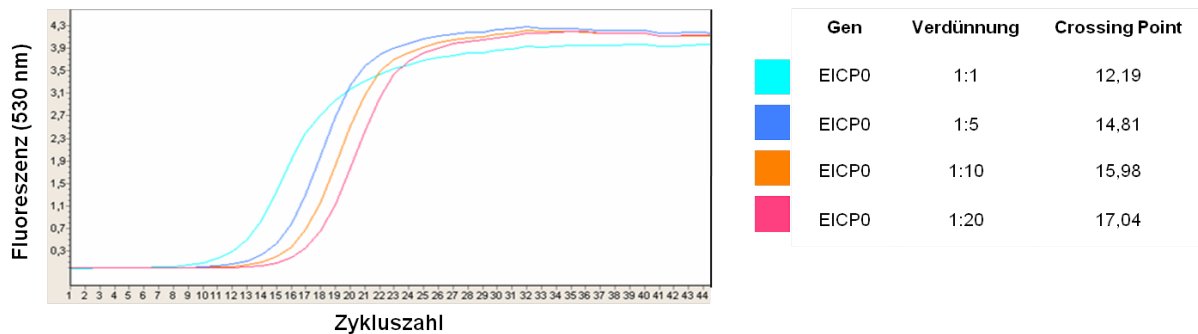
Abbildung 3.6

Amplifikationskurven der Verdünnungsreihe des Gens F17R mit den jeweiligen Crossing Points

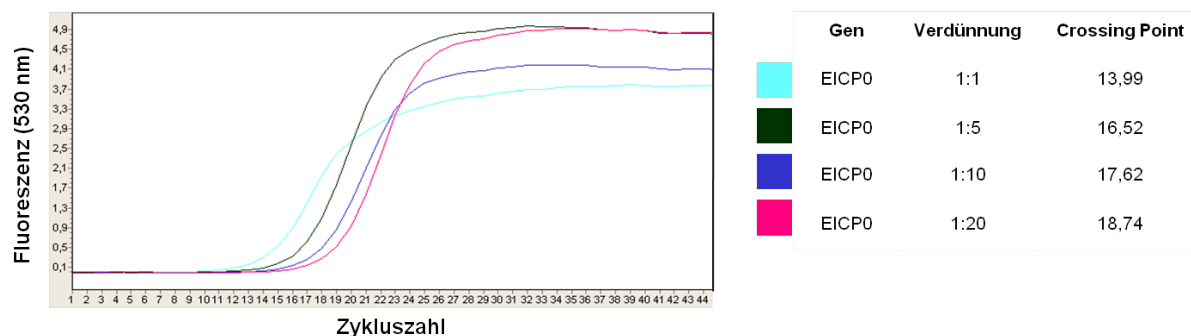
Die verdünnten cDNA-Proben wurden mittels real-time PCR amplifiziert und die Fluoreszenzentwicklung (y-Achse) gegen die PCR-Zykluszahl (x-Achse) aufgetragen. In der Tabelle ist der jeweilige Crossing Point aufgeführt. Die cDNA wurde mittels reverser Transkriptase aus RNA hergestellt, die aus NYVAC-C infizierten HEK 293T-Zellen a) 4 hpi und b) 8 hpi sowie aus NYVAC-C infizierten MDDCs eines Spenders c) 4 hpi und d) 8 hpi isoliert wurde.

Die unterschiedlich verdünnten cDNA-Proben für die Amplifikation des Gens EICP0 wurden aus der RNA gewonnen, die aus EHV-C infizierten MDDCs 4 hpi (Abb. 3.7 a) beziehungsweise 8 hpi (Abb. 3.7 b) Stunden isoliert wurde. Für die unverdünnte cDNA-Probe konnte der CP 4 hpi bei Zyklus 12,19 und 8 hpi bei Zyklus 13,99 erhoben werden. Bei der 1:5 verdünnten Probe ergab sich der CP 4 hpi bei Zyklus 14,81 und 8 hpi bei Zyklus 16,52. Der CP der 1:10 verdünnten cDNA-Pobe lag 4 hpi bei Zyklus 15,98 und 8 hpi bei Zyklus 17,62, der CP der 1:20 Verdünnung 4 hpi bei Zyklus 17,04 und 8 hpi bei Zyklus 18,74 (Abb. 3.7).

a)



b)

**Abbildung 3.7****Amplifikationskurven der Verdünnungsreihe des Gens EICP0 mit den jeweiligen Crossing Points**

Die Amplifikation der unterschiedlich verdünnten cDNA-Probe ist durch Auftragen des Fluoreszenzsignals (y-Achse) gegen die Zykluszahl (x-Achse) graphisch dargestellt. Die ermittelten Crossing Points sind in der Tabelle aufgeführt. Die cDNA wurde mittels reverser Transkription aus der RNA hergestellt, die aus EHV-C infizierten MDDCs eines Spenders a) 4 hpi beziehungsweise b) 8 hpi Stunden isoliert wurde.

3.3.6.2 Ermitteln der PCR-Effizienzen aus den Crossing Points und den cDNA-Konzentrationen zur relativen Quantifizierung

Verdoppelt man die cDNA in jedem Zyklus der exponentiellen Phase der real-time PCR, so ergibt sich eine optimale PCR-Effizienz ($E=2$). Da diese Effizienz jedoch nur im Idealfall erreicht wird, muss man sie nach jedem PCR-Lauf bestimmen. Bereits geringe Unterschiede in der Effizienz haben großen Einfluß auf die ermittelte Genexpression. Bei der relativen Quantifizierung nach der Formel nach Pfaffl (siehe 2.5.3.5, Abb. 2.1) werden diese Effizienzunterschiede mitberücksichtigt.⁴⁸

Zur Bestimmung der PCR-Effizienz wurden zunächst die logarithmischen Ausgangskonzentrationen der unterschiedlich verdünnten cDNA-Proben, berechnet mittels LightCycler™ Software 4.0 (Roche®), gegen die jeweiligen Crossing Points aufgetragen. Nach der Erstellung einer Regressionsgeraden konnte aus deren negativer Steigung die Effizienz der PCR von der LightCycler™ Software 4.0 nach folgender Formel berechnet werden:

$$E = 10^{-1/\text{Steigung}} \text{ (Formel 3.3)}$$

Beispielhaft wurde die Regressionsgerade oder Standardkurve des Gens gag aus NYVAC-C infizierten MDDCs dargestellt, deren RNA 4 hpi isoliert wurde. Die logarithmischen cDNA-Ausgangskonzentrationen der Verdünnungsreihe des Gens gag (Abb. 3.5 a) wurden gegen die

entsprechenden Crossing Points aufgetragen. Aus der negativen Steigung der Geraden ergab sich eine PCR-Effizienz von 1,9, die nahe am Optimalwert von 2 liegt (Abb. 3.8).

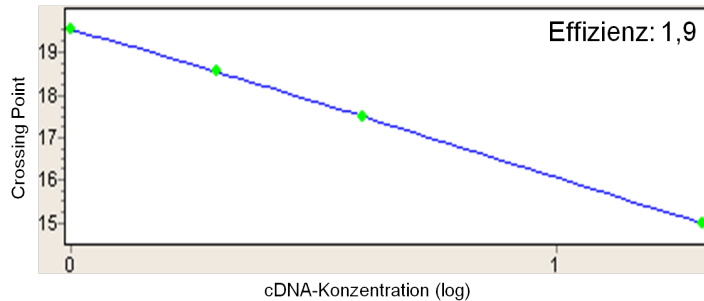


Abbildung 3.8

Standardkurve aus den logarithmischen cDNA-Ausgangskonzentrationen der Verdünnungsreihe des Gens gag (x-Achse) und den jeweiligen Crossing Points (y-Achse) zur Ermittlung der PCR-Effizienz

Aus der negativen Steigung der Geraden konnte die PCR-Effizienz von der LightCycler™ Software 4.0 (Roche®) nach der Formel $E = 10^{-1/\text{Steigung}}$ berechnet werden. Die ermittelte Effizienz lag bei 1,9. Die cDNA des Gens gag wurde mittels reverser Transkriptase aus der RNA gewonnen, die aus NYVAC-C infizierten MDDCs 4 hpi isoliert wurde.

In der folgenden Tabelle sind die von der LightCycler™ Software 4.0 ermittelten PCR-Effizienzen aufgeführt, die sich aus den Standardkurven der Gene gag, F17R und EICP0 von EHV-C beziehungsweise NYVAC-C infizierten MDDCs und HEK 293T-Zellen 4 hpi und 8 hpi ableiteten. Für die Amplifikation des Gens gag NYVAC-C infizierter MDDCs 4 hpi beziehungsweise 8 hpi ergab sich eine PCR-Effizienz von 1,9 beziehungsweise 1,93. Die PCR-Effizienz für die Amplifikation des Gens F17R von NYVAC-C infizierten HEK 293T-Zellen 4 hpi beziehungsweise 8 hpi lag bei 1,94 beziehungsweise 1,87. Bei NYVAC-C infizierten MDDCs konnte für das amplifizierte Gen F17R 4 hpi beziehungsweise 8 hpi eine PCR-Effizienz von 1,91 beziehungsweise 1,86 ermittelt werden. Die PCR-Effizienz des amplifizierten Gens EICP0 von EHV-C infizierten MDDCs 4 hpi beziehungsweise 8 hpi betrug 1,84 beziehungsweise 1,89 (Tab. 3.2). Die jeweiligen PCR-Effizienzen liegen nahe am Optimalwert.

Tabelle 3.2

PCR-Effizienzen ermittelt aus den jeweiligen Standardkurven der Gene gag, F17 R und EICP0 aus EHV-C und NYVAC-C infizierten MDDCs und HEK 293T-Zellen 4 hpi und 8 hpi

Genprodukt	Stimulans	Zellen	Zeitpunkt der RNA-Isolation	PCR-Effizienz
gag	NYVAC-C	MDDC	4 hpi	1,9
gag	NYVAC-C	MDDC	8 hpi	1,93
F17R	NYVAC-C	HEK 293T	4 hpi	1,94
F17R	NYVAC-C	HEK 293T	8 hpi	1,87
F17R	NYVAC-C	MDDC	4 hpi	1,91
F17R	NYVAC-C	MDDC	8 hpi	1,86
EICP0	EHV-C	MDDC	4 hpi	1,84
EICP0	EHV-C	MDDC	8 hpi	1,89

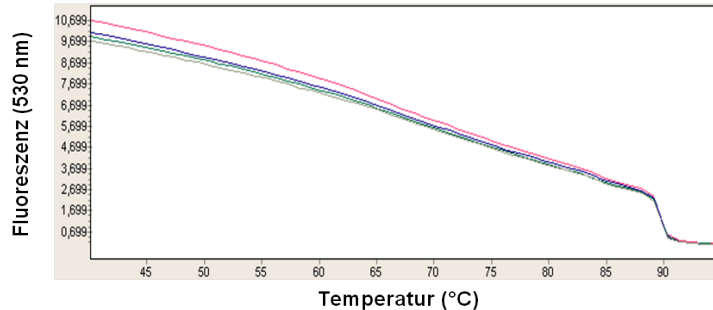
3.3.6.3 Exemplarische Darstellung der Schmelzkurven von amplifizierten Genprodukten infizierter MDDCs und HEK 293T-Zellen anhand des Gens gag und daraus ermittelte Schmelzpunkte

Um sicherzustellen, dass während der PCR das gewünschte PCR-Produkt vervielfältigt wurde, musste aus diesem die Schmelzkurve mit dem daraus ermittelten Schmelzpunkt bestimmt werden. Da jedes PCR-Produkt in der Regel einen spezifischen Schmelzpunkt besitzt, lässt es sich eindeutig zuordnen. Abweichungen vom Schmelzpunkt deuten auf ein unspezifisch vervielfältigtes PCR-Produkt hin.

Exemplarisch sind die Schmelzkurven (Abb. 3.9 a) und Schmelzpunkte (Abb. 3.9 b) des amplifizierten Gens gag NYVAC-C infizierter MDDCs, deren RNA 4 hpi isoliert wurde, in den unterschiedlichen Verdünnungsstufen dargestellt. Am Ende der Amplifikationsphase kam es bei kontinuierlichem Temperaturanstieg von 40 °C bis 95 °C in den Kapillaren des PCR-Produkts zu einer Abnahme des Fluoreszenzsignals und einem plötzlichen signifikanten Fluoreszenzabfall bei etwa 90 °C (Abb. 3.9 a). Aus der ersten Ableitung dieser Daten ermittelte die LightCycler™ Software 4.0 (Roche®) für alle PCR-Produkte des Gens gag in unterschiedlicher Ausgangskonzentration den gleichen Schmelzpunkt von etwa 89,9 °C. Bei der unverdünnten cDNA-Probe lag der Schmelzpunkt des PCR-Produkts bei 89,85 °C, bei der 1:5 Verdünnung bei 89,92 °C. Bei der 1:10 verdünnten cDNA-Probe ergab sich ein

Schmelzpunkt des PCR-Produkts von 89,88 °C, bei der 1:20 Verdünnung ein Schmelzpunkt des PCR-Produkts von 89,83 °C (Abb. 3.9 b).

a)



b)

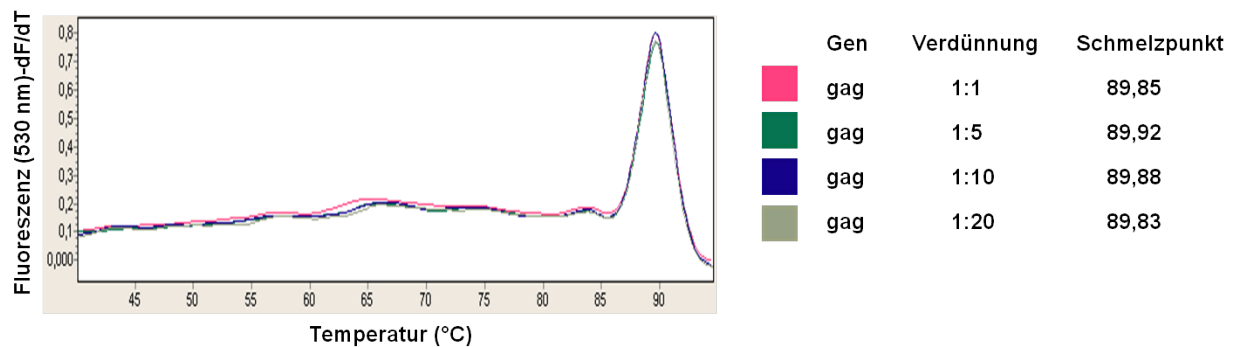


Abbildung 3.9

Schmelzkurven (a) und Schmelzpunkte (b) des amplifizierten Gens gag in unterschiedlicher Ausgangskonzentration

a) Das Fluoreszenzsignal (y-Achse) des PCR-Produktes nahm bei kontinuierlicher Temperaturzunahme von 40°C bis 95°C (x-Achse) am Ende der Amplifikationsphase ab. Bei etwa 90 °C zeigte sich ein signifikanter Fluoreszenzabfall.

b) Der Schmelzpunkt von etwa 89,9 °C für alle PCR-Produkte in unterschiedlicher Ausgangskonzentration ergab sich aus der ersten Ableitung der ermittelten Daten des plötzlichen Fluoreszenzabfalls aufgetragen gegen die Temperatur.

Dargestellt ist das Gen gag aus NYVAC-C infizierten MDDCS, deren RNA 4 hpi isoliert wurde.

3.3.7 Nachweis und Vergleich der Expression früher und später Gene mittels relativer Quantifizierung

Die Formel nach Pfaffl (siehe 2.5.3.5, Abb.2.1) ermöglichte es, aus den ermittelten PCR-Effizienzen und den Crossing Points die sogenannte Ratio zu berechnen. Darunter versteht man das Verhältnis der Expression eines Zielgens zu einem Kontrollgen, normalisiert auf die Expression des Referenzgens β -actin. Als Kontrollgen wurde jeweils das Gen verwendet, bei dem die höchste Expression in Bezug auf Zellart und Expressionszeitpunkt zu erwarten war.

Mit der Methode der relativen Quantifizierung lassen sich die jeweiligen Zielgene hinsichtlich ihrer Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion in unterschiedlichen Zellarten miteinander vergleichen.

3.3.7.1 Expression der frühen Gene IE und EICP0 und des späten Gens gpD von EHV-C

Nach der Infektion mit EHV-C wurde die Expression früher und später Gene 4 hpi und 8 hpi in HEK 293T-Zellen und MDDCs mittels real-time PCR und relativer Quantifizierung untersucht. Das erlaubte, eine stattgefunden Transkription der Gene in MDDCs nachzuweisen und eine vergleichende Aussage bezüglich der Genexpression in HEK 293T-Zellen zu treffen. Die Daten beziehen sich auf Untersuchungen an drei verschiedenen Probanden.

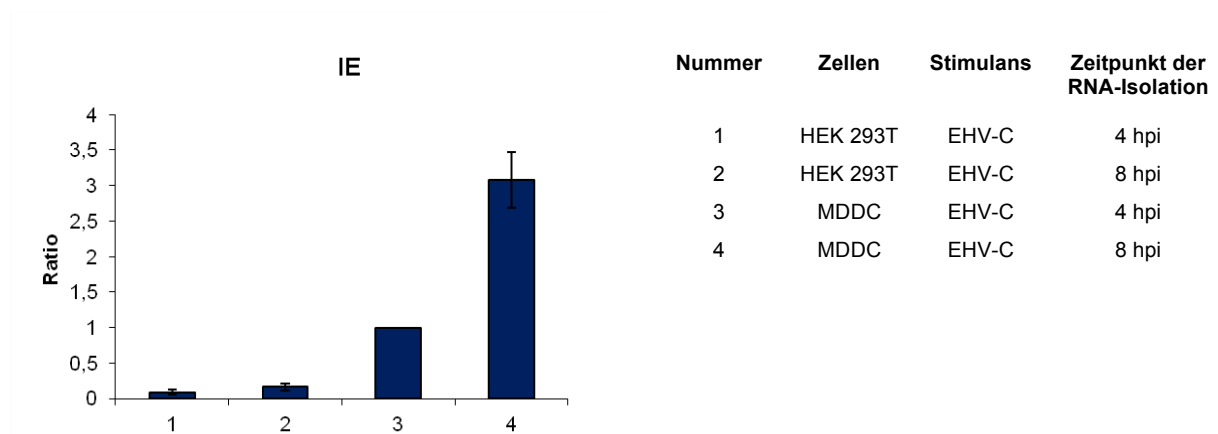
Für das frühe Gen IE konnte in MDDCs 4 hpi eine Ratio von 1 und 8 hpi eine Ratio im Mittel von 3,08 errechnet werden. In HEK 293T-Zellen ergab sich 4 hpi eine Ratio im Mittel von 0,09 und 8 hpi von 0,16. Als Kontrollgen wurde IE 4 hpi in MDDCs verwendet.

Für das frühe Gen EICP0 wurde in MDDCs 4 hpi eine Ratio von 1 und 8 hpi eine Ratio im Mittel von 1,9 bestimmt. In HEK 293T-Zellen ließ sich 4 hpi eine Ratio im Mittel von 0,01 und 8 hpi von 0,08 berechnen. Als Kontrollgen wurde in MDDCs exprimiertes EICP0 4 hpi eingesetzt.

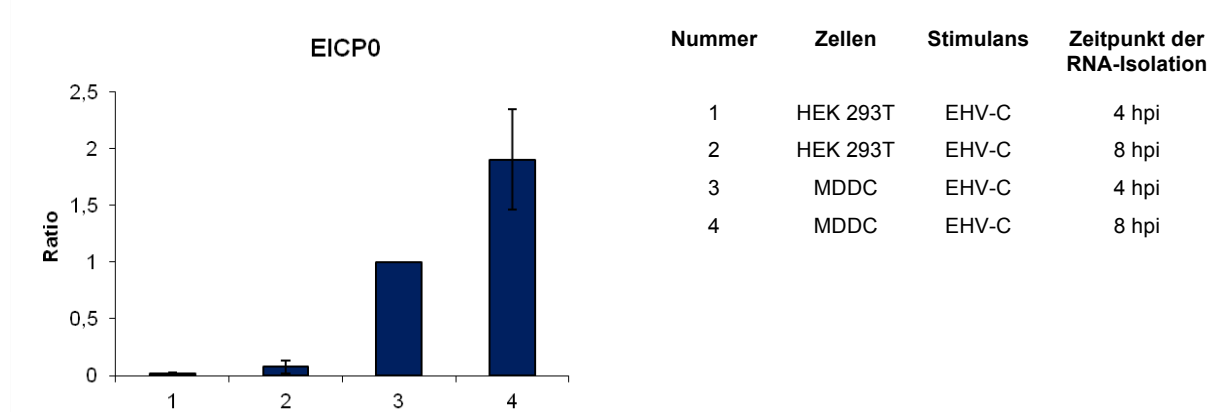
Für das späte Gen gpD ergab sich in MDDCs 4 hpi eine Ratio im Mittel von 2,85 und 8 hpi eine Ratio im Mittel von 146,99. In HEK 293T-Zellen wurde 4 hpi eine Ratio im Mittel von 0,17 und 8 hpi eine Ratio von 1 ermittelt. Als Kontrollgen diente gpD, das 8 hpi in HEK 293T-Zellen exprimiert wurde.

Insgesamt wurden die frühen Gene IE und EICP0 von EHV-C in MDDCs stärker als in HEK 293T-Zellen exprimiert. Die Expression von IE war am stärksten in MDDCs 8 hpi, etwa dreimal höher als 4 hpi. EICP0 wurde in MDDCs 8 hpi etwa doppelt so stark exprimiert wie 4 hpi. Das späte Gen gpD von EHV-C wurde in MDDCs deutlich mehr exprimiert als in HEK 293T-Zellen. Die Expression war am höchsten in MDDCs 8 hpi.

a)



b)



c)

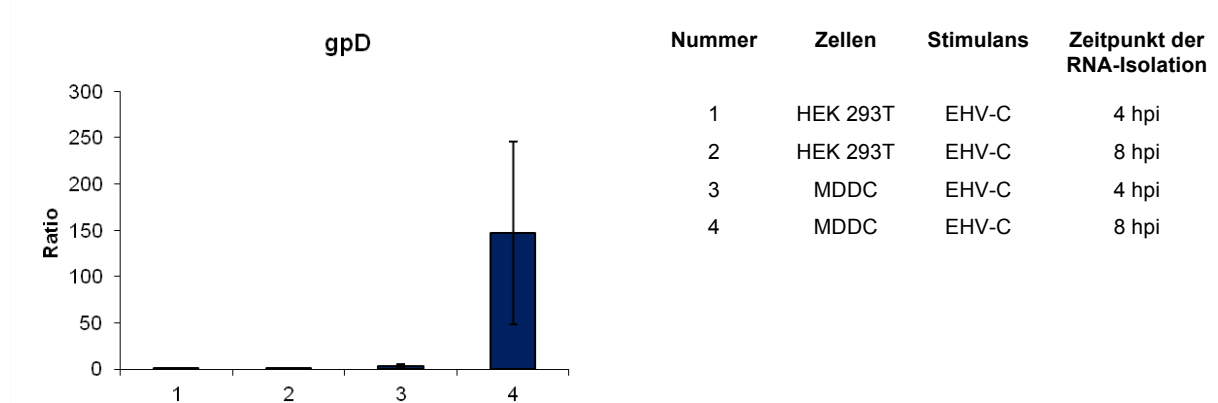


Abbildung 3.10

Expression früher (IE, EICP0) und später Gene (gpD) von EHV-C nach Infektion von HEK 293T-Zellen und MDDCs 4 hpi und 8 hpi

Nach Infektion mit EHV-C wurden die frühen Gene IE und EICP0 und auch das späte Gen gpD in MDDCs gebildet. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte von drei verschiedenen Probanden. Die Ratio wurde mit der Formel nach Pfaffl (Abb. 2.1) zur relativen Quantifizierung der Genexpression berechnet.

a) Das frühe Gen IE wurde in MDDCs stärker als in HEK 293T-Zellen exprimiert, am stärksten in MDDCs 8 hpi.

b) Das frühe Gen EICP0 wurde wie das frühe Gen IE in MDDCs stärker exprimiert als in HEK 293T-Zellen, am stärksten in MDDCs 8 hpi.

c) Das späte Gen gpD wurde in MDDCs 8 hpi am stärksten exprimiert.

3.3.7.2 Expression des frühen Gens E3L und des späten Gens F17R von NYVAC-C

Mittels LightCycler™-Analyse und der Formel nach Pfaffl (2.5.3.5, Abb. 2.1) wurde die Expression des frühen Gens E3L und des späten Gens F17R von NYVAC-C in HEK 293T-Zellen und MDDCs relativ quantifiziert. So ließ sich die erfolgte Transkription der Gene in MDDCs bestimmen und mit der Genexpression in HEK 293T-Zellen vergleichen. Es wurden Daten von drei verschiedenen Probanden erhoben.

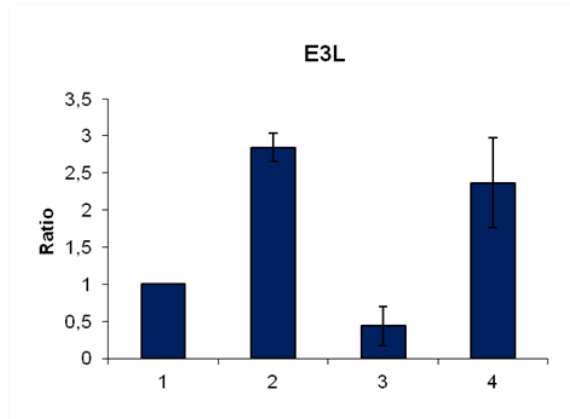
Für das frühe Gen E3L wurde in MDDCs 4 hpi eine Ratio im Mittel von 0,44 und 8 hpi eine Ratio im Mittel von 2,37 berechnet. In HEK 293T-Zellen konnte 4 hpi eine Ratio von 1 und 8 hpi eine Ratio im Mittel von 2,84 bestimmt werden. Als Kontrollgen diente in HEK 293T-Zellen exprimiertes E3L 4 hpi.

Die Ratio im Mittel für das späte Gen F17R in MDDCs 4 hpi lag bei 0 und 8 hpi bei 0,03. In HEK 293T-Zellen konnte 4 hpi eine Ratio im Mittel von 0,01 und 8 hpi eine Ratio von 1 errechnet werden. Als Kontrollgen wurde F17R in HEK 293T-Zellen 8 hpi verwendet.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das frühe Gen E3L von NYVAC-C sowohl in HEK 293T-Zellen als auch in MDDCs exprimiert wurde, 8 hpi etwa zwei- bis dreifach stärker als 4 hpi. Die Expression war in HEK 293T-Zellen etwas höher als in MDDCs.

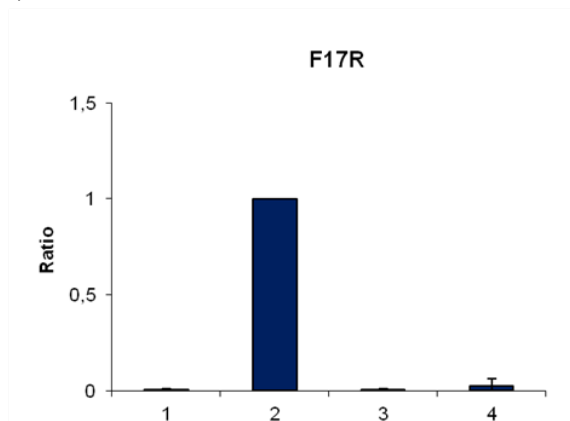
Dagegen wurde das späte Gen F17R in MDDCs kaum exprimiert. Die stärkste Genexpression zeigte sich in HEK 293T-Zellen 8 hpi.

a)



Nummer	Zellen	Stimulans	Zeitpunkt der RNA-Isolation
1	HEK 293T	NYVAC-C	4 hpi
2	HEK 293T	NYVAC-C	8 hpi
3	MDDC	NYVAC-C	4 hpi
4	MDDC	NYVAC-C	8 hpi

b)



Nummer	Zellen	Stimulans	Zeitpunkt der RNA-Isolation
1	HEK 293T	NYVAC-C	4 hpi
2	HEK 293T	NYVAC-C	8 hpi
3	MDDC	NYVAC-C	4 hpi
4	MDDC	NYVAC-C	8 hpi

Abbildung 3.11

Expression des frühen Gens E3L und des späten Gens F17R von NYVAC-C nach Infektion von HEK 293T-Zellen und MDDCs 4 hpi und 8 hpi

Während das frühe Gen E3L in HEK 293T-Zellen und MDDCs exprimiert wurde, zeigte sich bei dem späten Gen F17R in MDDCs eine kaum nachweisbare Expression. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte von drei verschiedenen Probanden. Die Ratio wurde mit der Formel nach Pfaffl (Abb. 2.1) zur relativen Quantifizierung der Genexpression berechnet.

a) Das frühe Gen E3L wurde in HEK 293T-Zellen etwas stärker exprimiert als in MDDCs, am höchsten in HEK 293T-Zellen 8 hpi.

b) Das späte Gen F17R zeigte in HEK 293T-Zellen 8 hpi die höchste Expression.

3.3.7.3 Expression des Gens gag von HIV kodiert von EHV-C und NYVAC-C

Die Expression des Gens gag von HIV-1, kodiert von EHV-C und NYVAC-C in HEK 293T-Zellen und MDDCs, wurde mittels real time-PCR und der Formel nach Pfaffl (2.5.3.5, Abb. 2.1) relativ quantifiziert. So war die RNA-Synthese in MDDCs zu ermitteln und ein Vergleich zur Genexpression in HEK 293T-Zellen zu ziehen. Untersucht wurde die Genexpression von zwei verschiedenen Probanden.

Für gag kodiert von EHV-C ergab sich in MDDCs 4 hpi eine Ratio im Mittel von 0,05 und 8 hpi von 0,52. Für die Expression von gag kodiert von NYVAC-C zeigte sich in MDDCs 4 hpi eine Ratio im Mittel von 0,05 und 8 hpi von 0,11.

In HEK 293T-Zellen wurde für gag kodiert von EHV-C 4 hpi eine Ratio im Mittel von 0 und 8 hpi von 0,04 ermittelt. Wurde gag von NYVAC-C kodiert konnte in HEK 293T-Zellen 4 hpi eine Ratio im Mittel von 0,05 und 8 hpi eine Ratio von 1 bestimmt werden.

Als Kontrollgen wurde gag, kodiert von NYVAC-C, verwendet, das in HEK 293T-Zellen 8 hpi exprimiert wurde.

Insgesamt wurde das Gen gag, kodiert von EHV-C, in MDDCs 8 hpi stärker exprimiert als gag, kodiert von NYVAC-C. 4 hpi konnte in EHV-C und NYVAC-C infizierten MDDCs nur eine sehr geringe gag-Expression detektiert werden. In EHV-C infizierten HEK 293T-Zellen war die Expression des Gens gag 4 hpi und 8 hpi kaum nachweisbar. Die höchste Gag-Expression zeigte sich in NYVAC-C infizierten HEK 293T-Zellen 8 hpi.

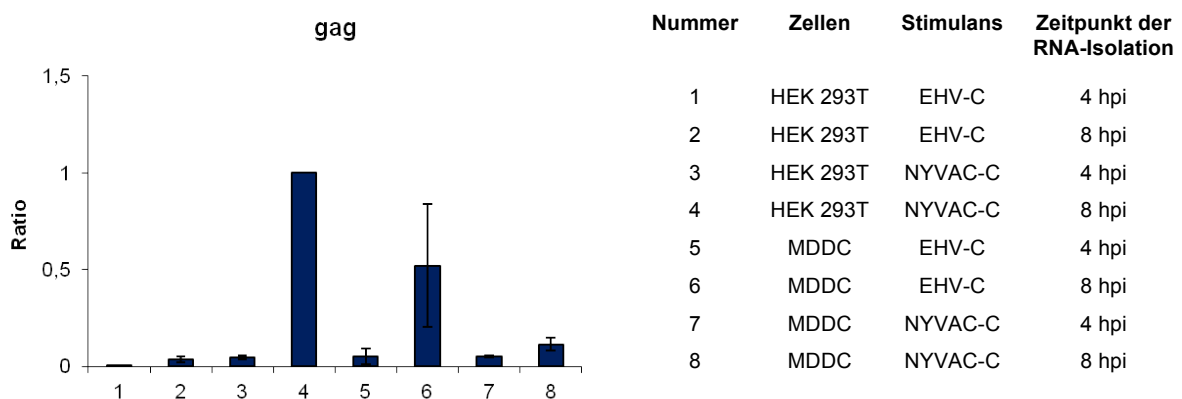


Abbildung 3.12

Expression des HIV-Antigens gag in EHV-C und NYVAC-C infizierten HEK 293T-Zellen und MDDCs 4 hpi und 8 hpi

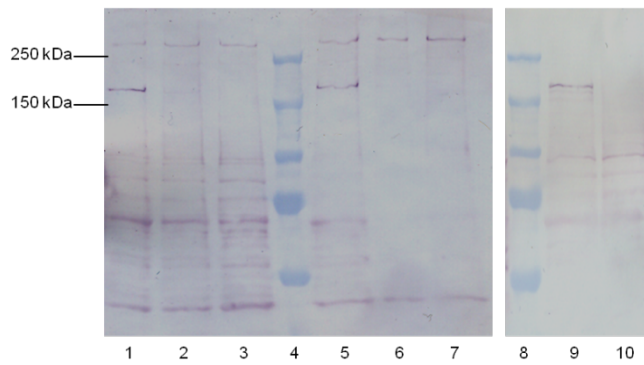
Das Gen gag, kodiert von EHV-C, wurde in MDDCs 8 hpi stärker exprimiert als gag, kodiert von NYVAC-C. Die höchste Expression zeigte sich in NYVAC-C infizierten HEK 293T-Zellen 8 hpi. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von zwei verschiedenen Probanden. Zur relativen Quantifizierung der Genexpression wurde die Ratio mit der Formel nach Pfaffl (Abb. 2.1) berechnet.

3.4 Nachweis der Bildung des GagPolNef-Polyproteins von HIV in EHV-C und NYVAC-C infizierten MDDCs mittels Western-Blot-Analyse

Zum Nachweis der Biosynthese des GagPolNef (GPN)-Polyproteins von HIV-1 in EHV-C und NYVAC-C infizierten MDDCs diente die Western-Blot-Analyse. Dazu wurden jeweils $1 \cdot 10^6$ immature MDDCs mit EHV-C oder NYVAC-C mit einer MOI von 10 infiziert und 4 hpi beziehungsweise 8 hpi geerntet. Anschließend ließ sich die Bildung des GPN-Polyproteins mittels Western-Blot bestimmen. In den als Positivkontrollen eingesetzten EHV-C infizierten RK13-Zellen sowie NYVAC-C und EHV-C infizierten HEK 293T-Zellen wurde das GPN-Polyprotein gebildet. Auf Höhe von 160 kDa zeigte sich das GPN-Signal. Nicht infizierte MDDCs, RK13-Zellen und HEK 293T-Zellen ergaben als Negativkontrollen keine spezifischen GPN-Signale.

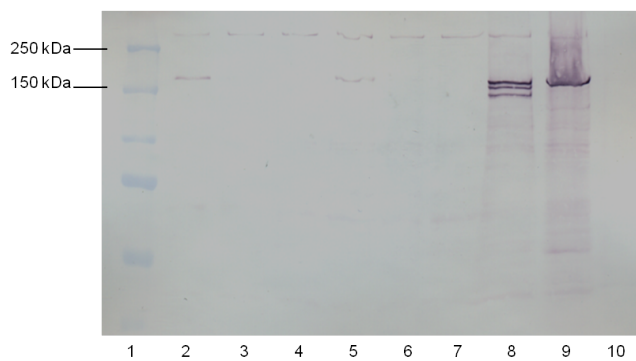
In EHV-C infizierten MDDCs bildete sich das GPN-Polyprotein sowohl 4 hpi als auch 8 hpi. In NYVAC-C infizierten MDDCs hingegen war weder 4 hpi noch 8 hpi eine GPN-Synthese nachzuweisen. (Abb. 3.13 a-c)

a)



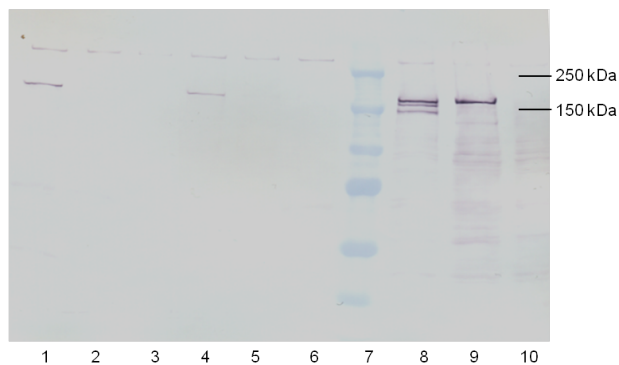
Nummer	Zellen	Stimulans	Zeitpunkt der Proteinanalyse
1	MDDC	EHV-C	4 hpi
2	MDDC	NYVAC-C	4 hpi
3	MDDC	----	----
4	Marker	----	----
5	MDDC	EHV-C	8 hpi
6	MDDC	NYVAC-C	8 hpi
7	MDDC	----	----
8	Marker	----	----
9	HEK 293T	EHV-C	4 hpi
10	HEK 293T	----	----

b)



Nummer	Zellen	Stimulans	Zeitpunkt der Proteinanalyse
1	Marker	----	----
2	MDDC	EHV-C	4 hpi
3	MDDC	NYVAC-C	4 hpi
4	MDDC	----	----
5	MDDC	EHV-C	8 hpi
6	MDDC	NYVAC-C	8 hpi
7	MDDC	----	----
8	RK13	EHV-C	4 hpi
9	HEK 293T	NYVAC-C	4 hpi
10	RK13	----	----

c)



Nummer	Zellen	Stimulans	Zeitpunkt der Proteinanalyse
1	MDDC	EHV-C	4 hpi
2	MDDC	NYVAC-C	4 hpi
3	MDDC	----	----
4	MDDC	EHV-C	8 hpi
5	MDDC	NYVAC-C	8 hpi
6	MDDC	----	----
7	Marker	----	----
8	RK13	EHV-C	4 hpi
9	HEK 293T	NYVAC-C	4 hpi
10	HEK 293T	----	----

Abbildung 3.13

Western-Blot-Analyse zum Nachweis der Bildung des HIV-1-Polyproteins GagPolNef in EHV-C und NYVAC-C infizierten MDDCs

$1 \cdot 10^6$ immature MDDCs wurden mit EHV-C oder NYVAC-C mit einer MOI von 10 infiziert. 4 hpi beziehungsweise 8 hpi wurde die Bildung des GagPolNef-Polyproteins bestimmt. Als Positivkontrollen dienen EHV-C infizierte RK13-Zellen sowie NYVAC-C und EHV-C infizierte HEK 293T-Zellen, als Negativkontrollen nicht infizierte MDDCs, RK13-Zellen und HEK 293T-Zellen.

a) In EHV-C infizierten MDDCs (Probe 1,5) zeigte sich im Gegensatz zu NYVAC-C infizierten MDDCs (Probe 2,6) 4 hpi und 8 hpi ein spezifisches GPN-Signal auf Höhe von 160 kDa.

b) Im Gegensatz zu NYVAC-C infizierten MDDCs (Probe 3,6) konnte in EHV-C infizierten MDDCs (Probe 2,5) ein GPN-Signal auf Höhe von 160 kDa dargestellt werden.

c) In EHV-C infizierten MDDCs (Probe 1,4) wurde im Vergleich zu NYVAC-C infizierten MDDCs (Probe 2,5) auf Höhe von 160 kDa ein spezifisches GPN-Signal nachgewiesen.

3.5 Nachweis der Infektion von HEK 293T-Zellen und MDDCs mittels Farbstoff markiertem EHV-C und NYVAC-C

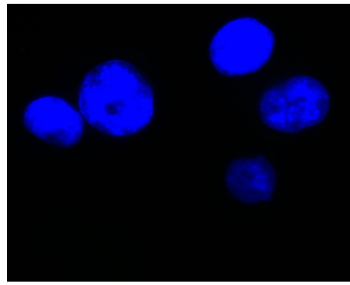
In den folgenden Versuchen wurde die Infektion von HEK 293T-Zellen und MDDCs mit Farbstoff markiertem EHV-C und NYVAC-C mittels direkter fluoreszenzmikroskopischer Darstellung sowie mittels FACS-Analyse untersucht.

3.5.1 Nachweis der Infektion mittels fluoreszenzmikroskopischer Analysen

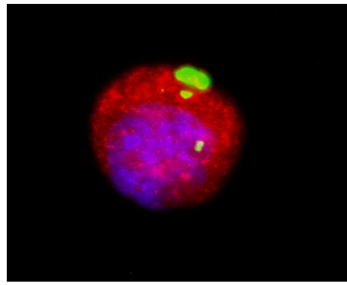
Zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung der Infektion von HEK 293T-Zellen und MDDCs mit EHV-C und NYVAC-C wurden die Zellen mit CFDA-SE markierten Viren infiziert. Nach Aufnahme in die Zellen entsteht unter Abspaltung der Acetatgruppen aus CFDA-SE ein unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbarer grün fluoreszierender Farbstoff.

Wurden HEK 293T-Zellen und MDDCs mit Farbstoff markiertem EHV-C infiziert, zeigte sich ein grünes Fluoreszenzsignal (Abb. 3.14). Für Farbstoff markiertes NYVAC-C ließ sich hingegen nach Infektion von HEK 293T-Zellen und MDDCs kein wesentliches Fluoreszenzsignal nachweisen.

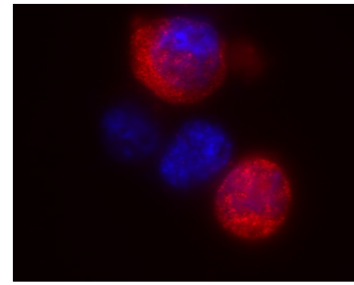
Desweiteren erfolgte nach Infektion der Zellen mit EHV-C und NYVAC-C eine intrazelluläre Färbung des gebildeten GPN-Proteins, das sich fluoreszenzmikroskopisch als rotes Signal darstellt (Abb. 3.14). In HEK 293T-Zellen induzierten sowohl EHV-C als auch NYVAC-C eine GPN-Bildung. In MDDCs war die GPN-Synthese weder nach Infektion mit EHV-C noch mit NYVAC-C fluoreszenzmikroskopisch nachweisbar.



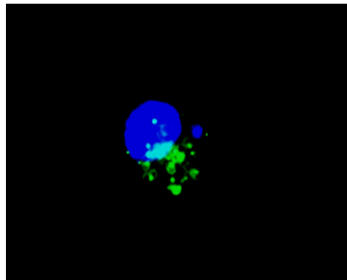
DAPI gefärbte HEK 293T- Zellen (600 x)



EHV-C Infektion von HEK 293T- Zellen mit CFDA-SE markiertem Virus und GPN-Protein-Bildung (600 x)



EHV-C Infektion von HEK 293T-Zellen und GPN-Protein-Bildung (600 x)



EHV-C Infektion von MDDCs mit CFDA-SE markiertem Virus (600 x)

Abbildung 3.14

Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Infektion von HEK 293T-Zellen und MDDCs mit CFDA-SE markiertem EHV-C sowie der GPN-Proteinbildung

Die Zellkerne, die mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) angefärbt wurden, sind blau dargestellt, die GPN-Polyproteine rot. CFDA-SE markiertes EHV-C fluoresziert nach Infektion der Zellen grün. Die fluoreszenzmikroskopische Darstellung erfolgte bei 600-facher Vergrößerung.

3.5.2 Nachweis der Infektion mittels FACS-Analyse

Der Nachweis der Infektion von HEK 293T-Zellen und MDDCs durch EHV-C und NYVAC-C erfolgte neben der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung zudem mittels FACS-Analyse. Dabei konnte die prozentuale Anzahl infizierter Zellen einerseits direkt über das CFSE-Signal und andererseits über die GPN-Proteinbildung ermittelt werden.

Farbstoff markiertes EHV-C infizierte 64,1 % der MDDCs und 26,1-30,7 % der HEK 293T-Zellen. Die GPN-Proteinbildung lag jedoch unabhängig vom Zelltyp teils deutlich unter der Infektionsrate. Bei 10,4-18,6 % der HEK 293T-Zellen und lediglich 9,6 % der MDDCs bildete sich nach Infektion mit EHV-C das GPN-Protein.

Wurden nach Infektion von HEK 293T-Zellen und MDDCs mit Farbstoff markiertem EHV-C das CFSE-Signal und die GPN-Proteinbildung gleichzeitig untersucht, zeigten sich für beide niedrigere Werte als bei der Analyse der Einzelkomponenten. Bei 15,7-21,4 % der HEK

293T-Zellen sowie 57,3 % der MDDCs konnte eine direkte Infektion mittels CFSE-Signal nachgewiesen werden und bei etwa 6,1 % der HEK 293T-Zellen sowie 5,2 % der MDDCs eine GPN-Bildung (Abb. 3.15).

Farbstoff markiertes NYVAC-C zeigte in HEK 293T-Zellen keine beziehungsweise lediglich eine sehr geringe Infektionsrate von 0-10,3 %. Zudem war nur eine geringe GPN-Proteinbildung von 0,3-11,4 % der Zellen zu detektieren. Bei Infektion der HEK 293T-Zellen mit unmarkiertem NYVAC-C zeigte sich eine deutlich höhere GPN-Bildung (25,7-61,1 %) (Abb. 3.15 a-c).

In MDDCs kam es sowohl bei Farbstoff markiertem als auch bei unbehandeltem NYVAC-C zu einer kaum nachweisbaren Infektion (1,9 %) und GPN-Proteinbildung (0,6%) (Abb. 3.15 d).

Als Negativkontrollen dienten nicht infizierte HEK 293T-Zellen und nicht infizierte MDDCs: (i) unbehandelt, (ii) mit intrazellulärer p24-Färbung, (iii) mit CFDA-SE inkubiert. Als zusätzliche Kontrollen wurden der Farbstoff CFDA-SE in BSA (Bovines Serum Albumin) und NYVAC-C in Medium eingesetzt. Keine Negativkontrolle zeigte ein relevantes Fluoreszenzsignal (0-0,2 %) (Abb. 3.15).

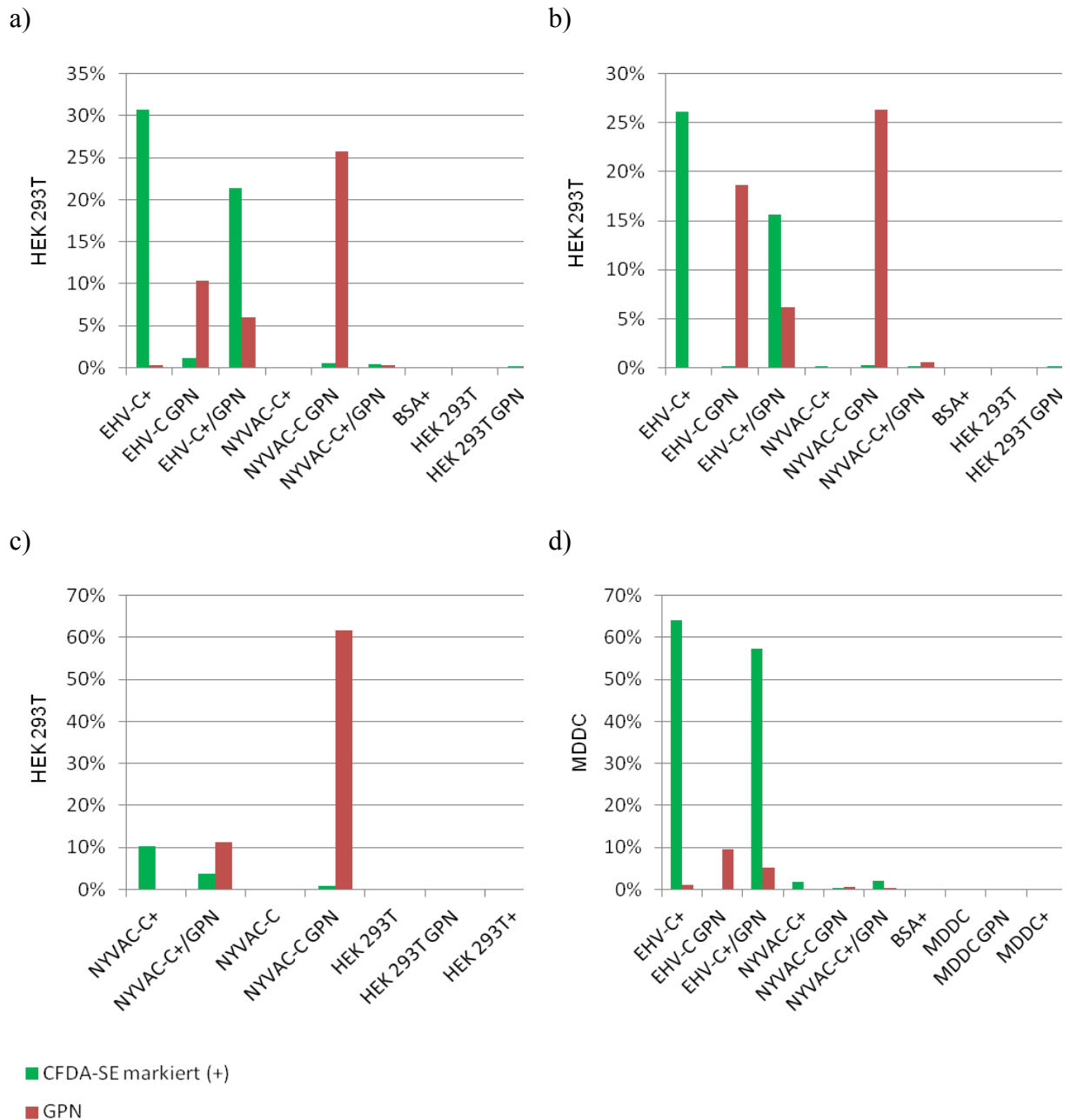


Abbildung 3.15

Infektion von HEK 293T-Zellen und MDDCs mit CFDA-SE markiertem EHV-C und NYVAC-C und GPN-Proteinbildung, analysiert mittels FACS

Die Viren wurden mit CFDA-SE markiert. Nach der Infektion der Zellen wurde das CFSE-Fluoreszenzsignal mit FACS-Analyse detektiert. Die infizierten Zellen sind im Balkendiagramm grün dargestellt. Die Zellen, die das GPN-Protein bilden, sind rot dargestellt.

a)-c) zeigen die Infektion von HEK 293T-Zellen, d) zeigt die Infektion von MDDCs.

Keine Negativkontrolle zeigte ein relevantes Fluoreszenzsignal.

4 Diskussion

4.1 Vergleich der RNA-Isolationsverfahren mit RNeasy[®]-MiniKit und mit TRI-REAGENT[™] in Kombination mit RNeasy[®]-MiniKit

Um aussagekräftige und verwertbare Ergebnisse in der LightCycler[™]-Analyse zu erhalten, benötigt man eine ausreichende Menge an Ausgangs-cDNA. Als Referenz wurde das „Housekeeping“-Gen β -actin verwendet, das in allen Zelltypen in vergleichbarer und großer Menge exprimiert wird.⁵⁴⁻⁵⁵ Im Idealfall ist, eine effiziente RNA-Isolationsmethode vorausgesetzt, die cDNA dieses Gens daher in hoher Menge verfügbar.

Zunächst erfolgte die RNA-Isolation in mehreren Versuchen mittels RNeasy[®]-MiniKit (Quiagen). In der Kontroll-PCR nach reverser Transkription zeigten sich jedoch durchweg nur schwach ausgeprägte DNA-Signale für β -actin (siehe Abb. 3.1 und 3.2). Nach Einsetzen der cDNA in die LightCycler[™]-Analyse lagen die Crossing Points etwa bei Zyklus 22 bis 25. Im Vergleich konnte der Crossing Point der Negativkontrolle bei Zyklus 29 bestimmt werden. Da β -actin verglichen mit den anderen in dieser Arbeit untersuchten Genen tendenziell stärker exprimiert wird, ist für diese ein höherer Crossing Point zu erwarten, der möglicherweise im Bereich der Negativkontrolle liegt.

Bei RNA-Isolationen mittels TRI-Reagent[™] (Sigma-Aldrich[®]) in Kombination mit dem RNeasy[®]-MiniKit (Quiagen) ließen sich in der Kontroll-PCR nach reverser Transkription bei allen Proben starke DNA-Signale für β -actin nachweisen. In der LightCycler[™]-Analyse lag der Crossing Point für β -actin durchschnittlich bei Zyklus 11.

Da definitionsgemäß eine größere Ausgangskonzentration an cDNA vorliegt, je niedriger der Crossing Point ist, kann die TRI-Reagent[™]-Methode (Sigma-Aldrich[®]) eine effizientere RNA-Ausbeute und damit höhere cDNA-Konzentration erzielen.

Wurden die beiden Isolationsmethoden zusätzlich mit Blick auf die resultierenden RNA-Konzentrationen in der spektralphotometrischen Untersuchung verglichen, so ließen sich deutliche Unterschiede feststellen.

Bei der RNA-Isolation mittels RNeasy[®]-MiniKit (Quiagen) wurden durchschnittliche RNA-Konzentrationen von 300 $\mu\text{g/ml}$ (106 bis 470 $\mu\text{g/ml}$) detektiert. Erfolgte die RNA-Isolation mittels TRI-Reagent[™] (Sigma-Aldrich[®]), zeigten sich wesentlich höhere RNA-Konzentrationen mit durchschnittlich 850 $\mu\text{g/ml}$ (200 bis 1500 $\mu\text{g/ml}$).

Folglich kann die Effizienz der RNA-Isolationsmethode über eine aussagekräftige LightCycler[™]-Analyse entscheiden.

Schon in früheren Versuchen hat man die RNA-Isolation mittels Trizol, die der TRI-ReagentTM (Sigma-Aldrich[®])-Methode entspricht, mit der RNeasy[®]-MiniKit (Quiagen)-Methode verglichen.⁵⁶⁻⁵⁷ Mit Trizol konnten dabei ebenfalls die höchsten RNA-Konzentrationen erzielt werden. Jedoch zeigten sich im Gegensatz zu den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen keine signifikanten Unterschiede in den Signalintensitäten der DNA-Proben in der Kontroll-PCR nach reverser Transkription.⁵⁶

Höchstwahrscheinlich ist die bei beiden RNA-Isolationsverfahren variierend angewendete Aufbereitung der Proben vor Bindung der RNA an die RNeasy[®]-Säule die Ursache für die unterschiedliche RNA-Ausbeute. Durch effektive Trennung von RNA, DNA und Proteinen mittels TRI-ReagentTM und Chloroform ist es möglich, nahezu reine RNA auf die RNeasy[®]-Säule zu geben. Wird dagegen nach dem RNeasy[®]-Protokoll die gesamte Zellsuspension mit RNA, DNA und Proteinen auf die RNeasy[®]-Säule gegeben, beeinträchtigt das möglicherweise die Bindung der RNA an die Säule.

Xiang et al. untersuchten außerdem die Auswirkung der Behandlung von Zellen mit Dithiothreitol vor der RNA-Isolation.⁵⁶ Es zeigte sich, dass Dithiothreitol keine Erhöhung der RNA-Ausbeute, sondern einen RNA-Verlust bewirkt. Die chemische Verbindung von Dithiothreitol ähnelt der von β -Mercaptoethanol, das bei der RNA-Isolation nach dem RNeasy[®]-Protokoll zusammen mit dem RLT-Puffer zur Zelllyse verwendet wird. β -Mercaptoethanol reduziert ebenso wie Dithiothreitol Disulfidbrücken von Proteinen, um deren Tertiärstruktur zu zerstören. Auch β -Mercaptoethanol ist eine weitere mögliche Ursache für den Verlust an RNA.

4.2 Vergleich unterschiedlicher DNase-Verdau-Methoden

Bei RNA-Isolationen mit dem RNeasy[®]-MiniKit mit DNase-Verdau auf der RNeasy[®]-Säule ließen sich in der anschließend durchgeführten Kontroll-PCR spezifische DNA-Signale feststellen (siehe Abb. 3.1 a und 3.2 a). In einem Großteil der Proben konnten DNA-Verunreinigungen detektiert werden. Erfolgte dagegen der DNase-Verdau im Anschluss an die RNA-Isolation, waren in der Kontroll-PCR keine spezifischen DNA-Banden nachweisbar. Mit dem DNase-Verdau nach der RNA-Isolation mit DNase und Protokoll nach Roche[®] kann folglich eine größere Reinheit erzielt werden als mit dem DNase-Verdau während der RNA-Isolation auf der RNeasy[®]-Säule unter Verwendung der DNase von Quiagen.

Wurde die RNA mittels TRI-ReagentTM, Chloroform und RNeasy[®]-MiniKit isoliert, erfolgte der DNase-Verdau während der RNA-Isolation auf der RNeasy[®]-Säule. In der anschließend

durchgeführten Kontroll-PCR konnten keine spezifischen DNA-Signale festgestellt werden (siehe Abb. 3.3). Da bei der RNA-Isolation mit TRI-ReagentTM und Chloroform der größte Anteil an DNA bereits entfernt wurde, ist der DNase-Verdau auf der RNeasy[®]-Säule im Gegensatz zur alleinigen RNeasy[®]-MiniKit-Methode ausreichend.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass bei der Isolation der RNA mittels RNeasy[®]-MiniKit und gleichzeitig bestehender Verunreinigung mit großer Menge an DNA der DNase-Verdau nach der RNA-Isolation höhere Reinheit erzielt als der DNase-Verdau auf der RNeasy[®]-Säule.

Zusätzlich erfolgte der DNase-Verdau nach der RNA-Isolation variabel mit und ohne RNase-Inhibitor beziehungsweise EDTA, um etwaige Unterschiede bezüglich der RNA-Ausbeute festzustellen. In der Kontroll-PCR nach reverser Transkription der RNA in cDNA ließ sich bei Verwendung von RNase-Inhibitor und EDTA ein stärkeres DNA-Signal detektieren als ohne deren Zugabe (siehe Abb. 3.2 c). Das DNA-Signal war jedoch deutlich schwächer als nach reverser Transkription von der RNA, die mittels TRI-ReagentTM und Chloroform isoliert wurde. Dies deutet auf eine geringere Ausgangs-cDNA für die reverse Transkription hin.

4.3 Geeignete RNA-Isolationszeitpunkte für die frühen beziehungsweise späten Gene von EHV-C und NYVAC-C

Um eine möglichst hohe Infektionswahrscheinlichkeit zu gewährleisten, wurde für die Infektion von MDDCs mit EHV-C und NYVAC-C, wie bereits in den Vorversuchen der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ralf Wagner, eine MOI von 10 verwendet.³⁷

Bowles et al. zeigten, dass das Protein EICP0 von EHV-1 bereits 3 bis 4 hpi mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden kann.⁵⁸ Die Transkription des Gens IE erfolgt bereits vor der Transkription des frühen Gens EICP0.⁵⁹ In weiteren Studien wurden EHV-1 infizierte RK13-Zellen (MOI von 10) zur Analyse des IE-Proteins mittels Western-Blot 4 hpi, des Proteins EICP0 6 hpi und des späten Proteins gpD 8 hpi geerntet.⁶⁰

In Studien zur Untersuchung der Expression früher, mittlerer und später Gene von NYVAC-C erfolgte die RNA-Isolation der frühen Gene 3 hpi und die RNA-Isolation der späten Gene 8 hpi.²²

In dieser Arbeit wurde entsprechend der Ergebnisse der Voruntersuchungen der RNA-Isolationszeitpunkt der frühen Gene IE und EICP0 von EHV-C sowie des frühen Gens E3L von NYVAC-C 4 hpi und der späten Gene gpD von EHV-C und F17R von NYVAC-C 8 hpi gewählt. Dabei zeigten die Ergebnisse 8 hpi eine höhere Expression der frühen Gene von

EHV-C und NYVAC-C als 4 hpi. Der RNA-Isolationszeitpunkt zur Untersuchung der Expression der frühen Gene könnte demnach auch später, etwa 8 hpi gewählt werden.

4.4 Vergleich der Expression der frühen und späten Gene von EHV-C mit der Expression der frühen und späten Gene von NYVAC-C in HEK 293T-Zellen

Untersuchungen zur Replikationsfähigkeit von NYVAC zeigten, dass die Replikation des hoch attenuierten Vaccinia Virus-Stammes in vielen humanen Zelllinien wie MRC-5-Zellen, Detroit 532-Zellen, HEL-Zellen und HNK-Zellen im Vergleich zu den permissiven Zelllinien CEF und Verozellen signifikant vermindert ist.^{26, 61} Für den hoch attenuierten Vaccinia Virus-Stamm MVA (modified Vaccinia Virus Ankara) konnte eine absolute Replikationsunfähigkeit in einer Reihe von primären humanen Zellen wie PBMCs, primären Hautfibroblasten, dendritischen Zellen und primären humanen Makrophagen nachgewiesen werden.⁶² Sowohl NYVAC als auch MVA besitzen dagegen eine gute Replikationsfähigkeit und Virusvermehrung in BHK-21-Zellen.⁶¹⁻⁶²

Für EHV-1 ließ sich die Infektions- und Replikationsfähigkeit in einer breiten Vielfalt von Zellen animalen und humanen Ursprungs nachweisen (z.B. RK13-Zellen, BHK-21-Zellen). Außerdem konnte die Expression des Transgens EGFP 24 hpi in HEK 293T-Zellen detektiert werden. EHV-1 wird jedoch nicht aus HEK 293T-Zellen freigesetzt und nicht von Zelle zu Zelle übertragen.¹⁴

In dieser Arbeit konnte sowohl für die frühen Gene IE und EICP0 als auch für das späte Gen gpD von EHV-C 4 hpi beziehungsweise 8 hpi eine geringere Expression in HEK 293T-Zellen nachgewiesen werden als in MDDCs. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Trapp et al. ist der RNA-Isolationszeitpunkt in HEK 293T-Zellen vermutlich zu früh gewählt. Eine Genexpression ist erst zu einem späteren Zeitpunkt zu erwarten. Eine weitere Hypothese ist, dass HEK 293T-Zellen keine permissive Zelllinie für EHV-C darstellen.

Die Expression des frühen Gens E3L von NYVAC-C war in HEK 293T-Zellen nachweisbar, wobei die Expression 8 hpi stärker ausgeprägt war als 4 hpi. Das späte Gen F17R von NYVAC-C wurde in HEK 293T-Zellen 8 hpi ebenfalls exprimiert, im Vergleich zu MDDCs etwa 30 Mal so stark (siehe 3.3.7.2). HEK 293T-Zellen gehören daher vermutlich zu den permissiven Zellen für NYVAC-C.

4.5 Expression der frühen Gene IE, EICP0 und des späten Gens gpD von EHV-C in MDDCs

Beer et al. beschrieben, dass EHV-1 nur in Zellen des natürlichen Wirts, nicht jedoch in artfremden Organismen, z.B. in menschlichen Zellen, repliziert.⁶³ In den durchgeführten Untersuchungen konnte belegt werden, dass EHV-C humane MDDCs infiziert und in diesen repliziert. Sowohl die frühen Gene IE und EICP0 als auch das späte Gen gpD wurden exprimiert. Nach den unter 4.3 geschilderten Kriterien wurden die RNA-Isolationszeitpunkte 4 hpi beziehungsweise 8 hpi gewählt. Dabei zeigte sich eine höhere Expression der frühen Gene 8 hpi als 4 hpi.

4.6 Expression des frühen Gens E3L, des späten Gens F17R von NYVAC-C sowie des Gens gag von HIV kodiert von NYVAC-C in MDDCs

Diese Arbeit konnte zeigen, dass das frühe Gen E3L von NYVAC-C nach Infektion von MDDCs, gewonnen aus PBMCs verschiedener Spender, exprimiert wird, das späte Gen F17R jedoch kaum. Gag wird in MDDCs ebenfalls nur in geringem Maß exprimiert. In der Western-Blot-Analyse war nach Infektion von MDDCs mit NYVAC-C keine GPN-Proteinbildung nachweisbar. Die Expression der Gene wie gag, die zur Bildung von Strukturproteinen nötig sind, erfolgt erst spät im Replikationszyklus.²⁷

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass nach der Infektion von MDDCs mit NYVAC-C ein Block zwischen der Bildung früher und später Gene stattfindet. Da die Expression von F17R in der Regel 8 hpi erfolgt, liegt der Block in der Genexpression erwartungsgemäß innerhalb der ersten vier bis acht Stunden nach Infektion.⁶⁴

Normalerweise ist die vollständige Replikation von Vaccinia Virus nach Infektion einer Zelle im Zytoplasma möglich.²³ In einer Reihe von Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass nach der Infektion von MDDCs durch Poxviridae wie Vaccinia Virus oder durch attenuierte Vektoren wie NYVAC oder MVA keine Replikation stattfindet.⁶⁵ Zwar ist die Bildung der frühen Gene beziehungsweise Proteine möglich, die nachfolgende DNA-Replikation und die Bildung später Zellproteine sind es jedoch nicht. Folglich gibt es auch keine vollständige Synthese von Virionen.^{14,17}

Die Expression früher Gene findet bereits wenige Minuten nach Infektion der Zelle innerhalb des Viruscores statt.²⁸ Die dazu benötigte RNA-Polymerase und der Transkriptionsfaktor VETF sind viruseigen und werden im Virusvirion mitgeführt.²⁴ Deshalb verläuft die Bildung

früher Genprodukte unabhängig von der Wirtszelle. Sowohl die Ergebnisse dieser als auch früherer Arbeiten zeigten, dass diese frühen Genprodukte nach Infektion von MDDCs mit Vaccinia Virus beziehungsweise NYVAC uneingeschränkt gebildet werden können.⁶⁵⁻⁶⁶ Die frühen Proteine sind für die nachfolgende DNA-Replikation und für die Transkription intermediärer Gene verantwortlich.²⁸ Die intermediären Proteine tragen wiederum zur Transkription späterer Gene bei.^{24, 27} Anders als bei der Transkription früherer Gene sind bei der Bildung von intermediärer und späterer mRNA wirtseigene Proteine beteiligt. Frühere Untersuchungen identifizierten in HeLa-Zellen die wirtseigenen Proteine YY1 und VITF-2 als Transkriptionsfaktoren für die Bildung intermediärer mRNA und VLTF-X als Transkriptionsfaktor für die Bildung späterer mRNA.²⁸ Möglicherweise existieren die benötigten Transkriptionsfaktoren nicht in MDDCs, woraus eine fehlende Bildung intermediärer und späterer mRNA resultiert.

Auch die Art der dendritischen Zellen scheint eine Rolle für die Replikationsfähigkeit von Vaccinia Virus zu spielen. In MDDCs sind im Gegensatz zu dendritischen Zellen, die aus CD34⁺ Vorläuferzellen gereift sind, nach Infektion von Vaccinia Virus lediglich frühe, jedoch keine späten Promotoren aktiv.⁶⁷⁻⁶⁸ Das bedeutet, in MDDCs ist daher nur die Expression früherer Gene und die Bildung früherer Proteine möglich. Die Replikation von Vaccinia Virus und die Expression späterer Gene mit Bildung späterer Proteine findet nicht statt.⁶⁶ Dagegen werden in dendritischen Zellen aus CD34⁺ Vorläuferzellen nach Infektion mit Vaccinia Virus auch späte Proteine produziert, weil die späten Promotoren für die Bildung späterer Gene aktiv sind.⁶⁷⁻⁶⁹ Frühere Untersuchungen zeigten, dass der Unterschied zwischen dendritischen Zellen aus CD34⁺ Vorläuferzellen und MDDCs darin besteht, dass sich CD34⁺ dendritische Zellen vor der Differenzierung teilen.⁷⁰ In jeder CD34⁺ dendritischen Tochterzelle befindet sich das geeignete Zellinstrumentarium für die Bildung sowohl zellulärer als auch viraler DNA.⁶⁶

Mehrere Studien untersuchten bisher die Replikationsfähigkeit von Poxviridae und speziell von NYVAC auf menschlichen Zelllinien. Poxviridae durchlaufen im Gegensatz zu anderen Viren, wie CMV, VZV und Masernviren, keinen Infektionszyklus in dendritischen Zellen.⁶⁵ Auch zeigte sich, dass NYVAC in verschiedenen menschlichen Zelllinien wie MRC-5, Detroit 532, HEL und HNK-Zellen nicht repliziert und keine oder nur geringe Mengen NYVAC spezifischer DNA gebildet werden. Dies lässt vermuten, dass der Replikationszyklus bereits früh, noch vor der DNA-Replikation, blockiert wird.²⁶ Für MVA (Modified Vaccinia virus Ankara) ließen sich ähnliche Ergebnisse gewinnen. MVA repliziert in den meisten Säugetierzellen nicht produktiv.⁷¹ Für die Replikation von Vaccinia Virus in menschlichen

Zellen sind die sogenannten "host range" Gene C7L und K1L als regulatorische Gene nötig.⁷² Meng et al. belegten, dass es bei Infektion von Zellen mit einem Δ C7L und Δ K1L Virusstamm von Vaccinia Virus zu einer stärkeren Phosphorylierung des eukaryotischen Translations-Initiationsfaktors eIF2 α kommt.⁷³ Durch den Phosphorylierungsvorgang wird die zelluläre und virale Proteinbildung verhindert.⁷⁴ Studien mit NYVAC infizierten HeLa-Zellen zeigten, dass C7L die Phosphorylierung von eIF2 α verhindert. Die Expression später Gene von MVA in nicht permissiven menschlichen Zellen und murinen Zellen ist abhängig von der Funktion des C7L-Gens.⁷⁴ Bei der Generierung von NYVAC wurden C7L und K1L deletiert, was möglicherweise ebenfalls Einfluß auf die fehlende Expression der späten Gene hat.⁷²

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nach Infektion immaturer dendritischer Zellen beziehungsweise Makrophagen durch Vaccinia Virus und nach Bildung der frühen Gene die Apoptose der Zellen induziert wird.^{66, 75-76} Die Infektion mit Vaccinia Virus führt zu einer Abnahme des Protoonkogens Bcl-xL, das eine anti-apoptotische Wirkung besitzt. Das Gen Bax, das über einen pro-apoptotischen Effekt verfügt, wird dagegen stärker exprimiert.⁷⁵

Guerra *et al.* zeigten, dass es bereits sechs Stunden nach Infektion von MDDCs mit NYVAC oder MVA zu einer Veränderung der Zellmorphologie mit runder Zelloberfläche und Kontraktionen des Zytoplasmas kommt. Gleichzeitig mit der Zunahme der Phosphorylierung von eIF2 α tritt nach sechs Stunden der Block in der Bildung später Proteine auf. Zu dieser Zeit werden erhöhte Mengen der 5-OA-Synthetase detektiert. Das Enzym degradiert virale und zelluläre RNA und verhindert so die weitere Proteinsynthese. 16 Stunden nach Infektion von MDDCs mit NYVAC sind Zeichen der Apoptose und des rRNA-Abbaus zu beobachten.⁶⁵

Gezeigt werden konnte auch, dass Vaccinia Virus eine adäquate Maturation dendritischer Zellen nach Infektion verhindert. Das führt zu einer geringen Expression antigenpräsentierender Proteine sowie co-stimulatorischer Moleküle. Letztlich werden naive CD8⁺ T-Zellen nicht aktiviert.⁷⁶⁻⁷⁷ Dennoch ist Vaccinia Virus ein hoch immunogener Vektor.⁷⁶ Sowohl MVA als auch NYVAC induzieren eine starke T-Zell-spezifische Immunantwort auf rekombinante Antigene.⁷⁷ Ein möglicher Mechanismus ist das Generieren einer Immunantwort gegen Vaccinia Virus mittels „Cross-Präsentation“. Dabei phagozytieren nicht infizierte dendritische Zellen apoptotische Vaccinia Virus infizierte Zellen und können durch Präsentation von Virusantigenen über MHC-I-Moleküle eine CD8⁺ T-Zell-Antwort auslösen.⁷⁶

Engelmayer et al. äußerten die Hypothese, dass Vaccinia Virus nicht nur immature, sondern auch eine größere Anzahl maturer dendritischer Zellen infiziert. Der Vorteil maturer dendritischer Zellen gegenüber immaturen dendritischen Zellen ist die geringere Apoptoserate.⁷⁶

Das rekombinante Gen gag kodiert für ein Strukturprotein von HIV und gehört daher zu den spät exprimierenden Genen im Zellzyklus. In dieser Arbeit konnte nach Infektion von MDDCs mit NYVAC-C analog zu den oben aufgeführten Ergebnissen keine relevante gag-Expression detektiert werden.

Ob neben der Bildung einer effektiven Immunität gegen den NYVAC-Vektor auch eine wirksame Immunität gegen das rekombinante Gen gag bei fehlender Antigenbildung erreicht werden kann, ist fraglich.

4.7 Nachweis der Infektion von HEK 293T-Zellen und MDDCs durch CFDA-SE markiertes EHV-C und durch CFDA-SE markiertes NYVAC-C

In dieser Arbeit sollte die Infektion von HEK 293T-Zellen und MDDCs mit Farbstoff markiertem NYVAC-C und EHV-C direkt fluoreszenzmikroskopisch und mittels FACS-Analyse nachgewiesen werden. Es gelang, für CFDA-SE markiertes EHV-C eine effiziente Infektion von HEK 293T-Zellen und MDDCs zu belegen, für CFDA-SE markiertes NYVAC-C allerdings nur eine geringe Infektiosität. Für den Nachweis der GPN-Proteinbildung ist jedoch eine Infektion dieser Zellen unbedingte Voraussetzung. Außerdem konnte die Expression der frühen Gene von NYVAC-C mittels real-time PCR in MDDCs nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass eine Infektion von MDDCs mit NYVAC-C stattgefunden hat. Also müsste sowohl für HEK 293T-Zellen als auch für MDDCs, die mit Farbstoff markiertem NYVAC-C infiziert wurden, ein Fluoreszenzsignal zu detektieren sein. Möglicherweise konnte NYVAC-C aufgrund einer ineffizienten oder fehlenden Bindung des Farbstoffes CFDA-SE an das Virus nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur Inkubation von unmarkiertem NYVAC-C findet zudem bei der Inkubation von Farbstoff markiertem NYVAC-C mit HEK 293T-Zellen keine GPN-Bildung statt. Farbstoff markiertes NYVAC-C wird möglicherweise von den Zellen nicht aufgenommen. Das markierte Virus könnte jedoch auch nach Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation in dem Überstand verblieben sein, der verworfen wurde.

Die fehlende GPN-Bildung nach Infektion von MDDCs mit NYVAC-C stimmt mit den Ergebnissen aus der Western-Blot-Analyse und aus der real-time PCR überein.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der real-time PCR infiziert EHV-C MDDCs effektiver als HEK 293T-Zellen. Sie zeigen eine deutlich geringere Expression früher und später Gene von EHV-C in HEK 293T-Zellen als in MDDCs.

Nach Infektion von HEK 293T-Zellen und von MDDCs mit unmarkiertem EHV-C konnte mittels FACS-Analyse im Vergleich zur direkten Infektionsrate eine deutlich niedrigere GPN-Bildung detektiert werden. Vermutlich kommt es nicht in jeder infizierten Zelle zu einer GPN-Proteinbildung.

Die geringe GPN-Bildung in EHV-C infizierten MDDCs entspricht nicht den mittels Western-Blot-Analyse und real-time PCR nachgewiesenen Ergebnissen. Möglicherweise ist der Untersuchungszeitpunkt für das GPN-Antigen mit zwölf Stunden nach Infektion im Gegensatz zu acht Stunden in der Western-Blot-Analyse und real-time PCR zu spät gewählt. Mit beiden Verfahren kann jedoch im Vergleich zur FACS-Analyse keine quantitative Aussage über die GPN-Bildung getroffen werden.

5 Zusammenfassung

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte in EHV infizierten MDDCs eine hohe Antigenexpression und Maturation im Gegensatz zu NYVAC infizierten MDDCs gezeigt werden.

Ziel dieser Arbeit war es, die Infektionseffizienz, die Expression früher und später Gene und die HIV-Antigenexpression der Vektorsysteme EHV-C und NYVAC-C in MDDCs genauer zu untersuchen. HEK 293T-Zellen dienten als Kontrolle. Die Infektionseffizienz wurde mittels fluoreszenzmarkierter Viren durchgeführt. Fluoreszenzmikroskopische und FACS Analysen zeigten eine deutliche Infektion von MDDCs mit EHV-C (64,1 %) wohingegen NYVAC-C in MDDCs nicht beziehungsweise nur sehr gering (1,9 %) nachgewiesen werden konnte.

Die Transkriptionsanalyse wurde mit den frühen und späten Genen der beiden Vektorsysteme durchgeführt. Hierzu wurden IE als frühes und gpD als spätes Gen von EHV und E3L als frühes und F17R als spätes Gen von NYVAC verwendet. Als Methode diente die reverse Transkription mit anschließender relativer Quantifizierung mittels real-time PCR.

Nach Infektion von MDDCs mit EHV-C kam es auf Transkriptionsebene zur Expression der untersuchten frühen Gene IE, EICP0 und auch des späten Gens gpD. In HEK 293T-Zellen war die Expression dieser Gene dagegen gering. Nach Infektion von MDDCs mit NYVAC-C wurde das untersuchte frühe Gen E3L auf Transkriptionsebene exprimiert, das späte Gen F17R jedoch kaum. Das lässt auf einen Block zwischen der Transkription früher und später Gene von NYVAC-C in MDDCs schließen, möglicherweise während des viralen Replikationszyklus. Dagegen wurden in HEK 293T-Zellen das frühe und das späte Gen exprimiert.

Eine Infektion mit EHV-C führte in MDDCs zu einer stärkeren Transkription und Translation des Gag-Antigens als eine Infektion mit NYVAC-C. Dies konnte sowohl mittels real-time PCR, als auch in der FACS- und Western-Blot-Analyse gezeigt werden.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit die Ergebnisse bezüglich der geringen Maturationskapazität und Antigenexpression von NYVAC-C in MDDCs aus den Voruntersuchungen bestätigt werden. Neben der niedrigen Infektionsrate konnte für NYVAC-C in MDDCs ein Block zwischen der Expression früher und später Gene während der Virusreplikation gezeigt werden.

6 Ausblick

In dieser Arbeit wurden die beiden Vektorsysteme EHV-C und NYVAC-C hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht, in einem artifiziellen „direkt priming“ Ansatz MDDCs zu infizieren und zu maturieren. Hierbei konnte für NYVAC-C neben einer geringen Infektionsrate ein Block in der viralen Genexpression festgestellt werden, was sicherlich zu einer geringen Maturation und niedrigen Antigenexpression beiträgt.

Inwiefern ein intakter Replikationszyklus des viralen Vektors in MDDCs ausschlaggebend für eine effektive CD8⁺ T-Zell-Antwort ist, muss in weiteren Arbeiten geklärt werden. Dabei sollte neben dem „direkt priming“ Ansatz ein besonderer Fokus auf dem „cross priming“ Potential dieses viralen Vektors liegen.

Hierzu muss ein humanes Zellsystem gefunden werden, in dem, wie in HEK 293T-Zellen, ein intakter Replikationszyklus von NYVAC-C mit Expression der viralen Antigene stattfindet. So könnte über die mögliche Interaktion mit MDDCs, etwa durch Phagozytose apoptotischer Zellen, eine entsprechende T-Zellantwort generiert werden.

Neue Vakzinevektoren könnten somit in Zukunft „ex vivo“ hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Ausbildung von T-Zellantworten im „direkt priming“ Ansatz sowie im „cross priming“ Ansatz im humanen System getestet werden.

7 Anhang

Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Firma
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	4500 mg/L Glucose L-Glutamin Pyruvat	Gibco® (Life Technologies™)
DC-Medium	500 ml RPMI 1640 (L-Glutamin, 2,0 g/L NaHCO ₃) 50 ml FKS oder autologes (AB-) Serum 5 ml Vitamine (MEM (100 x) vitamine solution) 5 ml L-Glutamin (200 mM) 5 ml MEM (non-essential Amino Acids) 5 ml Pyruvat (MEM Sodium Pyruvat, 100 mM) 0,5 ml β-Mercaptoethanol (5x10 ⁻⁵ M) 2 ml Pen/Strep (40 IU/ml Penicillin; 40 µg/ml Streptomycin)	PAN™Biotech PAN™Biotech PAN™Biotech Biochrom® Gibco® Gibco® Gibco® PAN™Biotech

Puffer, Lösungen und Chemikalien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Firma
PBS	10 mM Na ₂ HPO ₄ ⁻ 137 mM NaCl 1,8 mM KH ₂ PO ₄ ⁻ 2,7 mM KCl	
FKS (fötale Kälberserum)		PAN™Biotech, Aidenbach
MACS-Puffer	PBS 0,5 % FKS 2 mM EDTA	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach
RLT-Puffer		RNeasy® Mini Kit, Quiagen, Hilden

Anhang

DNA-Probenpuffer (6 x)	0,001 % Bromphenolblau 0,001 % Xylencyanol 50 mM EDTA pH 8,0 30 % Glycerin	
TBE-Puffer (10 x)	1 M Tris 1 M Borsäure 20 mM EDTA pH 8,0	
RT-Puffer (Reverse Transkription)	200 mM Tris-HCl pH 8,4 500 mM KCl	SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Invitrogen™
SDS-Probenpuffer (5 x)	312,5 mM Tris/HCl, pH 6,8 5 % SDS 25 % Mercaptoethanol 2,5 nM EDTA 25 % Glycerin 0,0125 % Bromphenolblau	
SDS-PAGE Laufpuffer	25 mM Tris/HCl, pH 7,5 190 mM Glycin 0,1 % SDS	
Transferpuffer	150 mM Glycin 25 mM Tris, pH 8,3 10 % Methanol 0,2 % SDS	
TBS (tris buffered saline)	150 mM NaCl 10 mM Tris/HCl, pH 7,5	
TTBS (tween-tris buffered saline)	500 mM NaCl 25 mM Tris, pH 7,5 0,02 M Tween 20	
AP-Puffer (Alkalische Phosphatase)	100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂ 100 mM Tris, pH 9,5	
NBT/BCIP-Färbereagenz		Roche®, Mannheim

Anhang

FACS-Puffer	PBS 1 % FKS 0,1 % Na ₃ N	
P2	PBS 2 % FKS	
Ficoll		PAN TM Biotech, Aidenbach
CD14 Micro Beads		Milteny Biotec, Bergisch Gladbach
Fc-Rezeptor-Blocker		MACS, Milteny Biotec, Bergisch Gladbach
Cytofix/Cytoperm TM	4 % PFA (Paraformaldehyd) 1 % Saponin in PBS	BD Biosciences, Heidelberg
Perm/Wash	0,1 % Saponin in PBS	
DNase Irecombinant, RNase-free		Roche [®] , Mannheim
DEPC-H ₂ O (Diethylpyrocarbonat)		Sigma-Aldrich [®]
RNase-Inhibitor		Roche [®] , Mannheim
EDTA		PAN TM Biotech, Aidenbach
GoTaq [®] Green Mastermix (2 x)	Reaktions-Puffer (2 x), pH 8,5 je 400 µM dATP, dGTP, dCTP, dTTP 3 mM MgCl ₂	Promega, Mannheim
Agarose		Sigma-Aldrich [®]
Ethidiumbromid (1 %)		Roth [®] , Karlsruhe
Chloroform		Sigma-Aldrich [®]
TRI-REAGENT TM		Sigma-Aldrich [®]
Saccharose		Merck, Darmstadt
DAPI (4'6-Diamidino-2-phenylindol)		Roche [®] , Mannheim

CFDA-SE (Carbofluorescein-Diacetat- Succidimidyl-Ester)		Invitrogen™, Darmstadt
BSA (Bovines Serum Albumin)		Sigma-Aldrich®

Plasmid

β-actin-Plasmid	363 bp, 0,17 nM	wurde von Dr. med. Dipl. Ing. Josef Köstler freundlicherweise bereitgestellt.
-----------------	-----------------	---

Antikörper

Bezeichnung	Verwendung	Firma
Anti-Maus-AP	Western-Blot (1:2000 verdünnt)	Bio-Rad, München
p24-Antikörper-PE	FACS-Analyse	Beckman Coulter

Zytokine

Bezeichnung	Firma
Interleukin 4	Strathmann Biotec
GM-CSF (granulocyte macrophage stimulating factor)	Strathmann Biotec

Kits

Bezeichnung	Verwendung	Firma
RNeasy® -Mini Kit	RNA-Isolation	Quiagen, Hilden
SuperScript™III First-Strand Synthesis System for RT- PCR	Reverse Transkription	Invitrogen™
DYNAmo™ Capillary SYBR® Green qPCR kit	Real time-PCR	Finnzymes, New England Biolabs©

Zellen

Bezeichnung	Beschreibung
HEK 293T	human, Ad5/SV40 (T) transformierte Nierenepithelzelle
RK13	Kaninchen-Nierenepithel-Zelllinie
PBMCs (peripher blood mononuclear cells)	mononukleäre Zellen des menschlichen Blutes, gewonnen aus Buffy Coat einer humanen Blutkonserven
MDDCs (monocyte derived dendritic cells)	generiert aus CD14 ⁺ Monozyten von PBMCs

8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
5-OA-Synthetase	5-Oligoadenylat-Synthetase
A	Absorption
A	Ampere
Abb.	Abbildung
Acc. No.	<i>Accession number</i>
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i>
AP	alkalische Phosphatase
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i> , anti-apoptisches Protein der Bcl-2-Familie
BHK-21 Zellen	<i>baby hamster kidney cells</i>
BHV-1	Bovines Herpesvirus Typ 1
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
c	Konzentration
C7L	Gen von Vaccinia Virus
CCR7	Chemokinrezeptor 7
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CEF	Hühnerembryonal-Fibroblasten
CEV	<i>cell-associated enveloped virus</i>
CFDA-SE	Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CMV	Cytomegalievirus
CP	<i>Crossing Point</i>
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol

dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DC	dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNA-C	DNA-HIV-Clade C
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNS	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
E	<i>early</i>
E	Effizienz oder Extinktion
E3L	frühes Gen von NYVAC
E3L	frühes Gen von NYVAC
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEV	<i>extracellular enveloped virions</i>
EHV	Equines Herpesvirus
EHV-1	Equines Herpesvirus Typ 1
EICP 22	frühes Gen von EHV-1
EICP 27	frühes Gen von EHV-1
EICP0	frühes Gen von EHV-1
eIF2 α	<i>eukaryotic initiation factor 2α</i>
Env	Hüllprotein (<i>envelope</i>)
<i>et.al.</i>	und andere
EuroVacc 02	2002 gegründete europäische Organisation zur Entwicklung einer HIV-Impfstoffes
F17R	spätes Gen von NYVAC
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
Fc	<i>fragment crystallizable</i>
FKS	fötale Kälberserum

Abkürzungsverzeichnis

FSC	<i>forward scatter</i>
g	Gramm
Gag	Gruppenspezifisches Antigen
gB	Glykoprotein B
gC	Glykoprotein C
gD	Glykoprotein D
gfp	grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
gp	Glykoprotein
gpD	Glykoprotein D
GPN	GagPolNef
h	Stunden
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie
HEK 293T-Zellen	<i>human embryonic kidney</i> 293 Zellen, welche das SV 40 large T-Antigen exprimieren
SV 40	Simianes Virus 40
HeLa-Zellen	menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Henrietta Lacks)
HEL-Zellen	humane erythroleukämische Zellen
HIV	humanes Immundefizienz-Virus (<i>human immunodeficiency virus</i>)
HI-Virus	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HNK-Zellen	<i>human neonatal kidney cells</i>
hpi	Stunden post infectionem
IE	<i>immediate early</i>
IE	<i>immediate early</i>
IEV	<i>intracellular enveloped virions</i>
IL-4	Interleukin-4
IMVs	<i>intracellular mature virions</i>
K1L	Gen von Vaccinia Virus
kDa	Kilodalton
L	<i>late</i>
L	Liter
l	Liter

Abkürzungsverzeichnis

LPS	Lipopolysaccharid
m	Milli
M	Molar (Mol pro Liter)
MACS [®]	<i>magnetic cell separation</i>
M-CSF	<i>macrophage colony stimulating factor</i>
MDDCs	<i>monocyte derived dendritic cells</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min.	Minuten
mini F-Plasmid	miniaturisierte Form des prokaryotischen Fertilitätsplasmid
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mol	Mol
MRC-5	humane diploide Zellen, humane embryonale Lungenfibroblasten (medical research council)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MVA	<i>Modified Vaccinia Ankara</i>
n	Nano
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nef	<i>negative factor</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NYVAC	New York Vakzinia Virus
NYVAC-C	New York Vaccinia Virus-HIV-Clade C
p24	Protein 24
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
pfu	platelet forming units
pH	pondus hydrogenii; Konzentration der Protonen in einer Lösung als negativer dekadischer Logarithmus

Abkürzungsverzeichnis

Pol	Polymerase
pUC	<i>plasmid of University of California</i>
rev	<i>regulator of virion expression</i>
RK13 Zellen	Hasennierenzellen (<i>rabbit kidney cells</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Reverse Transkription
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec.	Sekunden
SIV	<i>simian immunodeficiency virus</i>
SSC	<i>side scatter</i>
ssRNA	<i>single-stranded</i> (einzelsträngige) RNA
tat	<i>trans-acting transcriptional activator</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
TR2	frühes Gen von EHV-1
TTBS	<i>tween tris buffered saline</i>
U	Unit
UNAIDS	Joint United Nations Programme on HIV/AIDS
UV	Ultraviolett
V	Volt
V	Volumen
VETF	<i>Vaccinia Virus early transcription factor</i>
VITF-2	Vaccinia Virus intermediate transcription factor 2
VLP	<i>virus like particle</i>
VLTF-X	<i>Vaccinia Virus late transcription factor</i>
VLTF-X	Vaccinia Virus late transcription factor
VZV	Varizella Zoster Virus
WHO	<i>World Health Organization</i>
YY1	Ying Yang 1 Transkriptionsfaktor

Abkürzungsverzeichnis

DNA-Basen:	A	Adenin
	T	Thymin
	C	Cytosin
	G	Guanin
RNA-Basen	A	Adenin
	U	Uracil
	C	Cytosin
	G	Guanin

9 Literaturverzeichnis

1. UNAIDS. Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2010. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS 2010;ISBN 978-92-9173-871-7
2. Girard MP, Osmanov S, Assossou OM, Kieny MP. Human immunodeficiency virus (HIV) immunopathogenesis and vaccine development: A review. *Vaccine* 2011;29 (37):6191-218.
3. HIV prevalence. 2009. (Accessed at www.unaids.org/globalreport/HIV-prevalence-map.htm.)
4. Deutsche AIDS-Gesellschaft e.V. ÖA-GeV. Deutsch-Österreichische Leitlinien zur antiretroviralen Therapie der HIV-1-Infektion. 2010.
5. Wenderlein D, Liotta G, Palombi L. Aids in Mosambik; Antiretrovirale Therapie erfolgreich. *Deutsches Ärzteblatt* Dezember 2004;Jg. 101, Heft 51-52.
6. Ahmed S, Lutalo T, Wawer M, et al. HIV incidence and sexually transmitted disease prevalence associated with condom use: a population study in Rakai, Uganda. *AIDS* 2001;15:2171-9.
7. Wagner C. Studie zur Situation der HIV-Impfstoffentwicklung in Deutschland. Aktionsbündnis gegen AIDS/AIDS-Kampagne c/o Deutsches Institut für Ärztliche Mission (DIFÄM) 2005;BUKO Pharma-Kampagne Bielefeld
8. Wild J, Wagner R. Status and current strategies of HIV vaccine development. *Internist (Berl)* 2003;44:711-8.
9. Thomson MM, Perez-Alvarez L, Najera R. Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *Lancet Infect Dis* 2002;2:461-71.
10. Janeway T, Walport, Shlomchik. *Immunobiology, the immun system in health and disease*. 6th edition 2005:Pages 491-508.
11. Harari A, Bart PA, Stohr W, et al. An HIV-1 clade C DNA prime, NYVAC boost vaccine regimen induces reliable, polyfunctional, and long-lasting T cell responses. *J Exp Med* 2008;205:63-77.
12. Slater JD, Lunn DP, Horohov DW, et al. Report of the equine herpesvirus-1 Havermeier Workshop, San Gimignano, Tuscany, June 2004. *Vet Immunol Immunopathol* 2006;111:3-13.
13. O'Callaghan D, Osterrieder N. *Equine Herpesviruses*. London, Academic Press Ltd Harcourt Brace & Co Encyclopedia Of Virology Webster, R and Granoff, A Ref Type: Serial (Book,Monograph) 1999;2nd:508-15. .
14. Trapp S, von Einem J, Hofmann H, et al. Potential of equine herpesvirus 1 as a vector for immunization. *J Virol* 2005;79:5445-54.

15. Frampton AR, Jr., Goins WF, Cohen JB, et al. Equine herpesvirus 1 utilizes a novel herpesvirus entry receptor. *J Virol* 2005;79:3169-73.
16. Frampton AR, Jr., Stolz DB, Uchida H, Goins WF, Cohen JB, Glorioso JC. Equine herpesvirus 1 enters cells by two different pathways, and infection requires the activation of the cellular kinase ROCK1. *J Virol* 2007;81:10879-89.
17. Mettenleiter TC. Herpesviren, Grundlagen. *Medizinische Virologie: Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen*, Doerr, HW Gerlich, WH 2010; 2.Auflage. 653 ff. Thieme Verlag.
18. Garner JA. Herpes simplex virion entry into and intracellular transport within mammalian cells. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:1497-513.
19. Caughman GB, Staczek J, O'Callaghan DJ. Equine herpesvirus type 1 infected cell polypeptides: evidence for immediate early/early/late regulation of viral gene expression. *Virology* 1985;145:49-61.
20. Smith RH, Caughman GB, O'Callaghan DJ. Characterization of the regulatory functions of the equine herpesvirus 1 immediate-early gene product. *J Virol* 1992;66:936-45.
21. Mettenleiter TC. Herpesvirus assembly and egress. *J Virol* 2002;76:1537-47.
22. Antonio Alcamí ID, David Evans, John W Huggins, Christine Hughes, Peter B Jahrling, Grant McFadden HM, Bernard Moss, Sergei Shchelkunov, Evgeny Stavskiy, Nina Tikunova. Scientific review of variola virus research, 1999–2010. World Health Organization 2010;reference number WHO/HSE/GAR/BDP/2010.3.
23. Guo ZS, Bartlett DL. Vaccinia as a vector for gene delivery. *Expert Opin Biol Ther* 2004;4:901-17.
24. Modrow S, Falke D, Truyen U. Pockenviren. *Molekulare Virologie* 2002; 2.Auflage; Heidelberg Berlin, Spektrum Akademischer Verlag. 2003.
Ref Type: Serial (Book,Monograph).
25. Pastoret PP, Vanderplasschen A. Poxviruses as vaccine vectors. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2003;26:343-55.
26. Tartaglia J, Perkus ME, Taylor J, et al. NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology* 1992;188:217-32.
27. Roberts KL, Smith GL. Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. *Trends Microbiol* 2008;16:472-9.
28. Broyles SS. Vaccinia virus transcription. *J Gen Virol* 2003;84:2293-303.
29. Kibler KV, Shors T, Perkins KB, et al. Double-stranded RNA is a trigger for apoptosis in vaccinia virus-infected cells. *J Virol* 1997;71:1992-2003.
30. Tolonen N, Doglio L, Schleich S, Krijnse Locker J. Vaccinia virus DNA replication occurs in endoplasmic reticulum-enclosed cytoplasmic mini-nuclei. *Mol Biol Cell* 2001;12:2031-46.

31. Chung CS, Chen CH, Ho MY, Huang CY, Liao CL, Chang W. Vaccinia virus proteome: identification of proteins in vaccinia virus intracellular mature virion particles. *J Virol* 2006;80:2127-40.
32. Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767-811.
33. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-52.
34. Rossi M, Young JW. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol* 2005;175:1373-81.
35. Wu L, KewalRamani VN. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol* 2006;6:859-68.
36. Janeway T, Walport, Shlomchik. Immunobiology-the immune system in health and disease. 6 th edition 2005;chapter 8-6:331-4.
37. Böckl K. Equine Herpesvirale Vektoren als neue HIV Vakzinekandidaten: Untersuchungen zur Aktivierung und Maturierung humaner Dendritischer Zellen ex vivo. Diplomarbeit Fachbereich Biotechnologie, Fachhochschule Weihenstephan, durchgeführt am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg 2006.
38. Shankar EM, Che KF, Messmer D, Lifson JD, Larsson M. Expression of a broad array of negative costimulatory molecules and Blimp-1 in T cells following priming by HIV-1 pulsed dendritic cells. *Mol Med* 2011;17:229-40.
39. Muthumani K, Hwang DS, Choo AY, et al. HIV-1 Vpr inhibits the maturation and activation of macrophages and dendritic cells in vitro. *Int Immunol* 2005;17:103-16.
40. Fantuzzi L, Purificato C, Donato K, Belardelli F, Gessani S. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 induces abnormal maturation and functional alterations of dendritic cells: a novel mechanism for AIDS pathogenesis. *J Virol* 2004;78:9763-72.
41. Hofmann-Sieber H. Etablierung des Equinen Herpesvirus Typ 1 (EHV-1) als neues virales Vektorsystem. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften der naturwissenschaftlichen Fakultät III-Biologie und Vorklinische Medizin- der Universität Regensburg 2008;Kapitel B.2.2.5 Herstellung von rekombinanten EHV-Bacmiden (En passant-Methode), C.1.1 Herstellung rekombinanter Viren.
42. Yao F. and Parrington M. Aventis Pasteur Canada. Generation of NYVAC-HIV-C (vP2010), pMA60HIV-C description-FM1. Requested by Marie-Joelle Frachette, France, for NYVAC-HIV-C regulation 2002, Oct. 29.
43. Sambrook Josef RDW. Molecular Cloning, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 2001;1:Chapter 7; A8.19, A8.20-A8.1.
44. Rasmussen R., Morrison T., Herrmann M., Wittwer C. Quantitative PCR by Continuous Fluorescence Monitoring of a Double Strand DNA Specific Binding Dye. *Biochemica Newsletter* 1998;No.2:<http://www.roche-applied-science.com>.

45. The LightCycler™ - the Smartest Innovation for More Efficient PCR. Bichemica Newsletter, No2 1998:<http://www.roche-applied-science.com>.
46. Leikam D. Die Rolle von CpG-Dinukleotiden bei der Regulation der Transgenexpression am Beispiel verschiedener Reportergene. Dissertation zur Erlangung der Doktorgrades der Naturwissenschaften der Naturwissenschaftlichen Fakultät III-Biologie und Vorklinische Medizin der Universität Regensburg 2006;Kapitel B Material und Methoden, Prinzip des Light Cyclers TM.
47. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:e45.
48. Pfaffl M. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum*, Sonderausgabe PCR 2004:92-5.
49. Leikam D. Die Rolle von CpG-Dinukleotiden bei der Regulation der Transgenexpression am Beispiel verschiedener Reportergene. Dissertation zur Erlangung der Doktorgrades der Naturwissenschaften der Naturwissenschaftlichen Fakultät III-Biologie und Vorklinische Medizin der Universität Regensburg 2006;Kapitel B Material und Methoden, Relative Quantifizierung von cDNA.
50. Wang XQ, Duan XM, Liu LH, Fang YQ, Tan Y. Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester fluorescent dye for cell labeling. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2005;37:379-85.
51. Buonaguro L, Tornesello ML, Tagliamonte M, et al. Baculovirus-derived human immunodeficiency virus type 1 virus-like particles activate dendritic cells and induce ex vivo T-cell responses. *J Virol* 2006;80:9134-43.
52. Invitrogen™ detection technologies MP. Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit. 2006.
53. Rothe G. Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. *Zelluläre Diagnostik Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie* Sack U, Tranok A, Rothe G 2007; 27-70. Basel, Karger.
54. Goidin D, Mamessier A, Staquet MJ, Schmitt D, Berthier-Vergnes O. Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Anal Biochem* 2001;295:17-21.
55. Eisenberg E, Levanon EY. Human housekeeping genes are compact. *Trends Genet* 2003;19:362-5.
56. Xiang X, Qiu D, Hegele RD, Tan WC. Comparison of different methods of total RNA extraction for viral detection in sputum. *J Virol Methods* 2001;94:129-35.
57. Santiago-Vázquez LZ, Ranzer LK, Kerr RG. Comparison of two total RNA extraction protocols using the marine gorgonian coral *Pseudopterogorgia elisabethae* and its symbiont *Symbiodinium* sp. *Electronic Journal of Biotechnology* 2006;9; ISSN 0717-3458; DOI 10.2225/vol9-issue5-fulltext-15.

58. Bowles DE, Holden VR, Zhao Y, O'Callaghan DJ. The ICP0 protein of equine herpesvirus 1 is an early protein that independently transactivates expression of all classes of viral promoters. *J Virol* 1997;71:4904-14.
59. Bowles DE, Kim SK, O'Callaghan DJ. Characterization of the trans-activation properties of equine herpesvirus 1 EICP0 protein. *J Virol* 2000;74:1200-8.
60. Yao H, Osterrieder N, O'Callaghan DJ. Generation and characterization of an EICP0 null mutant of equine herpesvirus 1. *Virus Res* 2003;98:163-72.
61. Najera JL, Gomez CE, Domingo-Gil E, Gherardi MM, Esteban M. Cellular and biochemical differences between two attenuated poxvirus vaccine candidates (MVA and NYVAC) and role of the C7L gene. *J Virol* 2006;80:6033-47.
62. Drexler I, Heller K, Wahren B, Erfle V, Sutter G. Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells. *J Gen Virol* 1998;79 (Pt 2):347-52.
63. Beer M. ON, Rudolph J., Trapp S., Wagner R.,. European Patent Application-Non-human herpesviruses as vectors. Application number: 020194536 2004.
64. Ramsey-Ewing A, Moss B. Restriction of vaccinia virus replication in CHO cells occurs at the stage of viral intermediate protein synthesis. *Virology* 1995;206:984-93.
65. Guerra S, Najera JL, Gonzalez JM, et al. Distinct gene expression profiling after infection of immature human monocyte-derived dendritic cells by the attenuated poxvirus vectors MVA and NYVAC. *J Virol* 2007;81:8707-21.
66. Drillien R, Spehner D, Bohbot A, Hanau D. Vaccinia virus-related events and phenotypic changes after infection of dendritic cells derived from human monocytes. *Virology* 2000;268:471-81.
67. Bronte V, Carroll MW, Goletz TJ, et al. Antigen expression by dendritic cells correlates with the therapeutic effectiveness of a model recombinant poxvirus tumor vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:3183-8.
68. Brown M, Davies DH, Skinner MA, et al. Antigen gene transfer to cultured human dendritic cells using recombinant avipoxvirus vectors. *Cancer Gene Ther* 1999;6:238-45.
69. Di Nicola M, Siena S, Bregni M, et al. Gene transfer into human dendritic antigen-presenting cells by vaccinia virus and adenovirus vectors. *Cancer Gene Ther* 1998;5:350-6.
70. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, et al. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med* 1996;184:695-706.
71. Carroll MW, Moss B. Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line. *Virology* 1997;238:198-211.
72. Perkus ME, Goebel SJ, Davis SW, et al. Vaccinia virus host range genes. *Virology* 1990;179:276-86.

73. Meng X, Chao J, Xiang Y. Identification from diverse mammalian poxviruses of host-range regulatory genes functioning equivalently to vaccinia virus C7L. *Virology* 2008;372:372-83.
74. Backes S, Sperling KM, Zwilling J, et al. Viral host-range factor C7 or K1 is essential for modified vaccinia virus Ankara late gene expression in human and murine cells, irrespective of their capacity to inhibit protein kinase R-mediated phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2alpha. *J Gen Virol* 2010;91:470-82.
75. Humlova Z, Vokurka M, Esteban M, Melkova Z. Vaccinia virus induces apoptosis of infected macrophages. *J Gen Virol* 2002;83:2821-32.
76. Engelmayer J, Larsson M, Subklewe M, et al. Vaccinia virus inhibits the maturation of human dendritic cells: a novel mechanism of immune evasion. *J Immunol* 1999;163:6762-8.
77. Yates NL, Alexander-Miller MA. Vaccinia virus infection of mature dendritic cells results in activation of virus-specific naive CD8+ T cells: a potential mechanism for direct presentation. *Virology* 2007;359:349-61.

10 Danksagung

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

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Ralf Wagner danke ich, dass ich meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe absolvieren durfte. Ich danke für die Bereitstellung des Themas, die finanzielle Unterstützung und die Betreuung meiner Arbeit.

Dr. med. Dipl. Ing. Josef Köstler danke ich sehr herzlich für die stets geduldige, tatkräftige Unterstützung und Betreuung meiner Doktorarbeit, gerade wenn es mal nicht so glatt gelaufen ist.

Ich bedanke mich bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, insbesondere bei Dr. Katharina Böckl, Dr. Denijal Kosovac, Dr. Helga Hofmann und Dr. Jens Wild für die stets freundliche Zusammenarbeit sowie die hilfreichen Ratschläge.

Vielen lieben Dank an Claudia und Philip für die Korrektur meiner Doktorarbeit.

Meinen Eltern und Geschwistern möchte ich ganz besonders danken, dass sie immer an mich glauben und mich jederzeit unterstützen.

Ich danke dir, Matthias, dass du jederzeit für mich da bist. Wir sind ein gutes Team.

11 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Untersuchungen zur Infektionseffizienz der HIV-Vakzinekandidaten EHV-C und NYVAC-C in über Monozyten generierten dendritischen Zellen“ ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

München, 13.01.2013

Julia Dobmeier