

# **Modulation der Immunogenität einer auf Gag, Pol und Nef basierenden HIV-1 Vakzine**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der  
naturwissenschaftlichen Fakultät III  
Biologie & Vorklinische Medizin  
der Universität Regensburg**



**vorgelegt von  
Simon Bredl aus Prackenbach  
April 2009**

Promotionsgesuch eingereicht am: 21.04.2009

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Ralf Wagner

Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. Charlotte Förster

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Hans Robert Kalbitzer

Prof. Dr. Ralf Wagner

Prof. Dr. Richard Warth

Die vorliegende Arbeit wurde selbstständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt.

---

Simon Bredl

**„Der Zweifel ist der Beginn der Wissenschaft. Wer nichts anzweifelt, prüft nichts. Wer nichts prüft, entdeckt nichts. Wer nichts entdeckt, ist blind und bleibt blind.“ Teilhard de Chardin**

**Meiner Familie**

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1. HIV-1</b> .....	<b>1</b>
1.1. Aufbau eines maturen HIV-1 Virions.....	2
1.2. Replikationszyklus .....	3
<b>2. Ansätze und Herausforderungen für eine HIV-1 Vakzine</b> .....	<b>7</b>
2.1. Virologische und immunologische Herausforderungen.....	7
2.2. Aktuelle Strategien für eine HIV-1 Vakzine .....	11
<b>3. Virus-ähnliche Partikel (VLP) als ein Ansatz für eine HIV-1 Vakzine</b> .....	<b>13</b>
3.1. Immunogenität von VLP-basierenden Vakzinen .....	14
3.2. <i>In vivo</i> Expression von VLP mittels auf Plasmid-DNA basierenden Vakzinen .....	15
3.3. Pseudotypisierung von VLP mit modifizierten Env-Varianten .....	15
<b>4. Verbesserung der Immunogenität von Vakzinen mit Hilfe von molekularen Adjuvantien</b> .....	<b>17</b>
4.1. <i>Toll-like receptor</i> (TLR) Agonisten als molekulare Adjuvantien .....	20
4.2. Bakterielle Toxine und ihre Derivate als molekulare Adjuvantien.....	21
4.3. Das kostimulatorische Molekül CD40 Ligand als molekulares Adjuvans .....	23
<b>5. Zielsetzung</b> .....	<b>25</b>
<b>Material &amp; Methoden</b> .....	<b>28</b>
<b>1. Material</b> .....	<b>28</b>
1.1. Bakterienstämme .....	28
1.2. Nährmedien für Bakterien.....	28
1.3. Plasmidvektoren.....	29
1.4. Optimierung und Herstellung synthetischer Gene .....	29
1.5. Oligonukleotide.....	30
1.6. Eukaryontische Zelllinie 293T .....	30
1.7. Nährmedien für 293T Zellen.....	31
1.8. Restriktionsenzyme.....	31
1.9. DNA-/ Protein- Molekulargewichtsstandards .....	31
1.10. Versuchstiere.....	31
1.11. Geräte.....	31
<b>2. Methoden</b> .....	<b>32</b>
2.1. Gentechnische Methoden.....	32
2.2. Zellkulturtechniken und Expressionsanalysen.....	39
2.3. Immunologische Analysemethoden .....	46

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>Ergebnisse.....</b>	<b>55</b>
<b>1. Generierung von HIV-1 Stamm C GagPolNef Konstrukten mit verschiedenen molekularen Eigenschaften .....</b>	<b>55</b>
1.1. HIV-1 Stamm C Pr55 <sup>Gag</sup> .....	56
1.2. HIV-1 Stamm C GagPolNef mit <i>frame shift</i> .....	59
1.3. HIV-1 Stamm C GagPolNef mit <i>frame shift</i> und aktiver Protease .....	61
1.4. HIV-1 Stamm C PolNef .....	65
1.5. Kurzzusammenfassung.....	66
<b>2.1. Immunologische Eigenschaften der GagPolNef Konstrukte im Balb/C Mausmodell.....</b>	<b>66</b>
2.1.1. Vergleich der immunologischen Eigenschaften des GagPolNef Durchlesekonstrukts mit dem <i>frame shift</i> Konstrukt.....	66
2.1.2. Einfluss der Myristylierung auf die Induzierung einer Gag-spezifischen Immunantwort.....	69
2.1.3. Vergleich der Immunantworten: Durchlesekonstrukt versus <i>frame shift</i> Konstrukt versus Einzelkonstrukte.....	72
2.1.4. Kurzzusammenfassung .....	75
<b>2.2. Immunologische Eigenschaften einer multivalenten Gag, PolNef und Env gp120 DNA Vakzine .....</b>	<b>75</b>
2.2.1. Vergleich der Immunogenität der <i>frame shift</i> GagPolNef Variante mit den Einzelkonstrukten Gag und PolNef in Kombination mit Env gp120 .....	75
2.2.2. Vergleich der Immunogenität verschiedener Mengen des Env gp120 Konstrukts bei einer Koimmunisierung mit Gag und PolNef .....	78
2.2.3. Räumliche Trennung der Applikation von 97CN54 Env gp120, 97CN001 Gag und 97CN54 PN .....	81
2.2.4. Kurzzusammenfassung .....	84
<b>3. CD40L als molekulares Adjuvans .....</b>	<b>84</b>
3.1. Konzipierung und Generierung verschiedener membranständiger CD40L Varianten .....	86
3.2. Pseudotypisierung von VLP mit CD40L.....	90
3.3. Mitogene Eigenschaften der CD40L Varianten .....	91
3.4. Adjuvanseigenschaften der partikelgebundenen CD40L Varianten hinsichtlich der Generierung Gag- und Env- spezifischer Immunantworten im Rahmen einer VLP basierten Immunisierungsstudie .....	97
3.5. Adjuvanseigenschaften von MegaCD40L bei der Generierung Gag- und Env-spezifischer Immunantworten im Rahmen einer DNA basierten Immunisierungstudie .....	105
3.6. Kurzzusammenfassung.....	112

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>Diskussion.....</b>	<b>113</b>
<b>1. HIV-1 Stamm C GagPolNef.....</b>	<b>113</b>
1.1. Einfluss der Aminosäuresubstitutionen in 97CN54 Pr55 <sup>Gag</sup> auf die Fähigkeit zur Bildung und Freisetzung virus-ähnlicher Partikel.....	113
1.2. Eigenschaften des <i>frame shift</i> GagPolNef Konstrukts .....	114
1.3. Eigenschaften <i>frame shift</i> GagPolNef Konstrukts mit aktiver Protease und Einfluss der Punktmutation G29 auf die Proteaseaktivität .....	114
1.4. Molekularbiologische Eigenschaften des 97CN54 PolNef Konstrukts.....	115
<b>2.1. Immunologische Eigenschaften der GagPolNef Konstrukte.....</b>	<b>116</b>
2.1.1. Verbesserte immunologische Eigenschaften durch Einfügen eines <i>frame shift</i> .....	116
2.1.2. Verbesserte immunologische Eigenschaften der myristylierten GagPolNef Konstrukte...	121
2.1.3. Verbesserte Eigenschaften hinsichtlich der Gag- und Pol-spezifischen Immunantworten durch Entkopplung des Gag vom PolNef Leserahmens.....	122
<b>2.2. Immunologische Eigenschaften einer multivalenten Gag, PolNef und Env gp120 DNA Vakzine .....</b>	<b>123</b>
2.2.1. Einfluss von Env gp120 bei Koimmunisierung mit Gag und PolNef oder mit GagPolNef auf die Gag- und Pol-spezifischen Immunantworten .....	123
2.2.2. Einfluss verschiedener Mengen an Env gp120 bei Koimmunisierung mit Gag und PolNef (IS4A) auf die Gag- und Pol-spezifischen Immunantworten .....	126
2.2.3. Einfluss von Env gp120 bei räumlich getrennter Koimmunisierung mit Gag und PolNef (IS4B) auf die Gag- und Pol-spezifischen Immunantworten .....	127
<b>3. CD40L als molekulares Adjuvans .....</b>	<b>127</b>
3.1. Charakterisierung der generierten CD40L Varianten .....	127
3.2. Molekulare Eigenschaften der CD40L pseudotypisierten virus-ähnlicher Partikel.....	129
3.3. Adjuvanseigenschaften der membrangebundenen CD40L Varianten bei VLP basierter Vakzine.....	129
3.4. Adjuvanseigenschaften von MegaCD40L bei Koapplikation mit Gag und Env gp145 als DNA Vakzine.....	130
<b>4. Ausblick.....</b>	<b>131</b>
4.1. Einfluss der aktiven Protease des 97CN001 GagPolNef (Myr+, FS, P+) Konstrukts auf die immunologischen Eigenschaften.....	131
4.2. Immunogenität der generierten GagPolNef Konstrukte im Kontext einer auf rekombinanten Vaccinaviren basierenden Vakzine .....	131
4.3. Immunologische Eigenschaften von 97CN001 GagPolNef VLP.....	132
4.4. Eignung des membrangebundenen MegaCD40L als molekulares Adjuvans.....	132
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>133</b>

# Inhaltsverzeichnis

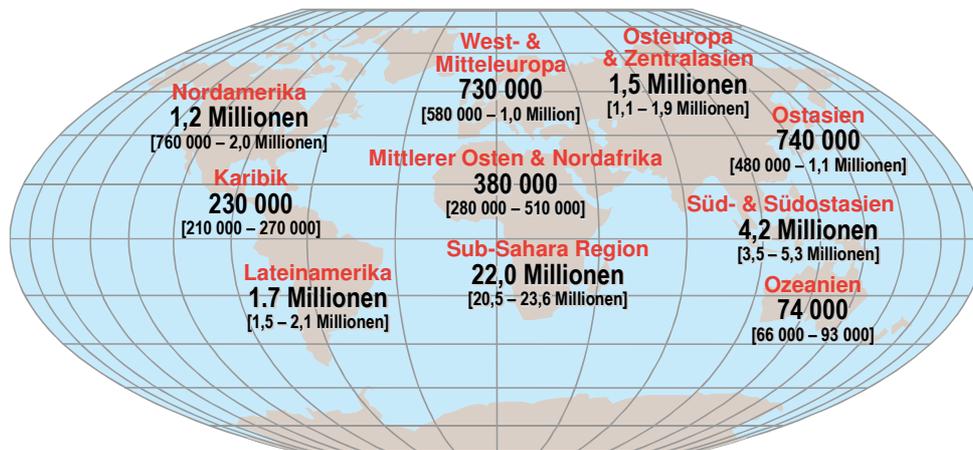
---

<b>Anhang.....</b>	<b>136</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>142</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>165</b>
<b>Curriculum Vitae.....</b>	<b>168</b>
<b>Publikationen &amp; Manuskripte.....</b>	<b>170</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>173</b>

## Einleitung

### 1. HIV-1

1981 wurde erstmals bei einer Gruppe homosexueller Männer mit schweren opportunistischen Infektionen die erworbene Immunschwäche AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) beschrieben. Schon bald vermutete man, dass ein Virus der Auslöser von AIDS ist. Zwei Jahre später konnten Luc Montagnier und Françoise Barré-Sinoussi einen Retrovirus aus Lymphozyten von AIDS-Patienten isolieren, das humane Immundefizienzvirus Typ-1 (HIV-1) <sup>1</sup>.



**Insgesamt: 33 Millionen (30 – 36 Millionen)**

**Abb. 1:** Übersichtskarte mit der Aufgliederung der weltweit HIV-1 infizierten Personen (UNAIDS Report 2007).

Die Herkunft von HIV-1 liegt im Dunklen, aber es gibt Hinweise, dass in den 30-iger oder 40-iger Jahren das Virus in Afrika von Affen auf den Menschen überggesprungen ist. So fand man in Schimpansen ein Immundefizienzvirus, SIVcpz, das mit HIV-1 sehr eng verwandt ist. Zudem konnte man in einer Serumprobe eines Angehörigen des Stammes der Bantu aus dem Jahre 1959 eine HIV-Variante isolieren, die dem SIVcpz sehr ähnlich war <sup>2, 3</sup>. Seitdem ist HIV immer mehr auf dem Vormarsch; 2006 waren etwa weltweit 39,5 Millionen Menschen infiziert und seit der ersten Diagnose 1981 starben etwa 20 Millionen Menschen an AIDS. Vor allem Afrika ist stark von der Epidemie betroffen, besonders die Sub-Sahara Regionen; dort sind etwa 25 Millionen Menschen mit HIV infiziert.

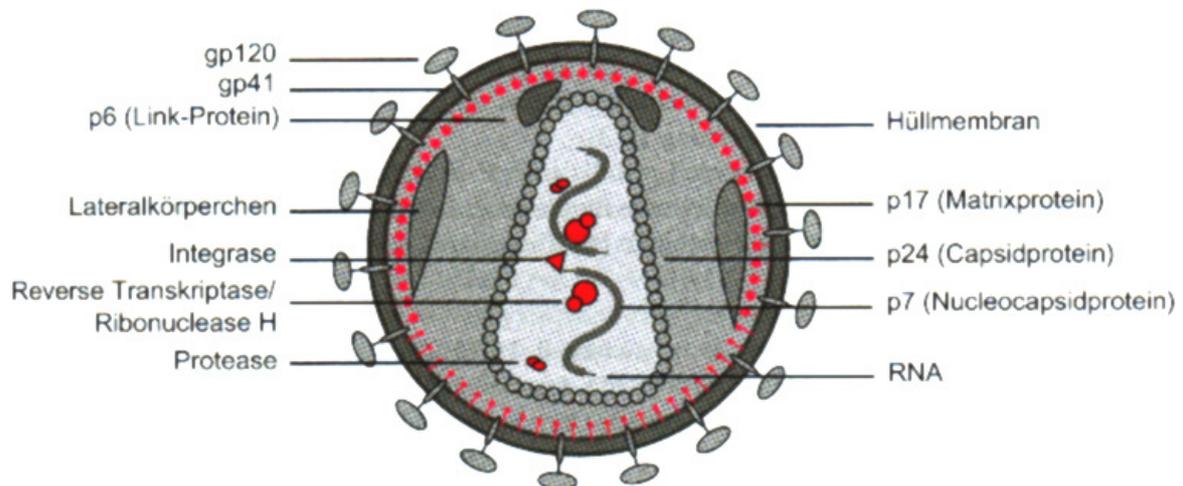
Aber auch in Asien nahm die Zahl der Infizierten in den letzten Jahren stark zu. Es wird vor allem immer wichtiger, neben einer verstärkten Aufklärung und der

# Einleitung

Schaffung eines Zugangs zu billigen Medikamenten für die Behandlung von AIDS und HIV für die dritte Welt, einen Impfstoff zu entwickeln, um die Zahl der Neuinfizierten von weltweit etwa 4,3 Millionen zumindest zu reduzieren (UNAIDS Report 2006).

## 1.1. Aufbau eines muren HIV-1 Virions

HIV-1 ist ein Retrovirus (kurz für **Reverse Transkriptase Onkavirus**) und gehört dem Genus Lentivirus an. Infektionen mit Lentiviren weisen im Allgemeinen einen chronischen Verlauf, eine lange Periode klinischer Latenz und eine persistierende Virusreplikation auf und betreffen unter anderem auch das zentrale Nervensystem.



**Abb. 2:** Schematische Darstellung eines muren HIV-1 Virions. Im Inneren befindet sich das konische Capsid. Dieses ist aus den Capsidproteinen p24 aufgebaut und enthält zwei RNA-Genome die mit den Nucleocapsidproteinen p7 komplexiert sind und die alle Charakteristika einer zellulären mRNA besitzen. Eine Hüllmembran umgibt das Capsid, welche die externen und transmembranen Glykoproteine gp120 und gp41 enthält. An der Innenseite der Membran ist das Matrixprotein p17 assoziiert. Das Link-Protein p6 stellt eine Verbindung zwischen Membran und Capsid her. Die Lateralkörperchen bestehen hauptsächlich aus Matrixproteinen und sind vermutlich elektronenmikroskopische Artefakte (Molekulare Virologie; Modrow, Falke und Truyen; 2. Auflage 2003, Spektrum Verlag).

HIV-1 Partikel besitzen einen Durchmesser von 100 nm und sind mit einer Lipidmembran umgeben (siehe Abb. 2). Jedes Viruspartikel enthält 72 Glykoproteinkomplexe, die in der Membran verankert sind und aus Trimeren des externen Glykoprotein gp120 und dem transmembranen Protein gp41 bestehen. Beide Proteine werden als gemeinsames Vorläuferprotein gebildet und sind nach Spaltung in die beiden Komponenten nicht mehr kovalent miteinander verbunden. Während des Knospungsprozesses können auch membranassoziierte Proteine der

## Einleitung

---

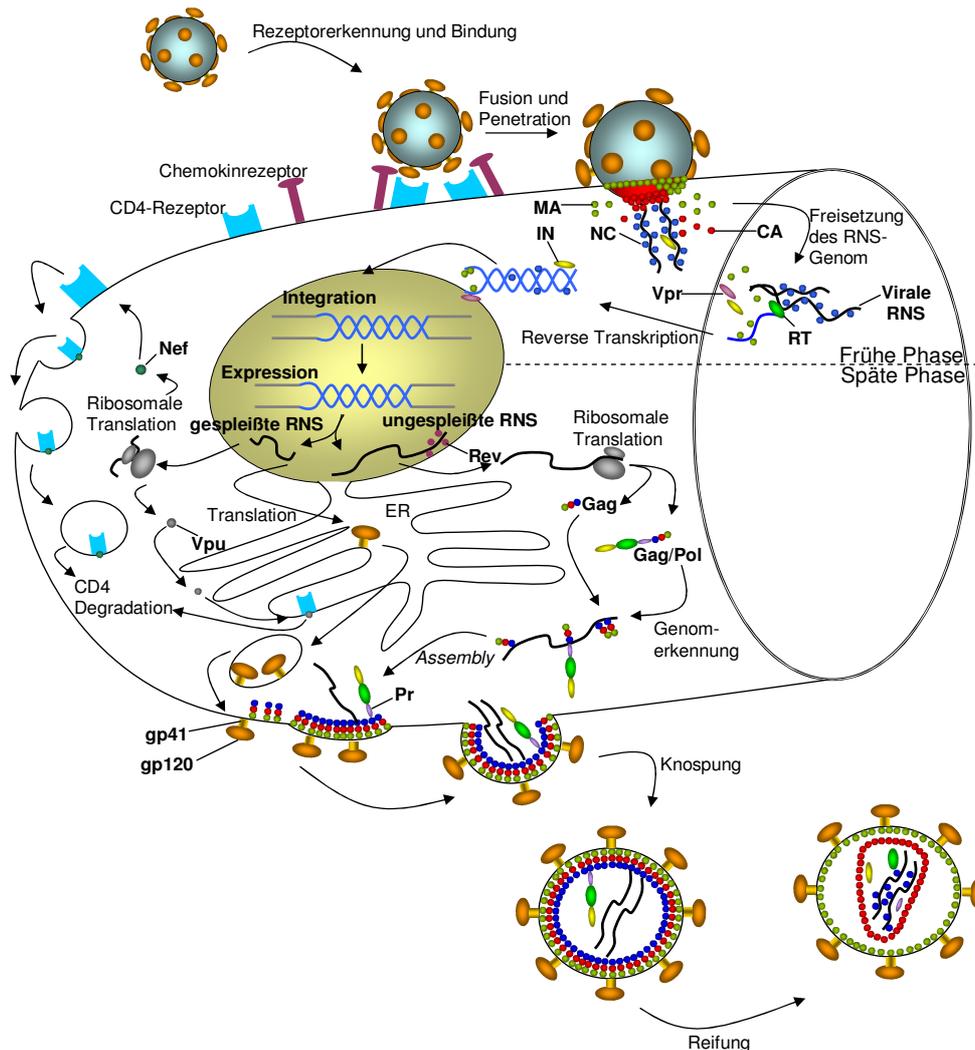
Wirtszelle, z.B. HLA I und II Proteine oder Adhäsionsproteine wie ICAM-1, mit in die Hülle aufgenommen werden.

An der Innenseite der Hüllmembran ist das Matrixprotein p17 über aminoterminal angefügte Myristinsäurereste verankert. Die p17-Proteine liegen als Trimere vor und bilden eine netzartige Proteinschicht, die dem Partikel eine isometrische Struktur verleiht. Im Partikelinneren befindet sich das sogenannte Capsid. Dieses besteht aus dem p24-Protein und ist über das Link-Protein p6 mit der p17-Matrix, und damit mit der Membran verbunden. Das Capsid weist eine konische Form auf und enthält zwei identische Moleküle einzelsträngiger RNA als Virusgenom. Die HIV-1 RNA ist Teil eines Protein-Nukleinsäure-Komplexes, der aus dem Nucleoprotein p7 und der Reversen Transkriptase (RT) besteht. Für die Virusreplikation wird zudem noch eine Integrase p32 und eine Protease p11 benötigt. Das Transaktivatorprotein Tat und das regulatorische Rev-Protein spielen bei der Steuerung des Replikationszyklus eine bedeutende Rolle. Die akzessorischen Proteine Vif, Vpr, Vpu und Nef besitzen verschiedene Funktionen. Diese greifen in verschiedene Signalkaskaden der infizierten Zellen ein. So sind sie beispielsweise am Transport des Präintegrationskomplexes in den Zellkern und der Freisetzung infektiöser Nachkommenviren beteiligt und beeinflussen die Infektiosität der entstehenden Viruspartikel.

### **1.2. Replikationszyklus**

Der Replikationszyklus von HIV-1 lässt sich in eine frühe und in eine späte Phase unterteilen. Die frühe Phase beginnt mit der Erkennung der Zielzelle durch das reife Virus und umfasst alle Prozesse bis hin zur Integration des viralen Genoms ins Wirtsgenom. Die späte Phase beginnt mit der regulierten Expression der proviralen Gene und beinhaltet alle Vorgänge über die Virusabschnürung bis hin zur Reifung der Viruspartikel (siehe Abb. 3).

# Einleitung



**Abb. 3:** Replikationszyklus von HIV-1. Die frühe Phase (oberer Teil der Darstellung) beginnt mit der Erkennung des CD4-Rezeptors und umfasst alle Ereignisse bis hin zur Integration der proviralen DNA in das Wirtsgenom. Die späte Phase beinhaltet alle Ereignisse von der Transkription der integrierten DNA bis hin zur Virusknospung und Reifung (Structural Biology of HIV; B. G. Turner und M. F. Summers; J. Mol Biol. (1999) 285, 1 – 32); CA: Capsidprotein (p24); ER: Endoplasmatisches Retikulum; IN: Integrase (p32); MA: Matrixprotein (p17); NC: Nucleoprotein (p7); Pr: Protease (p11); gp41, gp120: Untereinheiten von Env; RT: Reverse Transkriptase; Gag: Gruppenspezifische Antigene.

## 1.2.1. Frühe Phase

HIV-1 Partikel binden spezifisch an Zellen, die das CD4 Protein auf ihrer Oberfläche tragen. Die Bindung beruht auf spezifischen Interaktionen zwischen dem externen Haupthüllprotein gp120 und der N-terminalen Immunglobulindomäne des CD4-Proteins. Diese Interaktion ist wichtig für die Bindung, aber nicht für die Penetration und Fusion des Viruspartikels mit der Zielzelle. Anders als andere Retroviren benötigen Lentiviren, die Primaten infizieren, zusätzliche Zelloberflächenproteine um die Fusion der viralen Membran mit der zellulären einleiten zu können. Die Membranfusion bei HIV-1 wird beispielsweise durch Wechselwirkung der V3-Schleife

## Einleitung

---

von gp120 mit einem Korezeptor aus der Familie der CXCR4- und CCR5-Chemokinrezeptoren eingeleitet<sup>4, 5, 6, 7</sup>.

Nach der Membranverschmelzung gelangt das Capsid, das neben den beiden einzelsträngigen RNA-Genomen auch die Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Protease und Integrase enthält, ins Zellinnere. Die reverse Transkription, d.h. das Umschreiben der viralen RNA in doppelsträngige DNA, wird im Zytosol durch die RT katalysiert. Das akzessorische Vif-Protein spielt bei diesen frühen Prozessen eine wichtige Rolle, indem es in die initialen Stadien der reversen Transkription unterstützend eingreift. Die RT-abhängige DNA-Synthese wird dann durch das Binden der tRNA<sup>Lys</sup> initiiert<sup>8, 9, 10, 11, 12</sup>.

Nach der Synthese der viralen DNA wird diese als Bestandteil eines Präintegrationskomplexes, der die viralen Proteine Integrase, p17, RT und Vpr, aber auch das zelluläre Protein HMB-I(Y)<sup>13</sup> umfasst, in den Zellkern transportiert. Das p24 (CA) scheint bei HIV-1 kein Bestandteil des Präintegrationskomplexes zu sein, obwohl es bei anderen Retroviren in dem Komplex enthalten ist<sup>14</sup>. Die Kernlokalisierung des Komplexes wird durch das Vpr-Protein gesteuert<sup>15, 16</sup>, indem es den Präintegrationskomplex mit zellulären Kernimportvorgängen koppelt<sup>17, 18, 19</sup>. Vpr greift zusätzlich in den Zellzyklus ein, indem es die infizierte Zelle in der G2 Phase arretiert<sup>20</sup>. Nach dem aktiven Transport in den Nukleus wird die virale DNA durch die Aktivität der Integrase stabil in das Wirtsgenom integriert.

### 1.2.2. Späte Phase

Die späte Phase des viralen Lebenszyklus wird mit der Synthese von ungespleißten und gespleißten mRNA-Transkripten und deren Export aus dem Zellkern eingeleitet. Hierbei werden anfangs kurze, gespleißte RNA-Spezies synthetisiert, die für die regulatorischen Proteine Tat, Rev und Nef kodieren. Tat ist ein essentieller Transaktivator, der an das sogenannte TAR-Element (*transactivating response element*), einer Schleife des naszierenden RNA Transkripts, bindet und die zellulären Proteine Cyclin T und die Cyclin-abhängige Proteinkinase 9 (Cdk9) rekrutiert. Cyclin T bindet direkt an Tat und erhöht damit dessen Affinität und Spezifität für die TAR RNA<sup>21</sup>. Cdk9 phosphoryliert dann den RNA-Polymerase II Transkriptionskomplex, wodurch die Elongation der Transkription ermöglicht wird<sup>22, 21</sup>.

Normalerweise verbleiben ungespleißte zelluläre mRNA-Moleküle im Nucleus bis sie weiter prozessiert oder degradiert werden. Bei HIV hingegen werden aber

## Einleitung

---

ungespleißte bzw. einfach gespleißte mRNA-Spezies im Zytoplasma für die Gag- und Gag/Pol-Synthese oder für die Verpackung in neue Viruspartikel benötigt. Der Transport solcher mRNA-Moleküle wird durch das Rev-Protein vermittelt. Rev bindet an das RRE Element (rev responsive element, Rev Interaktionselement der viralen RNA) von ungespleißten bzw. einfach gespleißten mRNA-Molekülen und rekrutiert das zelluläre Protein Exportin-1<sup>23</sup> und den Kernexportfaktor Ran-GTPase, der mit GTP gebunden ist<sup>24</sup>. Dieser Komplex wird dann durch eine Kernpore ins Zytosol transportiert, wo das GTP zu GDP hydrolysiert wird. Daraufhin disaggregiert der Komplex und das Rev-Protein wird aufgrund seines Kernlokalisierungssignals wieder zurück in den Kern transportiert<sup>25</sup>. Auf diese Art und Weise fungiert Rev als Schalter zwischen der frühen Synthese und dem Export mehrfach gespleißter mRNA-Spezies, die für Tat, Rev und Nef kodieren, und der späten Synthese und dem Export von ungespleißten bzw. einfach gespleißten mRNA-Molekülen, die für Gag und Gag/Pol bzw. für Env, Vpu, Vif und Vpr kodieren.

Das Env-Vorläuferprotein gp160 wird am endoplasmatischen Reticulum (ER) synthetisiert und oligomerisiert zu trimeren Strukturen, die stark glykosiliert sind<sup>26, 27, 28</sup>. Env wird posttranslational im ER und im Golgi-Apparat modifiziert und anschließend durch eine Furinprotease gespalten, wobei der gp41-gp120 Glykoproteinkomplex entsteht. Dieser Komplex wird dann zur Zelloberfläche transportiert, wo er für den Zusammenbau der Viruspartikel zur Verfügung steht. Da sowohl das CD4-Protein als auch die HIV Hüllproteine im ER synthetisiert werden, würde eine frühzeitige Bindung von CD4 an Env dessen Translokation zur Zellmembran und die Bildung eines funktionellen gp41-gp120 Glykoproteinkomplexes behindern<sup>29</sup>. Das akzessorische Protein Vpu verhindert dies, indem es an CD4-Moleküle bindet und deren Abbau durch Ubiquitylierung im Proteasom einleitet<sup>30, 31, 32</sup>. Gleichzeitig werden CD4-Moleküle, die sich bereits auf der Zelloberfläche befinden, in Endosomen degradiert. Dieser Vorgang wird durch Nef gesteuert, das neben CD4 auch an den AP-2 Adapterkomplex bindet und die Bildung sogenannter *clathrin-coated pits* stimuliert<sup>33, 34, 35, 36</sup>. Die Herabregulierung der CD4-Moleküle auf der Zelloberfläche erschwert eine Überinfektion mit weiteren HI-Viren und zudem wird die T-Helfer Zelle in ihrer Funktionalität eingeschränkt.

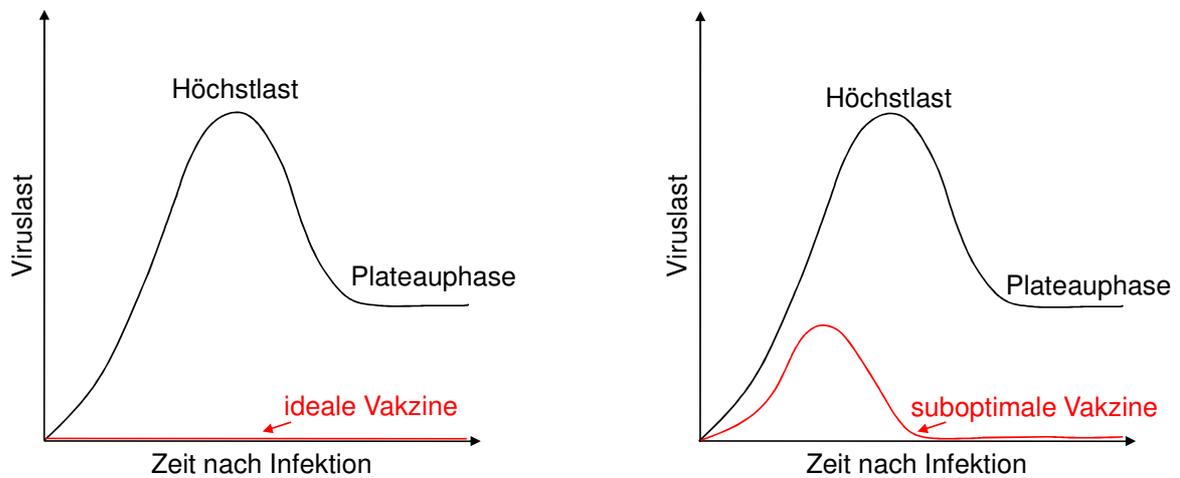
Das Pr55<sup>Gag</sup>-Protein wird von der ungespleißten mRNA-Spezies an den Ribosomen synthetisiert. Durch eine translationelle Leserasterverschiebung werden kleine Mengen des Gag/Pol-Vorläuferproteins gebildet, die zusammen mit Pr55<sup>Gag</sup> an der

Zellmembran aggregieren. Die N-terminale, myristylierte Domäne des p17 bindet direkt an die Membran<sup>37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52</sup> und interagiert mit der zytoplasmatischen Domäne von gp41<sup>41, 43, 48, 49, 53, 54, 55, 56</sup>. Schätzungsweise 1500 bis 2000 Gag-Moleküle knospen von der Zelloberfläche und bilden ein unreifes Viruspartikel, das zwei Kopien des viralen Genoms enthält. Nach dem Knospen des Partikels werden die Vorläuferproteine durch die virale Protease in die einzelnen Untereinheiten gespalten. Während des Reifungsprozesses lagern sich die Strukturproteine um und bilden das infektiöse Viruspartikel.

## **2. Ansätze und Herausforderungen für eine HIV-1 Vakzine**

### **2.1. Virologische und immunologische Herausforderungen**

Das Ziel einer HIV-1 Vakzine ist einerseits eine Infektion zu verhindern oder nach Infektion die Viruslast zu reduzieren und die Krankheitsprogression aufzuhalten (siehe Abb. 4). Dennoch konnte trotz immenser Anstrengungen bis jetzt noch keine prophylaktische HIV-1 Vakzine entwickelt werden<sup>57</sup>. Die größte Hürde dürfte die große Variabilität von HIV-1 sein. Aufgrund der hohen Fehlerquote der Reversen Transkriptase hat sich die HIV-1 M-Gruppe sowohl in neun divergierende Stämme als auch in mehrere zirkulierende rekombinante Formen aufgefächert. So kann zum Beispiel die Aminosäuresequenz des Env Proteins sich bis zu 20 % innerhalb eines Virusstamms und über 35 % zwischen den Stämmen unterscheiden<sup>58, 59</sup>. Ein Immunogen für eine Vakzine muss also der großen viralen Diversität gerecht werden und der Impfschutz wird von der Kapazität des Immunsystems zu Kreuzreaktionen mit verschiedenen heterologen Viren abhängen.



**Abb. 4:** Anforderungen die an einen HIV-1 Impfstoff gestellt werden. Nach Infektion vermehrt sich das HI-Virus exponentiell bis zur Höchstlast und wird dann in seiner Replikation vom Immunsystem kontrolliert aber nicht gänzlich unterdrückt (Plateauphase). Ein idealer Impfstoff (links) würde vor einer Infektion schützen und eine sterile Immunität vermitteln. Eine suboptimale Vakzine (rechts) würde das Niveau der Höchstlast und der Plateauphase der viralen Vermehrung senken (adaptiert nach Barouch *et al.* <sup>57</sup>).

Obwohl bereits kreuzreaktive humorale und zelluläre Immunantworten gegen konservierte Regionen des Virus beschrieben wurden, ist es absehbar, dass die protektive Effizienz eines Impfstoffes mit steigender Diskrepanz zwischen Immunogen und infizierendem Virus abnimmt.

Eine weitere Herausforderung ist der Mangel an klar definierten Korrelaten einer schützenden Immunantwort, denn HIV-1 Infizierte sind nicht in der Lage das Virus komplett zu kontrollieren und zu vernichten. Zwar gibt es aus Primatenstudien und aus Studien mit Patienten, die die Virusreplikation spontan kontrollieren können, Hinweise auf schützende Immunantworten, aber Korrelate hierfür können nur im Rahmen erfolgreicher Immunisierungsstudien im Menschen bezüglich der Vakzineeffizienz definiert werden <sup>60</sup>.

### 2.1.1. HIV-1 spezifische humorale Immunantworten

Für viele lizenzierte Impfstoffe stellen virusspezifische, neutralisierende Antikörper das Korrelat einer schützenden Immunantwort dar. Fortschritte in dem Verständnis für die Env Struktur und Funktion ermöglichten es zu begreifen, warum die Induktion von breit neutralisierenden, HIV-1 spezifischen Antikörpern so schwierig ist <sup>61</sup>. Das HIV-1 Glykoprotein Env liegt, wie in Kapitel 1.1. beschrieben, als Trimer auf der Oberfläche des Virions vor und ist extensiv N-verknüpft glykosiliert. Hierdurch werden konservierte Bereiche vor der Erkennung durch Antikörpern geschützt <sup>62, 63</sup>.

## Einleitung

---

Zudem könnte durch die Induktion von Antikörper, die für hochvariable Domänen des Env Glykoproteins spezifisch sind, die Bildung von Antikörper gegen die konservierten Bereiche fehlgeleitet werden <sup>64</sup>. Desweiteren werden konservierte Schlüsseldomänen, wie die Bindestelle für den Chemokinkorezeptor, nur dann ausgebildet und zugänglich, wenn das Env Protein an CD4 bindet. Zudem unterliegen diese dabei noch starken Konformationsänderungen <sup>65</sup>. Für Mutationen in diesen N-verknüpften Glykanen konnte gezeigt werden, dass diese zu einer schnellen Evasion des Virus vor neutralisierenden Antikörpern führen <sup>66, 67</sup>.

Trotzdem konnten in einer kleinen Gruppe von HIV-1 infizierten Patienten breit kreuzneutralisierende Antikörper gefunden werden und diese waren hauptsächlich gegen konservierte Regionen des Env Glykoproteins, wie die CD4 Binderegion, gerichtet <sup>68</sup>. Der kreuzreaktive, monoklonale Antikörper b12 bindet ebenfalls an die CD4 Binderegion, was impliziert, dass diese Region von Env einen verwundbaren Punkt darstellt und potentiell für neutralisierende Antikörper zugänglich ist <sup>69</sup>. Dennoch ist die CD4 Bindedomäne aufgrund ihrer räumlichen Lage schwer zugänglich für die Erkennung durch Antikörper. Eine weitere konservierte Region ist eine nahe der Membran gelegene, externe Domäne des gp41 (*membrane-proximal external region*: MPER), welche durch die breitneutralisierenden, monoklonalen Antikörper 2F5 und 4E10 erkannt wird. Dennoch erschweren verschiedene Gründe die Induktion MPER spezifischer Antikörper. So liegt ein Teilepitop in der Lipidmembran <sup>70</sup> und daher greift hier Toleranzkontrolle und Immunregulation <sup>71</sup>, zudem ist das Epitop nur transient während des Viruseintritts in die Wirtszelle verfügbar <sup>72</sup> bzw. eine Kombination mehrerer dieser Faktoren behindern die Induktion solcher Antikörper. Die Entwicklung von Immunogenen, die breitneutralisierende Antikörper induzieren, dürfte somit die höchste Priorität in der HIV-1 Vakzine Forschung haben <sup>61</sup>. In Machbarkeitsstudien mit Primaten konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung von hohen Dosen breitneutralisierender Antikörper einen sterilen Schutz vor Infektion bietet und so das Potenzial einer virusspezifischen, humoralen Immunantwort aufzeigte <sup>73, 74</sup>. Dennoch konnten mit Hilfe eines Impfstoffes bis jetzt noch keine derartigen breitneutralisierenden Antikörper induziert werden. Obwohl es große Fortschritte im Verständnis für die Env-Struktur und Funktion gab, gibt es momentan keine Vakzineandidaten für klinische Studien, die auf eine Induktion breitneutralisierender Antikörper abzielen <sup>75</sup>. Die Env-Antigene der nächsten Generation müssen daher maßgeschneiderte

## Einleitung

---

Antigene sein. So werden Strategien verfolgt, welche die Herstellung von biochemisch stabilisierten Env-Trimeren, von Env Immunogenen, die in definierten Konformationen vorliegen, beinhalten. In anderen Ansätzen werden Kombinationen konservierter Epitope der neutralisierenden Antikörper auf Fremdproteinen verwendet, oder Methoden entwickelt, um Immunregulationen zu umgehen. Desweiteren werden Immunogene so konzipiert, dass diese spezifisch auf bestimmte Regionen wie die CD4 Bindedomäne, die MPER Region und konservierten Domänen in der V3 Schleife abzielen. Die Relevanz anderer Effektorfunktionen wie Antikörper-abhängige, Zell-vermittelte Virusinhibition, Komplementaktivierung und Phagozytose werden ebenso untersucht <sup>76</sup>.

### 2.1.2. Zellvermittelte HIV-1 spezifische Immunität

Viruspezifische T-Zellantworten scheinen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Replikation von HIV-1 zu spielen. Aus diesem Grund wurden diese intensiv für die Entwicklung von Impfstrategien untersucht. Frühe Studien zeigten, dass während der akuten Phase der Virusreplikation CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten induziert werden, die mit einer initialen Kontrolle der Primärvirämie durch das Immunsystem einhergeht <sup>77, 78, 79</sup>. Starke zelluläre Immunantworten konnten auch in Patienten, die die virale Replikation kontrollieren konnten, – den sogenannten *long-term non-progressors* (LTNP) – nachgewiesen werden <sup>80</sup>. Zudem konnten spezifische HLA-Allele und die Breite der Gag-spezifischen T-Zellantworten mit einer Kontrolle der Virusreplikation korreliert werden <sup>81, 82</sup>. In Einklang mit diesen Beobachtungen konnte gezeigt werden, dass in Rhesusaffen eine Depletion von CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten die Kontrolle der Replikation des *Simian Immunodeficiency Virus* (SIV) unterband <sup>83, 84</sup>.

Eine Limitation der viruspezifischen T-Zellantworten ist die hohe Entstehungshäufigkeit von Mutationen in jenen Proteindomänen, die Epitope für die T-Lymphozyten beinhalten, und es so dem Virus ermöglichen einer zellulären Immunantwort auszuweichen <sup>85, 86, 87</sup>. Eine breite Antwort Epitop-spezifischer T-Zellantworten müsste demnach nicht nur die große Bandbreite der HIV-1 Diversität abdecken, sondern auch die Evasionsmöglichkeiten des Virus bezüglich der Erkennung durch T-Lymphozyten minimieren. Zudem könnten die, durch die Vakzine induzierten, zellulären Immunantworten durch Grenzen in der Immundominanz und durch die natürliche Präferenz der T-Lymphozytenantworten sich auf eine begrenzte Anzahl von Epitopen zu konzentrieren beschränkt werden.

## Einleitung

---

Aktuelle Fortschritte in der Charakterisierung von T-Zellantworten mit Hilfe der Multiparameter Durchflusszytometrieanalyse konnten funktionelle Unterschiede von virusspezifischen T-Lymphozyten hinsichtlich der Zytokinsekretion, Degranulation, Proliferation und anderen Effektorfunktionen bei verschiedenen Subpopulationen von Effektor- und Gedächtnis-T-Lymphozyten zeigen. Es scheint, dass die Messung der Gesamtheit der T-Zellantworten relevanter für Analyse der impfinduzierten zellulären Antworten ist, als die Messung der Interferon- $\gamma$  Sekretion mittels Enzyme-linked Immunospot (ELISpot) alleine<sup>88</sup>. So konnten polyfunktionelle T-Lymphozyten, die in der Lage waren mehrere Funktionen auszuüben, in LTNP<sup>89</sup>, in Personen, die mit Vaccinaviren geimpft wurden<sup>90</sup>, und innerhalb präklinischer Studien<sup>91</sup> nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen implizieren, dass die Breite<sup>92</sup> und die Qualität<sup>93</sup> der T-Zellantworten ebenso kritisch sein könnten wie die Stärke dieser Antworten.

Die größte Limitation von Vakzine-induzierten, zellulären Immunantworten ist, dass sie wahrscheinlich nicht vor einer HIV-1 Infektion schützen. Da das HI-Virus sehr schnell latente Reservoirs im Körper etabliert, werden impfinduzierte T-Zellantworten wahrscheinlich nicht in der Lage sein eine lebenslange Infektion zu verhindern<sup>94, 95</sup>. Mehr noch scheint es unklar, ob die durch die Vakzinierung induzierten T-Lymphozyten in Lage sind, trotz der immunpathologischen Vorgänge innerhalb der ersten Tage einer akuten HIV-1 Infektion rasch zu reagieren. Denn HIV-1 infiziert innerhalb der ersten vier bis zehn Tage der Infektion HIV-1 spezifische CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten<sup>96</sup> und depletiert schnell die meisten der CD4<sup>+</sup> T- Gedächtniszellen in den darmassoziierten, lymphatischen Geweben<sup>97, 98, 99</sup>. Dies schafft die Voraussetzungen für eine fortschreitende Immundefizienz als auch für eine chronische Immunaktivierung, welche zumindest zum Teil aus einer mikrobiellen Translokation entlang der geschädigten Darmmucosa resultiert<sup>100</sup>. Da die Expansion der impfinduzierten CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten nach Infektion eine gewisse Zeit benötigt, wird es schwierig für die virusspezifischen T-Lymphozyten diese frühen immunpathologischen Ereignisse komplett zu unterbinden<sup>98</sup>.

## **2.2. Aktuelle Strategien für eine HIV-1 Vakzine**

### 2.2.1. Herkömmliche Strategien

Die aktuellen Impfstrategien für HIV-1 können in herkömmliche und neuartige Impfstrategien (siehe Tabelle 1) unterteilt werden. Herkömmliche Impftechnologien

# Einleitung

umfassen lebend attenuierte Viren, ganze inaktivierte Viren und Proteinkomponenten.

Aktuelle HIV-1 Impfstrategien
<b>Herkömmliche Strategien</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Lebend attenuierte Viren</li><li>• Inaktivierte Viren</li><li>• Proteinkomponenten</li></ul>
<b>Neuartige Strategien</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Plasmid DNA Vakzine</li><li>• Rekombinante, virale Vektoren</li></ul>

**Tabelle 1:** Übersicht aktueller HIV-1 Impfstrategien (adaptiert nach Barouch *et al.* <sup>5/</sup>).

Obwohl diese Ansätze sehr erfolgreich für die Entwicklung von Vakzinen gegen andere Viren waren, sind sie im Falle von HIV-1 weniger nützlich. Lebend attenuierte Viren hatten im Falle von SIV in Rhesusaffen eine hohe protektive Effizienz <sup>101, 102</sup>, aber deren Einsatz im Menschen ist aufgrund hoher Sicherheitsbedenken äußerst unwahrscheinlich <sup>103, 104, 105</sup>. Inaktivierte Viren <sup>106</sup> und Proteinuntereinheiten <sup>107, 108</sup> hingegen sind nicht in der Lage breitneutralisierende Antikörper- und CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten zu induzieren. Neuere Daten lassen aber darauf schließen, dass die Effizienz von Immunogenen, die auf Proteinuntereinheiten basieren, durch *Toll-like Receptor* (TLR) Adjuvantien gesteigert werden kann <sup>109, 110</sup>.

## 2.2.2. Neuartige Strategien

Zu den neuartigen Impfstrategien gehören DNA-Vakzine und rekombinante, virale Vektoren, die für die HIV-1 Antigenexpression entwickelt wurden. Impfstoffkandidaten, die auf Plasmid-DNA basieren, sind vielversprechend hinsichtlich Einfachheit und Vielseitigkeit, aber normalerweise sind multiple Injektionen hoher Dosen der DNA Vakzine notwendig, um messbare Immunantworten in Primaten und Menschen zu induzieren <sup>111, 112</sup>. Deswegen wurde verstärkt an der Entwicklung von Adjuvantien für DNA Impfstoffe <sup>113, 114</sup> und an verbesserten Applikationstechniken, z.B. die *in vivo* Elektroporation <sup>115, 116</sup>, gearbeitet. Rekombinante, virale Vektoren umfassen attenuierte oder replikationsinkompetente Viren wie Adenoviren <sup>117, 118, 119</sup> oder Pockenviren <sup>120, 121</sup>. Virale Vektoren, die entweder alleine oder in Kombination mit heterologen DNA Vakzinen in verschiedenen Immunisierungsansätzen (unterschiedliche *Prime/Boost*

Strategien), werden bereits in klinischen Studien eingesetzt. Auch die Eignung anderer viraler Vektoren wie das Vesikuläre Stomatitis Virus (VSV), das adenoassoziierte Virus (AAV), das venezuelanische Equine Herpesvirus (EHV), das Cytomegalovirus (CMV), das Herpes-simplex und das Masern Virus, wird untersucht. Desweiteren werden auch bakterielle und mykobakterielle Vektoren, wie *Salmonella*, *Listeria* und Bacille Calmette-Guerin (BCG) bezüglich ihrer Anwendbarkeit als Vektoren getestet <sup>122</sup>.

### **3. Virus-ähnliche Partikel (VLP) als ein Ansatz für eine HIV-1 Vakzine**

Von den in Kapitel 2.2. vorstellten Strategien für eine HIV-1 Vakzine soll aufgrund des Bezugs zu der vorliegenden Arbeit der Ansatz mit Virus-ähnlichen Partikeln (*virus-like particles*, VLP) näher vorgestellt werden. Dieser stellt eine Zwischenstufe der herkömmlichen und neuartigen Vakzineansätze dar, denn VLP können entweder als Proteinkomplexe oder kodiert als Plasmid-DNA appliziert werden.

VLP oder „Pseudovirionen“ unterscheiden sich von lebend attenuierten Viren durch ihr Unvermögen zu einer produktiven, viralen Infektion. Sie besitzen die Fähigkeit zur Selbstassemblierung, können sich jedoch nicht replizieren, sind nicht pathogen, beinhalten oftmals kein Genom und sind in Form und Größe ähnlich intakter Virionen <sup>123</sup>. Im Falle der Lentiviren müssen VLP für die Partikelassemblierung, für das Knospen und für die Partikelfreisetzung von der Wirtszelle p24 (HIV) oder p27 (SIV) besitzen. Jeder Partikel wird von einer Lipidhülle ummantelt, die noch von der Wirtszelle stammt. Die Expression von Gag-Genprodukten reicht aus, um Partikel zu formieren und deshalb bilden alle HIV-1 Vakzine, welche das *gag* Gen *in vivo* exprimieren, diese Pseudovirionen <sup>123</sup>.

In vielen VLP-basierenden Vakzinestrategien wird auf die virale Integrase und Nukleotidelemente in der LTR-Region verzichtet, um eine Integration des verpackten Genoms in die Chromosomen der Wirtszelle und/oder eine Rekombination mit Viren in einem infizierten Patienten zu verhindern.

Ein weiterer Vorteil dieser Partikel ist, dass man mehrere virale Proteine kombinieren kann um VLP zu erzeugen. So kann man das Gag-Pol Polyprotein (Gag<sub>160</sub>) verwenden, das Strukturproteine (p17, p24 und p6) und virale Enzyme (Pr, RT und IN) beinhaltet. Nur die virale Protease muss ausreichend exprimiert werden, um das

Vorläuferpolyprotein in die Subkomponenten zu spalten und die Assemblierung zu VLP zu gewährleisten<sup>123</sup>.

Lentivirus-ähnliche Partikel können mit einer Reihe von Methoden wie dem Baculovirus- oder Vaccina-Expressionssystem<sup>124, 125, 126, 127, 128</sup>, einem Hefeexpressionssystem<sup>129, 130</sup> oder durch transiente Transfektion von Säugerzellen<sup>131</sup> produziert und dann aufgereinigt werden<sup>132</sup>.

### 3.1. Immunogenität von VLP-basierenden Vakzinen

Lentivirus-ähnliche Partikel, wenn sie als aufgereinigte VLP verabreicht oder mittels Plasmid-DNA oder viralem Vektor *in vivo* exprimiert werden, sind in der Lage spezifische mukosale und systemische Immunantworten zu induzieren<sup>126, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 128, 120, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 131, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162</sup>. Der größte Vorteil der VLP basierten Vakzine gegenüber lebend attenuierten Viren ist, dass man mit diesen ohne die vielen schädlichen Nebeneffekte der attenuierten Viren eine Vielzahl von Epitopen exprimieren kann. VLP haben zudem das Potential sowohl den endo- als auch den exogenen Antigenprozessierungs- und Präsentationsweg zu aktivieren, was die Präsentation viraler Peptide sowohl auf MHC-I als auch auf –II Molekülen ermöglicht. Diese Multi-Epitop Impfstoffe sind eher als ihre Pendants, die nur einzelne Komponenten enthalten, in der Lage breitneutralisierende Immunantworten zu induzieren. Ein weiterer Vorteil von VLP gegenüber Impfstoffen, die auf einzelnen rekombinanten Proteinen basieren, ist die Möglichkeit diese mit Oberflächenproteinen (z.B. Env) zu versehen mit denen sie an Zellen binden und von diesen aufgenommen werden können, wenn diese entsprechende Rezeptoren exprimieren. HIV-1 VLP sind in der Lage über gp120 an CD4 bzw. an Chemokinrezeptoren zu binden und so Zugang zu Makrophagen und dendritischen Zellen (beide exprimieren CD4 und CCR5) zu erhalten. Nach Aufnahme können die viralen Proteine prozessiert und auf MHC-I Molekülen T-Lymphozyten präsentiert werden. Um eine Aufnahme durch phagozytierenden Zellen via Fc-Rezeptor zu verbessern, können VLP zudem mit Antikörpern komplexiert werden. Dadurch verbessert sich die Präsentation viraler Epitope auf MHC-II Molekülen wesentlich<sup>123</sup>.

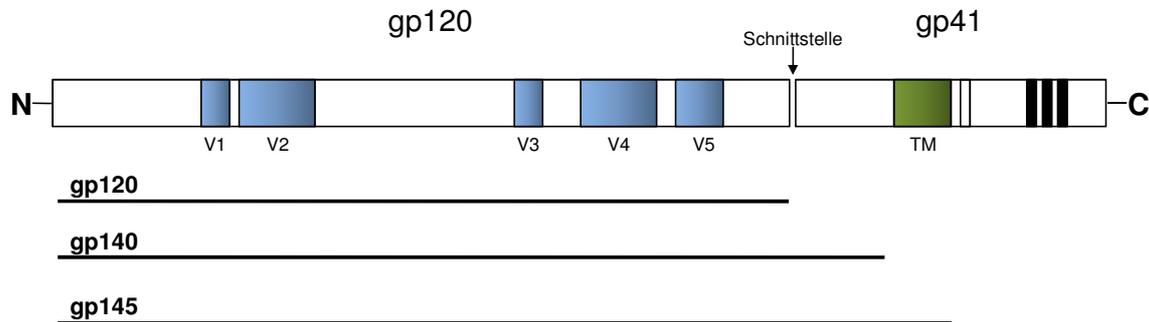
### **3.2. *In vivo* Expression von VLP mittels auf Plasmid-DNA basierenden Vakzinen**

Verschiedenste Formen von VLP können *in vivo* mittels Plasmid-DNA oder mit Hilfe viralen Vektoren, die für kodonoptimierte virale Gene kodieren, exprimiert werden. Als DNA-Immunsierung<sup>163</sup> bezeichnet man die Induktion einer spezifischen Immunantwort auf die *in vivo* Expression eines Antigens, dessen genetische Information mit Hilfe einer Plasmid-DNA in den Körper eingebracht wurde. Um eine starke Transkriptionsrate und eine hohe mRNA Stabilität zu gewährleisten besitzen die Plamide für die Transkriptionsinitiation einen CMV oder einen  $\beta$ -Aktin Promotor und eine poly(A) Domäne am 3'-Ende des transkribierten Genprodukts, um die Halbwertszeit der mRNA zu erhöhen. Das Protein wird in den transfizierten Zellen, wie Makrophagen und dendritische Zellen, exprimiert und wird sowohl in den MHC-I und -II Prozessierungs- und Präsentationsweg eingeschleust. Dies ermöglicht die Induktion einer starken humoralen und zellulären Immunantwort. Die Verwendung von Plasmid-DNA als Vakzine bietet zudem viele Vorteile, wie eine schnelle und einfache Herstellung, sehr gute Qualitätskontrolle und die Sicherheit, dass Plasmid-DNA nicht ins Zellgenom integriert. Plasmid-DNA induziert besser als herkömmliche, Protein basierende Impfstoffe  $CD8^+$  T-Zellantworten und es gibt keine Sicherheitsbedenken wie bei lebend attenuierten Viren. Vor allem die Fähigkeit der DNA-Impfstoffe sowohl  $CD4^+$  als auch  $CD8^+$  T-Zellantworten zu induzieren, machen diese zu einer interessanten Variante für VLP basierende HIV-1 Impfstoffe<sup>123</sup>.

### **3.3. Pseudotypisierung von VLP mit modifizierten Env-Varianten**

Eine Vielzahl von VLP Varianten wurden konzipiert, die Modifikationen in Env besitzen, um Env-spezifische Immunantworten im Vergleich zu VLP, welche das Volllänge Env gp160 tragen, zu verstärken<sup>164, 165, 166, 139, 141, 128, 131, 153, 154, 149, 134, 150, 120, 159, 143, 167, 168, 169, 170</sup>. Env gp160 wird als einzelnes Polyprotein exprimiert, welches dann in die gp120 und gp41 Untereinheiten gespalten wird. Die Deletion der Spaltstellen und die Trunkierung des Env gp160 ermöglicht die Produktion eines löslichen gp140 oder eines membranständigen gp145 (siehe Abb. 5)

## Env gp160



**Abb. 5:** Schematische Darstellung des HIV-1 Env Proteins. Die gp120 Domäne des Env enthält Regionen mit konservierten Aminosäuresequenzen und Regionen die hypervariabel sind. In HIV-1 Env sind fünf (V1-V5) hypervariablen Domänen bekannt. Das Env gp41 besitzt eine Ektodomäne, eine Transmembranregion (TM) und eine zytoplasmatische Domäne, welche das kreuzneutralisierende Kennedy-Epitop (weißes Rechteck) und die LLP Domänen (schwarze Rechtecke) enthält. VLP können Env mit Hilfe der TM-Region in die Lipidmembran des Virions inkorporieren. Env-Proteine mit einer mutierten Schnittstelle verbleiben unprozessiert als gp160. Durch Trunkierung des Env-Proteins können lösliches, monomeres gp120, lösliches, trimeres gp140 und membrangebundenes, trimeres gp145 produziert werden (schwarze Linien) (Young *et al.* 2006).

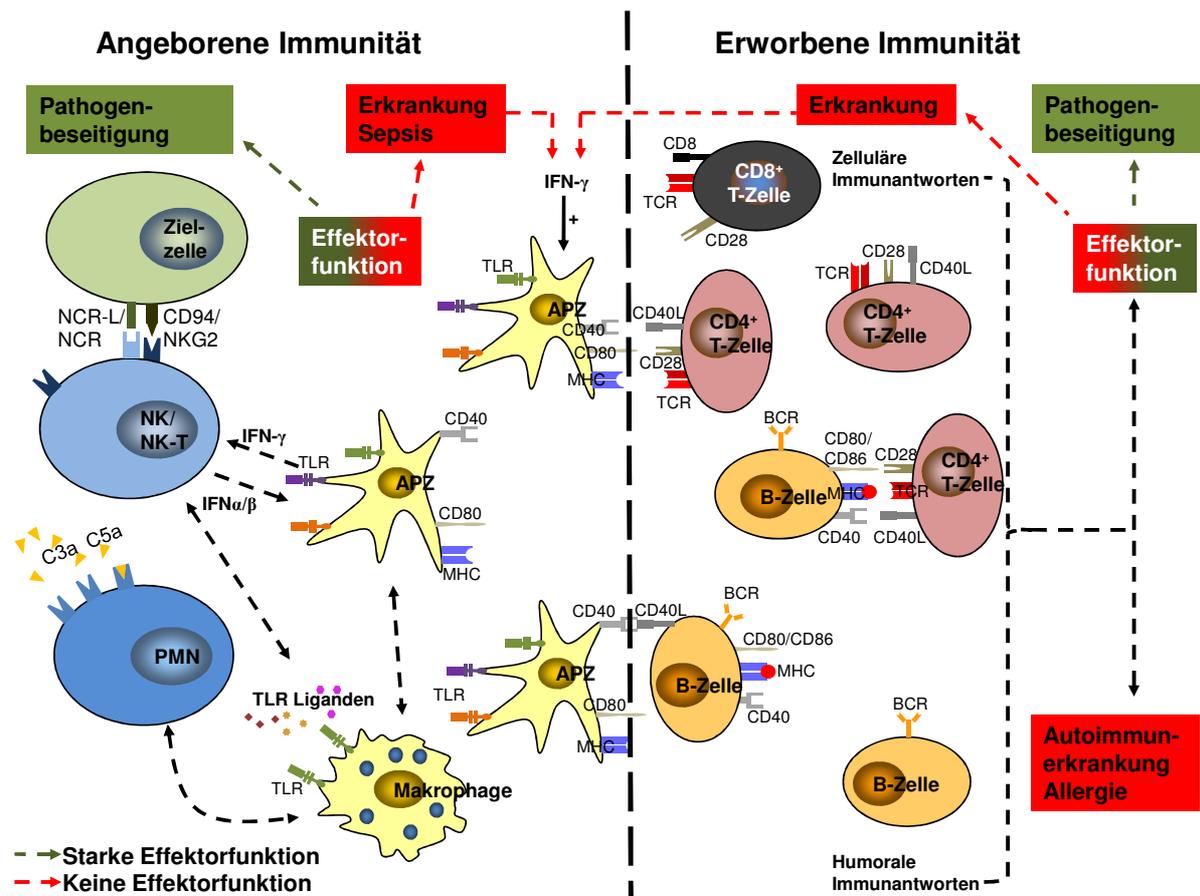
Zudem wurden verschiedene Methoden entwickelt, um die Inkorporation von Env auf die Oberfläche der virus-ähnlichen Partikeln und damit die Immunogenität zu verbessern. So wird die trunkierte Variante gp145 besser in VLP inkorporiert als das Env gp160<sup>171</sup>. Ebenso reduzieren bestimmte Deletionsmutationen im zytoplasmatischen Teil des Env den Gesamtdurchsatz des Proteins auf der Zelloberfläche, damit verbleibt mehr gp160 auf der Oberfläche und wird besser in die VLP eingebaut. VLP, die unprozessiertes gp160 tragen, sind zudem in der Lage den Verlust von gp120, der aufgrund der schwachen Anziehungskräfte zwischen gp120 und gp41 auftritt, zu kompensieren<sup>172</sup>. Das nicht prozessierbare gp160 kann durch eine Deletion der Schnittstelle hergestellt werden. Env-Proteine, die auf VLP dem Immunsystem präsentiert werden, sind besser in der Lage spezifische Immunantworten zu induzieren als die löslichen Formen von Env (gp120 und gp140). Diese liegen nämlich im Gegensatz zu gp120 in der nativen, trimere Form vor und erwiesen sich als immunogener als Env gp140<sup>123</sup>. Demnach sind VLP eine gute Möglichkeit, um dem Immunsystem native Formen von Env Proteinen unterschiedlichster HIV-1 Stämme zu präsentieren und eine möglichst breitneutralisierende Immunantwort zu induzieren.

### **4. Verbesserung der Immunogenität von Vakzinen mit Hilfe von molekularen Adjuvantien**

Trotz der Entwicklung vieler erfolgreicher Impfstoffe gegen unterschiedliche Erkrankungen zeigte sich, dass verschiedene Probleme schwer zu lösen sind:

- i) Impfstoffe wirken oftmals schwach in sehr jungen und sehr alten Menschen.
- ii) Viele Impfstoffe müssen mehrmals verabreicht werden und der Impfschutz schwindet mit der Zeit, was erneute Impfungen erfordert.
- iii) Für einige Erkrankungen wie HIV-1 konnten bis jetzt kein wirksamer Impfstoff entwickelt werden.

Viele dieser Impfstoffe könnte man verbessern oder erst anwenden, wenn diese stärkere und anhaltendere Immunantworten induzieren würden. Da Immunantworten normalerweise durch die Aktivierung von antigenpräsentierender Zellen (APZ), im besonderen Maße von DZ, initiiert und moduliert werden (siehe Abb. 6), besteht ein großes Interesse an der Entwicklung und Verbesserung von APZ Adjuvantien, um in Zukunft Impfstoffe noch weiter immunologisch zu verbessern <sup>173, 174, 175</sup>.



**Abb. 6:** Der Erfolg oder Misserfolg einer antigenspezifischen Immunantwort hängt von dem Zusammenspiel des angeborenen und erworbenen Immunsystems ab. Für die erfolgreiche Beseitigung eines Pathogen ist es essentiell, dass Mikroben durch Komponenten des angeborenen Immunsystems erkannt werden. Die Systeme für die Detektion von Mikroben sind auf einander abgestimmt und in der Induktion einer erworbenen Immunantwort involviert. Adaptive Immunantworten können sich entweder zu immunologischer Toleranz oder zu Th1 bzw. Th2 Immunantworten entwickeln<sup>176</sup>. APZ: Antigen-präsentierende Zelle; PMN: Polymorphonuclearer Leucozyt; NK: *natural killer* Zelle; NK-T: *natural killer* T-Zelle; NCR/NCR-L: *natural cytotoxicity* Rezeptor/-Ligand; TLR: *toll like* Rezeptor; TCR: T-Zellrezeptor; BCR: B-Zellrezeptor; MHC: *Major Histocompatibility Complex*; IFN: Interferon

In seiner reinsten Form besitzt ein Adjuvans keine Antigen-spezifischen Qualitäten und kann verschiedensten Ursprungs sein. So werden zum Beispiel Aluminiumsalze wie Aluminiumhydroxid oder Öl-Emulsionen wie das *Incomplete Freund Adjuvant* (IFA) als Adjuvans eingesetzt. Mit steigendem Verständnis über die Bestandteile des Immunsystems hingegen stieg auch das Interesse an sogenannten „molekularen Adjuvantien“. Unter diesem Begriff können Proteine, Lipide, Nukleinsäuren, Kohlenhydrate oder chemische Komponenten zusammengefasst werden, für die DZ Rezeptoren besitzen und deren Aktivierung zu einer definierten Reihe von Signaltransduktionen, einer Änderung des DZ Phänotyps führt und folglich die Quantität und Qualität der induzierten Immunantwort bestimmt<sup>173</sup>. Die Zahl der Rezeptoren für molekulare Adjuvantien ist durch die Sequenzierung des Genoms

## Einleitung

---

mittlerweile bekannt, die Zahl der möglichen molekularen Adjuvantien hingegen übersteigt die der Rezeptoren bei weitem. So ist zum Beispiel für den *toll-like receptor 9* (TLR9) bekannt, dass dieser als Rezeptor für unmethylierte Oligonukleotide, die CpG Motive enthalten, (ODN) dient. Desweiteren können Nukleotidsequenzen, die synthetische Cytosin-Phosphat-2'-Deoxy-7-Deazaguanosin Dinukleotide (CpR), immunstimulatorische Oligonukleotide (IMO)<sup>177</sup> oder hantelförmige, kovalent geschlossene Strukturen<sup>178</sup> TLR9 ebenso stimulieren. Unter bestimmten Umständen kann sogar DNA aus Säugerzellen TLR9 aktivieren<sup>179</sup>.

Sechs Faktoren erschweren das Verständnis für molekulare Adjuvantien:

- i) Es gibt zwei große Subtypen von DZ, die konventionellen oder myeloiden DZ (MDZ)<sup>180, 181</sup> und die plasmazytoiden DZ (PDZ)<sup>182, 183</sup>, von denen jede unterschiedliche Eigenschaften besitzen<sup>184</sup>. Generell reagieren PDZ, die TLR7 und TLR9 exprimieren, auf Imidazoquinoline (Imiquimod und R-848) und auf CpG ODN Stimulation, was dann zu einer verstärkten Expression von kostimulatorischen Molekülen und der Induktion von IFN- $\alpha$  führt. MDZ hingegen, welche TLR3, TLR4, TLR7 und TLR8 exprimieren, reagieren auf Polyinosinische:Polycytidylische Säure [Poly(I:C)], LPS und Imidazoquinoline mit einer phänotypischen Maturation und einer hohen Produktion von IL-12 p70 ohne dabei messbare Mengen an IFN- $\alpha$  zu sezernieren<sup>185</sup>.
- ii) Die verschiedenen Adjuvansrezeptoren werden in verschiedenen Spezies auf unterschiedlichen APZ exprimiert. So wird zum Beispiel im Menschen TLR9 auf PDZ und nicht auf MDZ exprimiert, in der Maus hingegen findet sich dieser auf beiden DZ-Subtypen<sup>186, 187</sup>.
- iii) Adjuvansrezeptoren können in verschiedenen Spezies unterschiedliche Funktionen besitzen. Einzelsträngige RNA zum Beispiel ist in Mäusen ein Agonist für TLR7, im Menschen aber für TLR8<sup>188, 189</sup>.
- iv) Unterschiedliche Adjuvansrezeptoren nutzen auch unterschiedliche Signalkaskaden und führen dann zu unterschiedlichen APZ-Phänotypen. So beeinflusst die Stimulation unterschiedlicher TLR die Th1 – Th2 Polarisierung der T-Zellen und weitere Aspekte der induzierten Immunantwort<sup>190, 191, 192</sup>.
- v) In einigen Fällen reagiert ein einzelnes Adjuvansmolekül mit grundverschiedenen Rezeptoren auf unterschiedlichen Zellen. Poly(I:C), eine Form von doppelsträngiger RNA, zum Beispiel stimuliert TLR3 und/oder das

*melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA5) auf MDZ<sup>193</sup>, aber bei PDZ erfolgt die Signaltransduktion über *retinoic acid-inducible gene-1* (RIG-I)<sup>194</sup>.

- vi) Kombinationen von molekularen Adjuvantien führen zu quantitativ und qualitativ unterschiedlichen Ergebnissen<sup>195, 196, 197</sup> und die Zahl der Kombinationsmöglichkeiten ist riesig<sup>173</sup>.

In folgenden Unterkapiteln werden drei Beispiele von molekularen Adjuvantien näher vorgestellt. Eine Vielzahl weiterer immunmodulatorischer Moleküle und deren Anwendungsmöglichkeiten werden in den Publikationen von Kornbluth *et al.* und Ebensen *et al.* vorgestellt<sup>173, 176</sup>.

### **4.1. Toll-like receptor (TLR) Agonisten als molekulare Adjuvantien**

Substanzen, welche an TLR binden und diese aktivieren können, bezeichnet man als TLR Agonisten. Bezüglich dieser Agonisten gibt es einige Punkte zu beachten:

MDZ, die TLR3, TLR4 und TLR7 exprimieren, reagieren auf die Stimulation von Agonisten wie Poly(I:C), LPS und Imidazoquinoline mit einer Hochregulierung von kostimulatorischen Molekülen und einer Ausschüttung von IL-12 ohne dabei IFN- $\alpha$  zu produzieren. PDZ hingegen, welche TLR7 und TLR9 exprimieren, reagieren auf Agonisten wie Imidazoquinoline und CpG ODN ebenfalls mit einer Hochregulierung von kostimulatorischen Molekülen, aber mit einer starken Ausschüttung von IFN- $\alpha$ <sup>185</sup>. IFN- $\alpha$  ist essentiell für die Entwicklung von antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen<sup>198, 199</sup>. Im Falle von murinen *bone marrow-derived dendritic cells* (BMDDC) führt eine Stimulation mit TLR3 und TLR9 Agonisten, wie Poly(I:C) und CpG ODN, zu deren Aktivierung und zur *cross-presentation* von exogenen Antigenen an MHC-I restringierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen<sup>200</sup>. Obwohl TLR Agonisten antigenspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch in Abwesenheit von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen induzieren können<sup>201</sup>, schwindet eine solche Immunantwort schnell, wenn bei der initialen Induktion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen keine CD4<sup>+</sup> T-Helfer<sup>202</sup> oder CD40 Stimuli<sup>203</sup> vorhanden waren. TLR Agonisten induzieren eine nur kurzlebige Stimulation von DZ<sup>197</sup> und Makrophagen<sup>204</sup>, die *in vitro* schon 24 h nach einer einzelnen Applikation wieder abnimmt. Daher ist eine einzige Gabe von TLR Agonisten *in vivo* nicht in der Lage eine Antigen-toleranz zu brechen, solange diese nicht zeitversetzt kontinuierlich abgegeben werden<sup>173</sup>. Durch eine wiederholte Applikation von LPS hingegen

## Einleitung

(täglich über vier Tage hinweg) konnte effektiv, trotz Anwesenheit von regulatorischen T-Zellen (Treg), eine Tumor-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zell Antwort induziert werden <sup>205</sup>. Um eine antigenspezifische Immunantwort zu verbessern, können die Proteinantigene auch direkt mit TLR Agonisten gekoppelt werden <sup>206, 207, 208</sup>. In Tabelle 2 wird eine Reihe von TLR Agonisten und deren zugehörigen TLR vorgestellt.

TLR	Agonisten
TLR2/1 und TLR2/6 Heterodimere	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mykoplasmen, Makrophagen aktivierendes Lipoprotein-2 (Malp2)</li> <li>• Tripalmitoyl-Cysteinyl-Seryl-(lysyl)3-Lysin (Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>)</li> <li>• Lipoarrabinomannan angereicherte mykobakterielle Zellwandfraktionen</li> <li>• Monoacylierte Muramyl-Dipeptid Derivate von Mykobakterien</li> </ul>
TLR3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Poly(I:C)</li> <li>• Ampligen (Poly I:Poly C12U)</li> </ul>
TLR4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bakterielle Liposaccharide (LPS)</li> <li>• Lipid A</li> <li>• Monophosphoryllipid A (MPL)</li> </ul>
TLR5	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bakteriellies Flagellin</li> </ul>
TLR7	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Einzelsträngige RNA</li> <li>• Imidazoquinolin Komponenten (Resiquimod (R-848), Imiquod und Oxoribine)</li> <li>• 7-Thia-8-Oxoguanosin und 7-Deazaguanosin</li> <li>• ANA975</li> <li>• 3M-01 und 3M-03</li> </ul>
TLR8	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3M-01 und 3M-02</li> <li>• Poly-G10</li> </ul>
TLR9	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CpG ODN</li> <li>• Bakterielle DNA</li> <li>• Vertebraten DNA in Liposomen</li> <li>• Insekten DNA</li> <li>• CpR-haltige ODN (IMO)</li> <li>• Hantelförmige, kovalent geschlossene ODN (dSLIM-30L1)</li> </ul>
TLR10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unbekannt</li> </ul>
TLR11	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Profilin (<i>Toxoplasma gondii</i>)</li> </ul>

**Tabelle 2:** Übersicht über TLR und beschriebene TLR Agonisten (adaptiert nach Kornbluth *et al.* <sup>173</sup>).

### 4.2. Bakterielle Toxine und ihre Derivate als molekulare Adjuvantien

Choleratoxin (CT) und das nahverwandte, hitzeempfindliche Enterotoxin (*heat-labile enterotoxin*, HLT) von *Escherichia coli* sind sogenannte A/B Komponenten Toxine. Sie bestehen aus einer Untereinheit A, welche enzymatische Aktivitäten besitzt, und einem Pentamer aus B Untereinheiten, welche die Bindung des Holotoxins an die Rezeptoren auf der Membran der Zielzelle vermittelt. So binden CT und LT-1 an das Gangliosid GM<sub>1</sub>, LT-IIa mit hoher Affinität an das Gangliosid GD<sub>1b</sub> und mit niedriger Avidität an die Ganglioside GD<sub>1a</sub> und GM<sub>1</sub> und LT-IIb mit hoher Affinität an GD<sub>1a</sub> <sup>209, 210</sup>. Diese zwei Toxine wirken sowohl über die systemische als auch über die

## Einleitung

---

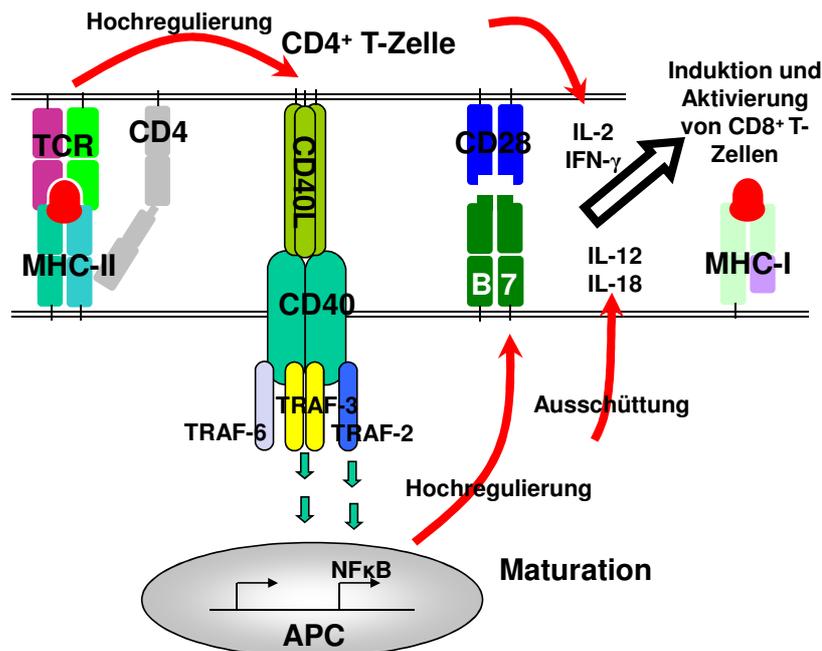
mukosale Applikationsroute als sehr starke Adjuvantien wenn diese in Kombination mit den Antigenen verabreicht werden <sup>211</sup>. Die molekularen Mechanismen, wie diese das angeborene und erworbene Immunsystem stimulieren, sind noch nicht vollends aufgeklärt. Dennoch konnten direkte Effekte auf T-Zellen und APZ beobachtet werden, die Hinweise geben, wie diese Moleküle stimulatorisch wirken. *In vitro* Studien mit primären B-Zellen und Makrophagen zeigten eine verstärkte Phosphorylierung von verschiedenen Signalmolekülen, einschließlich Erk1/2 und p38 <sup>212</sup>. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die B Untereinheit des CT Signalwege induziert, die über eine Transaktivierung des *cyclic AMP-responsive element* und von NFκB zu einer Zellaktivierung, einer Expression von Oberflächenmolekülen und einer Produktion von Zytokinen führen <sup>212</sup>. Die beobachtete GM<sub>1</sub>-abhängige Kerntranslokation von NFκB in DZ zeigte die wichtige Rolle dieses Rezeptors bei der Induktion von Signaltransduktionskaskaden <sup>213</sup>. Andererseits gibt es nur sehr wenige Informationen über die strukturell nah verwandten Mitglieder der HLT Serogruppe II, LT-IIa und LT-IIb, welche unterschiedliche Bindspezifitäten für Gangliosidrezeptoren besitzen <sup>176</sup>.

Die Anwendung von CT und LT im Menschen scheitert an deren hohen Toxizität. Dennoch konnten durch gerichtete Mutagenese eine Generation von LT und CT Derivaten mit geringerer Toxizität entwickelt werden, die ihre Adjuvanseigenschaften beibehielten <sup>214</sup>. Verschiedene Mutanten, wie LTK63 (LT mit einer Serin zu Lysin Mutation an Position 63 in der Subeinheit A) wurden bereits als systemisches oder mukosales Adjuvans verwendet <sup>215</sup>.

Es wurde zudem beobachtet, dass eine Koverabreichung dieser Moleküle mit einer Vakzine hauptsächlich Th2 basierende Immunantworten induziert <sup>176</sup>. Interessanterweise wurden durch ihre Anwendung auch Autoimmunerkrankungen abgeschwächt oder verhindert, was ihre weitreichenden Effekte auf das Immunsystem demonstrierte. Die Beobachtung, dass dieser suppressive Effekt mit der Induktion von Treg, welche pathogene Th1 Antworten inhibieren, einhergeht, kann zum Teil die widersprüchlichen Ergebnisse nach Exposition mit CT-ähnlichen Enterotoxinen erklären. Dennoch müssen noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden, welche Mechanismen adjuvierend wirken oder eine Toleranz induzieren, um das Potential von Enterotoxinen für Impfstoffe oder für Immuntherapien nutzen zu können <sup>216</sup>.

### 4.3. Das kostimulatorische Molekül CD40 Ligand als molekulares Adjuvans

Die Interaktion des CD40 Liganden (CD40L) mit seinem Rezeptor CD40 spielt eine große Rolle in der Induktion von zellulären und humoralen Immunantworten. CD40 ist ein Mitglied der *tumor necrosis factor receptor superfamily* (TNFRSF) und wird auf vielen Zellen des Immunsystems, vor allem von DZ, Makrophagen und B-Lymphozyten, exprimiert. CD40L oder CD154 gehört zu der Gruppe *tumor necrosis factor* (TNF) und wird transient auf aktivierten T-Helfer Zellen exprimiert. Eine Wechselwirkung von CD40 mit CD40L führt zu einer Kostimulation der Zielzelle (siehe Abb. 7). So werden DZ aktiviert und beginnen zu maturieren, einhergehend mit einer Hochregulierung von anderen kostimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86.



**Abb. 7:** Schematische Darstellung der CD40L-CD40 Interaktion zwischen einer CD4<sup>+</sup> T-Helferzelle und einer APZ. Die Erkennung eines Epitops auf MHC-II Molekülen durch den T-Zellrezeptor (TCR) einer CD4<sup>+</sup> T-Zelle führt zu einer Hochregulierung von CD40L auf der Oberfläche der T-Zelle. Durch die Ligation des CD40L mit CD40 auf der Oberfläche der APZ wird eine Signalkaskade ausgelöst, die zu einer Maturation, einer Hochregulierung von kostimulatorischen B7-Molekülen (CD80 und CD86) und der Ausschüttung von IL-12 und IL-18 führt. IL12 und IL-18 stimulieren NK-Zellen (*natural killer cells*) zur Produktion von IFN-γ. Die CD4<sup>+</sup> T-Zelle selbst wird durch IL-12 zur Proliferation stimuliert, differenziert zu einer Th1 T-Helferzelle aus und produziert ebenfalls IFN-γ. Die verstärkte Ausschüttung von IFN-γ führt schließlich zu einer Induktion und Aktivierung von antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen. (Adaptiert aus: Immunologie; Charles A. Janeway jr., Paul Travers, Mark Walport, Mark J. Shlomchick; 5. Auflage, 2002)

## Einleitung

---

Eine weitere wichtige CD40L-CD40 Interaktion findet zwischen B-Lymphozyten und CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen statt. Die Ligation des CD40 auf der Oberfläche von B-Zellen durch aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Kombination mit der Antigenerkennung durch den B-Zellrezeptor (BZR) führt zum Isotypenwechsel der Antikörper (*isotype switching*), zur Keimzentrumbildung, zur Affinitätsreifung und zur Bildung von B-Gedächtniszellen <sup>217</sup>.

In der Vergangenheit berichteten mehrere Forschungsgruppen über unterschiedliche Strategien, die CD40 Stimulation nutzten, um sowohl zelluläre als auch humorale Immunantworten zu verstärken.

So wurden monoklonale, CD40-spezifische Antikörper als Ersatz für eine Aktivierung durch CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen eingesetzt, um so die Maturation von DZ zu verbessern <sup>218, 219, 220, 221, 222</sup>.

Eine Limitation des Einsatzes von anti-CD40 Antikörpern als Adjuvans ist die große Menge an Antikörpern, die mit dem Impfstoff appliziert werden muss, um eine Verbesserung der Immunantworten zu erreichen. Da CD40 zudem relativ ubiquitär exprimiert wird, besteht die Gefahr für die Aktivierung von vielen Zelltypen, auch die von autoreaktiven B-Lymphozyten. Aber durch die Konjugation des anti-CD40 Antikörpers an den Impfstoff konnte diese Problematik umgangen werden <sup>223</sup>. In dieser Form verabreicht, konnte die Menge an anti-CD Antikörper drastisch reduziert werden, so dass schädliche Nebenwirkungen, wie Splenomegalie und polyklonale Immunglobulinproduktion, nicht mehr auftraten. Zudem besaßen diese Konjugate einen weit größeren Adjuvanseffekt. Darüber hinaus könnten induzierte Immunantworten gegen den anti-CD40 Antikörper selbst den Adjuvanseffekt noch verstärkt haben. Denn Antikörper werden herkömmlicherweise in einem sogenannten *non-host* Tier generiert (z.B. murine anti-human CD40 Immunglobuline), der applizierte Antikörper wäre demnach z.B. im Menschen immunogen und dieser würde anti-murine Immunglobulin Antikörper bilden, was wiederum die Effektivität des Adjuvans bei wiederholter Anwendung senken würde <sup>217</sup>.

Um diese Problematik zu umgehen wurden DNA Konstrukte konzipiert, die Sequenzen sowohl des Antigens als auch des CD40L enthielten <sup>224, 225, 226, 227</sup>. Mit diesem System konnten mehrere Forschungsgruppen eine Verstärkung sowohl der humoralen als auch der zellulären Immunantworten in verschiedenen Tiermodellen zeigen. Aber auch dieser Ansatz weißt Limitationen auf. Wie bei den monoklonalen Antikörpern muss eine große Menge an CD40L in Kombination mit dem Antigen

appliziert werden, was wiederum die Gefahr birgt autoreaktive Zellen zu aktivieren. Eine Kopplung des CD40L an das Antigen würde wahrscheinlich stärker Adjuvanseigenschaften bei geringeren Dosen aufweisen. So konnte für das *carcinoembryonic antigen* (CEA), das mit CD40L gekoppelt wurde, gezeigt werden, dass die periphere T-Zell Toleranz in CEA transgenen Mäusen gebrochen werden kann <sup>228</sup>.

Einen anderen Ansatz verfolgte Stone *et al.*. So wurde Mäusen HIV-1 Gag in Kombination mit verschiedenen CD40L Varianten als DNA-Impfstoff appliziert. Die CD40L Varianten waren so konzipiert, dass diese sich selbst zu höheren Oligomeren, bestehend aus einem, zwei oder vier CD40L, zusammenlagern konnten. Dabei konnte beobachtet werden, dass die zellulären und humoralen Gag-spezifischen Immunantworten mit zunehmender Oligomerisierung des CD40L stärker wurden <sup>229</sup>.

Demnach gibt es viele Ansätze wie man die immunstimulatorischen Eigenschaften der CD40-CD40L Interaktion ausnutzen kann. Dennoch gibt es bei jedem Ansatz Limitationen und Risiken. Ein Teil der vorliegenden Arbeit wird sich auch mit Generation von neuen CD40L Varianten und deren Eignung als Adjuvans im Rahmen einer HIV-1 Vakzine beschäftigen.

## 5. Zielsetzung

Das synthetische 97CN54 GagPolNef DNA Konstrukt, das für die HI viralen Gene Gag, Pol und Nef kodiert, erwies sich in Tierexperimenten und in klinischen Studien <sup>121, 248, 249</sup> als sehr potente Vakzine. So konnte in den klinischen Studien gezeigt werden, dass in 91% Env-spezifische und in 48% der Studienteilnehmer Gag-Pol-Nef spezifische, polyfunktionelle T-Zellantworten durch die Impfung induziert wurden.

Trotz der vielversprechenden Ergebnisse der Studien bestand Bedarf für eine Verbesserung und Optimierung, vor allem sollten die Gag-spezifischen Antworten verbessert werden, ohne dass dadurch die Env-spezifischen Immunantworten beeinträchtigt werden. Denn diese waren im Vergleich zu den induzierten Env-spezifischen Antworten schwächer und weniger lang anhaltend. Starke, impfinduzierte Gag-spezifische T-Zellantworten sind für eine HIV-1 Vakzine besonders wünschenswert, da diese wichtig für die Kontrolle der HI-viralen Virämie sind <sup>77, 78, 79, 80</sup>.

## Einleitung

---

Für eine Steigerung der Gag-spezifischen Antworten sollten folgende Veränderungen an dem bestehenden GagPolNef Konstrukt durchgeführt werden.

- i) Durch die Wiederherstellung des Myristylierungssignals am N-Terminus der Gag Domäne sollte dem Konstrukt ermöglicht werden, von den Zellen als VLP freigesetzt zu werden. Hierdurch sollten mehr APZ durch sogenannte *cross-presentation* im Umfeld der Immunisierungsstelle erreicht werden, als dies im Falle des ursprünglichen Konstrukts, das keine VLP bildet, möglich ist.
- ii) Durch Aktivierung der viralen Protease in dem Konstrukt sollte eine Prozessierung der Subkomponenten und damit eine verbesserte Freisetzung von VLP erreicht werden. Zudem könnten durch die Prozessierung der Subkomponenten des GagPolNef neue, eventuell breitneutralisierende Epitope freigesetzt werden, die normalerweise im ursprünglichen Konstrukt dem Immunsystem nicht zugänglich sind.
- iii) Die Pr55<sup>Gag</sup> Expression sollte weiterhin durch das Einfügen des HI-viralen, ribosomalen Leserastersprungs in das GagPolNef verstärkt werden, um eine noch effizientere Partikelfreisetzung zu gewährleisten und durch eine höhere Verfügbarkeit des Pr55<sup>Gag</sup> als im ursprünglichen GagPolNef Konstrukt eine stärkere und länger anhaltendere Gag-spezifische Immunantwort zu ermöglichen.

Nach der Entwicklung von immunologisch verbesserten GagPolNef Konstrukten sollten im Balb/C Maus Modell desweiteren ihre Eigenschaften bezüglich der Induktion spezifischer humoraler und zellulärer Immunantworten untersucht werden, wenn diese allein oder in Kombination mit 97CN54 Env gp120 immunisiert werden. Im Rahmen dieser Studien sollten auch unterschiedliche Varianten der Koapplikation, also eine zeitgleiche oder zeitlich bzw. räumlich getrennte Koverabreichung, getestet werden, um für zukünftige klinische Studien eine optimale Vakzinierungsstrategie für die neuen Immunogene zu besitzen.

Für eine Adjuvierung der Immunogene und eine Modulation der induzierten Immunantworten sollte das immunstimulatorische Molekül CD40L auf seine Eignung als ein „endogenes“ Adjuvans getestet werden. Hierfür sollten verschiedene Varianten des CD40L bzw. neu konzipierte CD40L Varianten entwickelt und im Kontext mit Pr55<sup>Gag</sup> und Env gp145 bezüglich ihrer immunstimulatorischen Eigenschaften analysiert werden. Hierfür sollen Pr55<sup>Gag</sup> VLP mit und ohne gp145 auf

## Einleitung

---

ihrer Oberfläche mit den CD40L Varianten pseudotypisiert bzw. versetzt werden und deren Funktionalität bezüglich B-Zell Aktivierung *in vitro* und der Einfluss auf die Induktion Gag- und Env-spezifischer Immunantworten *in vivo* analysiert werden. Dies soll sowohl mittels aufgereinigten VLP als auch durch *in vivo* Expression der DNA-Plasmide genauer untersucht werden.

## Material & Methoden

### 1. Material

#### 1.1. Bakterienstämme

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Klonierungen wurde die hochkompetenten Escherichia coli (E.coli) K12 Stämme DH5 $\alpha$ <sup>230</sup>, DH10B und GM2163 verwendet. Die wichtigsten genetischen Merkmale der Bakterienstämme sind in folgender Tabelle aufgeführt.

Stamm	Genetische Merkmale
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> ( $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> )supl $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Göttingen)
DH10B	F <sup>-</sup> mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 deoR recA1 endA1 ara $\Delta$ 139 $\Delta$ (ara, leu)7697 galU galK $\lambda$ <sup>-</sup> rpsL nupG $\lambda$ <sup>-</sup> /pMON14272 / pMON7124 (Invitrogen)
GM2163	F <sup>-</sup> dam-13::Tn 9 dcm-6 hsdR2 leuB6 his-4 thi-1 ara-14 lacY1 galK2 galT22 xyl-5 mtl-1 rpsL136 tonA31 tsx-78 supE44 McrA <sup>-</sup> McrB <sup>-</sup> (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Göttingen)

#### 1.2. Nährmedien für Bakterien

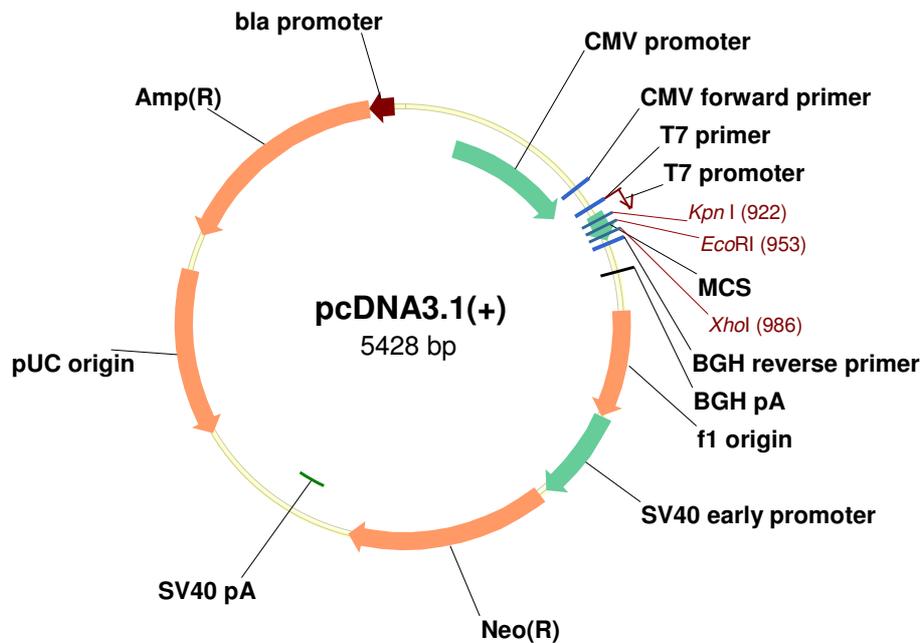
Die Anzucht der DH5 $\alpha$  Stammes erfolgte in Suspensionskulturen unter Verwendung von sterilem LB (Luria Bertani)-Medium. Die Selektion und Vereinzelung von Klonen transfizierter Bakterien wurde auf LB-Agar-Platten unter Verwendung von Ampicillin als Selektionsmarker durchgeführt.

Medium	Zusammensetzung
LB <sub>0</sub> -Medium	1% Bacto-Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl; mit NaOH auf pH 7,5 einstellen.
LB <sub>amp</sub> -Medium	LB <sub>0</sub> -Medium, 100 $\mu$ g/ml Ampicillin
LB <sub>amp</sub> -Platten	LB <sub>amp</sub> -Medium; 1,5% Agar

Alle Prozentangaben beziehen sich auf (w/w)

## 1.3. Plasmidvektoren

Für die transiente Expression der HIV-1 97CN001 Gag Pol Nef und der CD40L Konstrukte in 293T-Zellen wurde der Vektor pcDNA 3.1(+) (Invitrogen) eingesetzt. Um hohe Expressionsraten der Konstrukte zu gewährleisten, wurden diese auf den Kodongebrauch von Säugerzellen optimiert.



**Abb. 1:** Schematische Darstellung des Expressionsvektors pcDNA3.1(+) von Invitrogen  
Detaillierte Gensequenzen der Konstrukte sind im Anhang aufgelistet.

## 1.4. Optimierung und Herstellung synthetischer Gene

Die Optimierung der Ausgangssequenzen erfolgte unter Verwendung der Software GeneOptimizer™ (Geneart AG, Regensburg). Dabei wurde unter Beibehaltung der Aminosäuresequenz des Ausgangskonstruktes eine Nukleotidsequenz entwickelt, die hinsichtlich verschiedener unterschiedlich gewichteter Parameter verändert war. Neben der Modulation des CpG-Gehaltes und der Eliminierung bzw. Integration bestimmter singulärer Restriktionsschnittstellen wurde bei dem Design der synthetischen Konstrukte unter anderem darauf geachtet, keine negativ wirksamen cis-aktiven Elemente wie Spleißstellen, Polyadenylierungssignalstellen, interne TATA-Boxen oder Ribosomen-Bindestellen zu generieren. Kodierende Regionen wurden unter Beibehaltung der Kodonwahl des jeweiligen Organismus optimiert, um die resultierende Transgenexpression mit der des jeweiligen Ausgangskonstruktes vergleichen zu können.

Für jedes Konstrukt wurde deshalb der ermittelte CAI (codon adaption index) angegeben, der ein Maß für die Güte der verwendeten Kodons darstellt<sup>231</sup>. Bei Verwendung ausschließlich optimaler Kodons wird im Idealfall ein CAI von 1 erreicht. Ein CAI größer als 0,9 führt aber bereits zu einer sehr hohen Transgenexpression, da zwischen dem Kodongebrauch eines Organismus und den entsprechenden tRNA-Frequenzen eine starke Korrelation besteht<sup>232, 233</sup>. Nicht nur der CAI als Durchschnittswert wurde während des Optimierungsprozesses weitestgehend aufrechterhalten, sondern auch die Häufigkeit der selten bzw. oft verwendeten Kodons blieb gleich. Zudem wurden alle generierten Sequenzen hinsichtlich ihres GC-Gehaltes, des Anteils der Nukleotide Cytidin und Guanosin an der Gesamtsequenz, mit ihrer nicht optimierten Version verglichen. Der GC-Gehalt eines synthetischen Gens sollte dem im jeweiligen Zielorganismus vorherrschenden GC-Gehalt angepasst sein. Zudem sollten extrem AT-reiche Sequenzen vermieden werden, da AT-reiche RNA-Transkripte instabil sind und zu einer verringerten Expression führen. Neben der Zahl an CpG-Dinukleotiden wird für die einzelnen Konstrukte auch der Gehalt an TpA-Dinukleotiden angegeben, da deren Beteiligung an der Regulation der Expression in der Literatur diskutiert wird<sup>234</sup>.

Die konstruierten Sequenzen wurden anhand einer PCR-basierten Gensynthesemethode künstlich hergestellt (Geneart AG, Regensburg) und unter Verwendung der Restriktionsenzyme KpnI und SacI in die Klonierungsvektoren pGA-4 (Geneart AG, Regensburg) eingesetzt.

### **1.5. Oligonukleotide**

Die Oligonukleotide, die für Amplifikationen von DNA mittels PCR oder für Sequenzierungen als Startmoleküle verwendet wurden, sind im Anhang aufgelistet. Alle Oligonukleotide waren entsalzt und wurden in lyophilisiertem Zustand von den Firmen Metabion (Martinsried) oder Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

### **1.6. Eukaryontische Zelllinie 293T**

Für die Expression der generierten Konstrukte wurde die humane, Ad5/SV40 (T) transformierte Nierenzelllinie 293T (Invitrogen; Numa *et al.*<sup>235</sup>; ATCC: CRL-11268) verwendet.

### 1.7. Nährmedien für 293T Zellen

Für die Kultivierung der eukaryontischen Zellen wurden die nachfolgend aufgeführten Nährmedien verwendet:

Medium	Zusammensetzung
Kultivierungsmedium	D-MEM (GIBCO), 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin
Expressionsmedium	D-MEM (GIBCO), 3% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin

Alle Prozentangaben beziehen sich auf (v/v)

### 1.8. Restriktionsenzyme

Für die Klonierungen wurden die Restriktionsenzyme AgeI, KpnI, EcoRI, BsaBI und XhoI mit den zugehörigen Puffern der Firma New England Biolabs, Inc. verwendet.

### 1.9. DNA-/ Protein- Molekulargewichtsstandards

Standard	Hersteller
1 kb DNA Ladder	New England Biolabs (DNA-Marker)
Precision Plus Protein™	BIO-RAD, München (Protein-Marker)

### 1.10. Versuchstiere

Für die immunologischen Untersuchungen wurden ausschließlich weibliche Balb/C Mäuse (H-2<sup>dL</sup>) (Charles River, Sulzfeld) ab einem Alter von sechs Wochen verwendet, die unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gehalten wurden.

### 1.11. Geräte

Die verwendeten Geräte und Verbrauchsgüter mit den entsprechenden Herstellern sind an den jeweiligen Stellen im Text vermerkt.

## 2. Methoden

### 2.1. Gentechnische Methoden

#### 2.1.1. Kultivierung von Bakterien

##### *2.1.1.1. Flüssigkulturen*

Steriles LB<sub>Amp</sub>-Medium wurde mit einer Einzelkolonie von transformierten E.coli angeimpft und über Nacht bei 37 °C in einem Inkubationsschüttler inkubiert.

##### *2.1.1.2. Plattenkulturen*

Mit einer sterilen Impföse wurden von einer einzelnen Bakterienkolonie oder aus einer Flüssigkultur aufgenommen und so auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen, dass nach Inkubation über Nacht im 37°C Brutschrank (Heraeus Instruments, Hanau) Einzelkolonien isoliert werden konnten. Je nach Bakterienstamm und transformiertem Vektor wurde dem Medium nach Autoklavieren und Abkühlen auf etwa 55°C eine steril filtrierte Lösung der entsprechenden Antibiotika bzw. anderer Selektionslösungen zugegeben.

#### 2.1.2. Transformation von kompetenten *E.coli* mit Plasmid-DNA

Kompetente E.coli Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit 0.05 bis 1 µg Plasmid-DNA versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis erfolgte der so genannte Hitzeschock, bei dem die Bakterien in einem Wasserbad für 45 s auf 42°C erwärmt wurden. Danach wurden die transformierten E.coli ein bis zwei Minuten auf Eis abgekühlt und anschließend wurden sie nach Zugabe von ca. 800 µl LB<sub>0</sub>-Medium für etwa eine Stunde unter Schütteln bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit wird die Antibiotikaresistenz des transformierten Plasmids exprimiert. Um dann Einzelkolonien zu erhalten, wurde die Bakteriensuspension auf LB<sub>Amp</sub>-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C in den Brutschrank gestellt.

#### 2.1.3. Präparation und Aufreinigung von Plasmid-DNA

##### *2.1.3.1. Rapid Lysis (ohne Säule)*

Die so genannte „Rapid Lysis“ ist geeignet um kleine DNA Mengen nach dem Prinzip der alkalischen Lyse<sup>236</sup> schnell zu präparieren.

## Material & Methoden

1,5 ml einer Flüssigkultur transformierter E.coli wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und 10 min bei 6000 g in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet, das die Zellen enthält, wurde in 250 µl kalten Puffer P1 resuspendiert. Zum Aufschluß der Zellen wurden anschließend 250 µl Puffer P2 zugegeben und unter vorsichtigem Schwenken drei bis fünf Minuten inkubiert. Schließlich wurden 250 µl eines vorgekühlten P3 Puffers zur Neutralisation des Bakterienlysates zugegeben. Dabei bleibt die genomische DNA denaturiert und kann zusammen mit Proteinen und Zellwandbestandteilen gefällt werden, während Plasmide hingegen renaturieren und somit in Lösung blieben. Der Ansatz wurde anschließend zur Vermeidung unerwünschter Scherkräfte vorsichtig geschwenkt, und 20 min auf Eis inkubiert. Hierbei aggregiert der Komplex aus genomischer DNA, Proteinen und Lipidmembranen verstärkt und kann somit bei der anschließenden 10-minütigen Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei 21000 g besser pelletiert werden.

Der plasmidhaltige Überstand, wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, während das Pellet verworfen wurde. Zu dem Überstand wurden anschließend zur Fällung der Plasmid-DNA 630 µl Isopropanol zugegeben, und diese dann durch Zentrifugation für 30 min bei 21000 g pelletiert. Das Präzipitat wurde dann mit 1 ml 70%-igem Ethanol gewaschen und wieder bei 21000 g für 20 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde anschließend im Vakuum getrocknet und schließlich in 30 µl entionisiertem, sterilem Wasser aufgenommen. Dieses Verfahren wurde zur Herstellung von Plasmid-DNA für die Charakterisierung mittels Restriktionsverdau eingesetzt.

Puffer	Zusammensetzung
P1	50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A
P2	200 mM NaOH, 1% SDS (w/v)
P3	3,0 M Kaliumacetat, pH 5,5

Hersteller: Qiagen

### 2.1.3.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli unter Verwendung von Qiagen-tip 100/500 Säulen

Für die Transformation von E.coli und für die Transfektion von 293 T Zellen wurde ausschließlich Plasmid-DNA verwendet, die unter Verwendung von Qiagen-tip

Säulen (Anionenaustauscherchromatographie) nach Angaben des Herstellers Qiagen aufgereinigt wurden.

Die Konzentration und Reinheit der isolierten Plasmid-DNA wurde mit Hilfe eines ND1000 Nanodrop-Spektrophotometers (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) in einem UV-Absorptionsspektrum zwischen 220 und 350 nm ermittelt. Aus dem Wert der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 258 nm ( $OD_{258}$ ) konnte die Konzentration doppelsträngiger DNA (dsDNA) nach dem Lambert-Beerschen berechnet werden ( $1 OD_{258} \triangleq 47,5 \mu\text{g/ml dsDNA}$ ). Die DNA wurde in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  aufgenommen.

### *2.1.3.3. Präparation Endotoxin-freier Plasmid-DNA*

Zur Vermeidung von Kontaminationen durch immunaktivierende, bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) wurde die bakterielle Plasmid-DNA für immunologische *ex vivo* und gentherapeutische *in vivo*-Studien im Mega-Maßstab unter Verwendung des „EndoFree<sup>®</sup> Plasmid Purification“-Kit nach Angaben des Herstellers präpariert (Qiagen) und in einer Konzentration von  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  in sterilem  $\text{PBS}_{\text{ohne}}$  aufgenommen. Der Endotoxingehalt der DNA Präparation wurde mit Hilfe des *Limulus Amebocte Lysate* Kits (Bio-Whittaker, Walkersville) nach dem Protokoll des Herstellers quantitativ ermittelt.

### 2.1.4. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Zur Analyse der aus *E.coli* isolierter Plasmid-DNA, als auch für präparative Zwecke wurde die DNA mit Restriktionsendonukleasen enzymatisch geschnitten.

Zur Charakterisierung von gereinigter Plasmid-DNA wurde  $1 \mu\text{g}$  DNA bzw. für die Überprüfung einer mittels „Rapid Lysis“ gewonnener Plasmid-DNA wurden  $5 \mu\text{l}$  der Lösung eingesetzt. Die jeweilige DNA wurde mit 10 U Restriktionsnuklease (New England Biolabs, Inc.) und 1/10 Volumen 10x Restriktionspuffer in einem  $20 \mu\text{l}$  Ansatz bei  $37^\circ\text{C}$  für eine Stunde inkubiert. Eine Einheit [U] bezeichnet die Enzymaktivität, die benötigt wird, um  $1 \mu\text{g}$   $\lambda$ -DNA in einer Stunde unter optimalen Temperatur-, Puffer-, und pH-Bedingungen vollständig zu schneiden.

Für präparative Zwecke wurden in einem Standardansatz  $2 \mu\text{g}$  mittels Qiagen-tip<sup>®</sup>-Säulen gereinigter Plasmid-DNA mit je 30 U Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von  $20 \mu\text{l}$  mit ebenfalls 1/10 Volumen 10x Restriktionspuffer für zwei Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  geschnitten.

## Material & Methoden

---

### 2.1.5. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung linearisierter DNA-Fragmente (0,1 kBp bis 10 kBp) hinsichtlich ihres Molekulargewichtes erfolgte in Agarosegelen bei konstanter Stromstärke und einer Spannung von 50 bis 150 V. Für das Gel wurde 1% Agarose (SEKAM) in TBE-Puffer (40 mM Tris/HCl pH 8,0, 20 mM Borsäure, 2 mM EDTA) mittels Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst und anschließend wurde Ethidiumbromid, einem DNA-interkalierendem Agens, in einer Endkonzentration von 50 ng/ml zugegeben. Die DNA-Fragmente aus einem Restriktionsverdau wurden mit 1/10 Volumen DNA-Auftragspuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 40% (w/v) Saccharose) versetzt und zur Abschätzung der Fragmentgröße zusammen mit entsprechendem DNA-Molekulargewichts-Standard 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs, Inc.) aufgetragen. Die Detektion der DNA erfolgte mit Hilfe eines UV-Durchlichtschirmes (Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen) bei einer Wellenlänge von 312 nm, dem Absorptionsmaximum des Ethidiumbromids.

### 2.1.6. Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die über Gelelektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente wurden für die anschließende Ligation aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Für die Extraktion der DNA-Moleküle mit einer Größe von 200 Bp bis 10 kBp wurde die QIAquick Gel Extraction-Methode (QIAGEN) verwendet. Bei diesem Verfahren wird die DNA selektiv unter Hochsalzbedingungen an eine Silikat-Säulenmatrix gebunden und anschließend unter Niedrigsalzbedingungen mit 10 mM Tris/HCl pH 8,5 nach Angaben des Herstellers wieder aus der Säule eluiert.

### 2.1.7. Ligation von DNA-Fragmenten

Die aus dem Agarosegel extrahierten DNA-Fragmente wurden in den molaren Vektor-zu-Insert Verhältnissen von eins zu drei für die Ligation eingesetzt. Der Standardligationsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl enthielt neben 3 µl Vektor- und 10 µl Insert-DNA-Lösung, 20 U T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) und 1x T4-Ligase-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7,6, 5mM Dithiothreitol (DTT), 5 µg/ml Bovines Serumalbumin (BSA), 0,1 mM ATP). Die Ligation erfolgte über Nacht bei einem Temperaturgradienten von 0°C bis Raumtemperatur (RT) und wurde anschließend direkt zur Transformation kompetenter E.coli-Zellen eingesetzt.

### 2.1.8. PCR (*polymerase chain reaction*)

Die PCR ist ein Verfahren zur exponentiellen in vitro Vermehrung (Amplifikation) definierter Nukleotidsequenzen<sup>237</sup>. Der Vorteil dieser Methode besteht in der gezielten  $10^2$ - bis  $10^7$ -fachen Amplifikation eines DNA-Fragments und diente im Laufe dieser Arbeit zur Generierung verschiedener Konstrukte (siehe jeweiligen Abschnitt). Die PCR-Reaktion erfolgte in einem programmierbaren Thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf). Zur Vermeidung Sequenz-unspezifischer Amplifikationen wurde das PCR-Verfahren „hot start“ gewählt.

Die Taq-DNA-Polymerase entstammt dem thermophilen Eubakterium *Thermus aquaticus* isoliert und ist eine DNA-abhängige-DNA-Polymerase mit hoher Prozessivität, die aber keine Exonukleaseaktivität und somit keine Korrekturleseaktivität besitzt. Mittlerweile wurden DNA Polymerasen entwickelt, die eine Korrekturleseaktivität besitzen und eine solche, die Deep Vent<sub>R</sub> (exo-) DNA Polymerase (NEB; #M0259) wurde für alle in dieser Arbeit durchgeführten PCR Reaktionen verwendet.

Ein Standardansatz in einem Volumen von 50  $\mu$ l enthielt folgende Komponenten:

Komponente	Volumen
DNA (aus einer Rapid Lysis)	1 $\mu$ l
10x PCR-Puffer mit Mg <sup>2+</sup>	5 $\mu$ l
10 mM dNTP Mix	1 $\mu$ l
10 $\mu$ M forward Primer	1 $\mu$ l
10 $\mu$ M reverse Primer	1 $\mu$ l
Deep Vent-DNA-Polymerase	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	40 $\mu$ l
Gesamtvolumen	50 $\mu$ l

## Material & Methoden

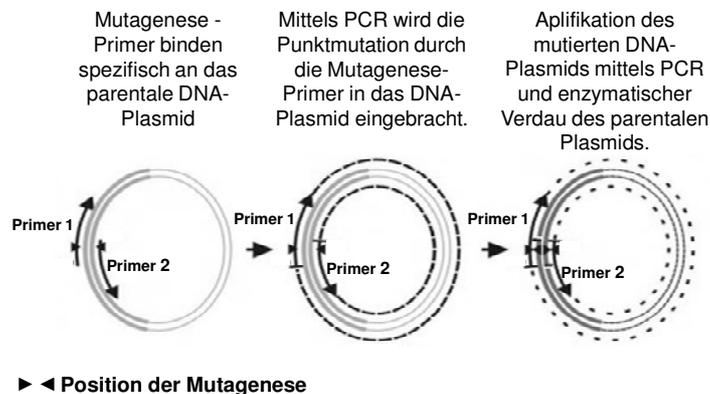
Folgendes Programm wurde für die Inkubation der Standardansätze verwendet:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	93 °C	3 min	1
Denaturierung	94 °C	45 s	30
Annealing	58 °C	45 s	
Elongation	72 °C	5 min	
Endelongation	72 °C	7 min	1
Dauerkühlung	4 °C	∞	

Zur Bestimmung des Molekulargewichts des entstandenen PCR-Produkts wurden 5 µl dem Ansatz entnommen und zur Analyse auf ein 1% Agarosegel aufgetragen.

### 2.1.9. Quick change PCR

Dieses Verfahren einer PCR dient dazu, um gerichtet Punktmutationen in eine DNA Sequenz einzuführen. Hierfür wurde der PCR Standardansatz (siehe 2.1.8.) abgewandelt. So wurden nur 10-20 ng DNA und spezielle Mutageneseprimer verwendet (Protease Quickchange fw und Protease Quickchange rv, siehe Anhang).



**Abb 2:** Schematische Darstellung des Quick change PCR Verfahrens. Durch die Mutageneseprimer wurde in einer DNA Sequenz mittels PCR eine Punktmutation (gekennzeichnet durch: ▶◀) eingebracht. Anschließend erfolgte eine Amplifikation des mutierten Plasmids mit weiteren PCR Zyklen. Die parentale DNA Sequenz wurde dann mit Hilfe des Enzyms Dpn I abgebaut. Das mutierte Plasmid konnte dann durch Transformation von *E.coli* vervielfältigt und anschließend durch das *Rapid Lysis* Verfahren gewonnen werden.

## Material & Methoden

Folgendes PCR Programm wurde für die Punktmutagenese verwendet:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	93 °C	3 min	1
Denaturierung	94 °C	45 s	
Annealing	58 °C	45 s	12
Elongation	72 °C	1 min/kBp	
Endelongation	72 °C	7 min	1
Dauerkühlung	4 °C	∞	

Im Anschluss an die PCR erfolgte ein enzymatischer Verdau mit Dpn I (NEB). Hierfür wurde der PCR Ansatz mit 6 µl des 10x Buffer 4 (NEB), mit 3 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und mit 1 µl Dpn I versetzt. Dpn I baut nur die methylierte, parentale DNA ab, die durch die PCR entstandene, nicht methylierte DNA Sequenz bleibt erhalten. Der enzymatische Verdau erfolgte bei 37 °C für 1 h. Anschließend wurde der Ansatz mit 200 µl PB Buffer (Qiagen, QIAquick Gel Extraction Kit) versetzt und analog zu Kapitel 2.1.6. mit aufgereinigt. Anschließend erfolgte eine Transformation von kompetenten *E.coli*, welche das mutierte DNA Plasmid vervielfältigten (siehe 2.1.2.). Die erhaltenen Klone wurden zuerst mittels Restriktionsverdau und dann mittels DNA Sequenzierung überprüft.

### 2.1.10. Gensynthese

Die synthetische Produktion von Gensequenzen verschiedenster Länge wurde von der Geneart AG (Regensburg) durchgeführt.

### 2.1.11. DNA Sequenzierung

Alle DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Geneart AG (Regensburg) nach dem Sanger-Verfahren durchgeführt. Die Proben wurden sequenzierfertig aufbereitet (Gesamtvolumen 8 µl: 300 ng Plasmid-DNA, davon 1 µl Sequenzieroligonukleotid) und nach der Sequenzierung mit dem Rechnerprogramm Chromas ausgewertet.

## 2.2. Zellkulturtechniken und Expressionsanalysen

### 2.2.1. Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Lebendzellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierzu wurden 100 µl einer gründlich resuspendierten Zellkultur mit 100 µl einer 0,5%-igen Trypanblau-Lösung (Merck) vermischt. Hierbei können tote, blau gefärbte Zellen (Eindringen des Farbstoffes durch die Zellmembran) leicht von noch lebenden, transparenten Zellen unterschieden werden.

### 2.2.2. Transiente Transfektion von 293T-Zellen

#### *2.2.2.1. Polyethylenimin Transfektion*

Eine weitere, hocheffektive Methode der Proteinexpression ist die Transfektion Polyethylenimin (PEI, Polysciences), einem kationischem Polymer. PEI verdichtet DNA zu 0,2 bis 0,5 µm großen, positiv geladenen Partikeln, welche gerade noch groß genug, um auf der Zellschicht am Boden der Petrischale zu sedimentieren, aber klein genug sind, um die Zellmembran passieren zu können<sup>238, 239</sup>. Diese Partikel werden dann per Endozytose aufgenommen und gelangen in die Endolysosomen. Dort puffert PEI die Ansäuerung ab, wodurch die DNA geschützt wird und die Endolysosomen bis zur Ruptur zum Anschwellen gebracht werden. Die DNA gelangt so in das Zytoplasma der Zelle und mit Hilfe von PEI auch effizient in den Zellkern<sup>240</sup>, was zu einer gesteigerten Expression der eingebrachten Gene führt.

Für die Transfektion wurden am Vortag  $8 \times 10^6$  293T Zellen in einer 178 cm<sup>2</sup> Petrischale und in einem Volumen von 30 ml Kultivierungsmedium ausgesät und über Nacht inkubiert. Mindestens eine Stunde vor der Transfektion wurde das Kultivierungsmedium durch Medium ohne Zusätze ausgetauscht.

Für die Transfektion der Zellen wurden pro Petrischale 30 µg Qiagen-tip gereinigter Plasmid-DNA (Konzentration 1µg/µl) in 1350 µl Medium ohne Zusätze gelöst. Dann wurden 120 µl PEI (Konzentration 1µg/µl) zugegeben und vorsichtig vermischt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde das DNA/PEI Gemisch tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach 4 – 6 h Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurden die Zellen vorsichtig mit 5 ml warmen PBS gewaschen und anschließend Zugabe mit frischem Expressionsmedium, für insgesamt 48 Stunden im Brutschrank inkubiert.

## Material & Methoden

---

Bei der Kotransfektion von den CD40L Derivaten mit 97CN001SynGag wurde wiederum ein Verhältnis von Gag-Vektor zu CD40L-Vektor von zwei zu eins gewählt, bzw. bei der Dreifachtransfektion von CD40L Derivat, 97CN001SynGag und 97CN54 Env gp145 ein Verhältnis der Vektoren von eins zu eins zu eins.

### 2.2.3.. Aufbereitung der Zellüberstände der transient transfizierten 293T Zellen

Die Überstände aus den 178 cm<sup>2</sup> Petrischalen der transfizierten 293T Zellen wurden vereinigt und anschließend bei 3000 x g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert, um vorhandenen Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Zur Aufkonzentration der Gag bzw. GagPolNef Partikel, wurden die vorzentrifugierten Zellkulturüberstände über ein Kissen aus 30%-iger (w/w) Saccharoselösung geschichtet und die partikulären/vesikulären Strukturen durch Zentrifugation in einer Ultrazentrifuge (Beckmann Coulter Optima™ L-90K Ultracentrifuge; SW32Ti Rotor, Beckman; 2 h bei 99000 x g, 4°C) pelletiert. Das so erhaltene Pellet wurde in PBS ohne bivalente Ionen (PBS<sub>ohne</sub>) resuspendiert und ein Aliquot jeder Präparation wurde mittels eines Bradford Tests, einer Westernblot-Analyse, eines SandwichELISA und einer Coomassie Brilliant Blau Färbung charakterisiert.

### 2.2.4. Aufbereitung aufkonzentrierter virus-ähnlicher Partikel aus der Ultrazentrifugation

Zur Abtrennung weiterer Verunreinigungen wurden die aufkonzentrierten Pr55<sup>Gag</sup> Partikel auf einen Saccharose-Dichtegradienten (10 bis 50 %-ige (w/w) Saccharoselösung, in 10 % Schritten) aufgetragen und in einer Ultrazentrifuge (Beckmann Coulter Optima™ L-90K Ultracentrifuge; SW41 Rotor, Beckman; 2,5 h bei 99000 x g, 4°C) zentrifugiert. Anschließend wurden vorsichtig, von oben beginnend, jeweils 550 µl Aliquote abgenommen. Danach wurden die einzelnen Fraktionen mit PBS<sub>ohne</sub> auf 1,5 ml aufgefüllt und für 2 h bei 40000 x g (Sorvall EvolutonRC Zentrifuge; Kontron Instruments A6.14 Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde dann verworfen und die Rückstände in 40 µl PBSohne aufgenommen. Die gelösten Rückstände jeder Fraktion wurden dann mittels Westernblot analysiert.

### 2.2.5. Ernte und Aufschluss von Zellen

Zur Analyse der Proteinexpression in den jeweiligen eukaryontischen Zellen wurden die Zellen geerntet und aufgearbeitet. Hierfür wurde der Zellrasen mit kaltem PBS

(phosphate buffered saline <sup>241</sup>) und durch Versetzen mit Trypsin/EDTA (0,05/0,02% in PBS ohne bivalente Ionen, (PAN Biotech GmbH) quantitativ von Boden der 178 cm<sup>2</sup> Petrischale gelöst. Nach einer Zentrifugation bei RT und 300 g wurde das Zellpellet zur weiteren Aufarbeitung in 150 µl RIPA-Puffer (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1 % Nonidet P40, 0,5% Na-Deoxycholat, pH 8,0; vor dem ersten Gebrauch pro 10 ml Puffer eine Tablette PIC (Protease inhibitor cocktail, Roche) zugeben) unter starkem vortexen lysiert. Nach einer 10-minütiger Inkubation auf Eis, wurden die Zelltrümmer mittels einer 10-minütiger Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) bei 20000 g pelletiert. Die Pellets wurden verworfen und die Überstände, die die gesuchten Proteine enthielten, wurden für weitere Analysen bei -20 °C weggefroren.

### 2.2.6. Quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Westernblotanalyse und der quantitativen Beurteilung mittels Comassiefärbung der exprimierten Proteine aus den Überständen bzw. den lysierten Zellen wurde zunächst die Gesamtproteinmenge in den jeweiligen Ansätzen quantitativ mit dem Bradford-Protein-Assay nach den Angaben des Herstellers (BIORAD, München) bestimmt. Das Reagenz dieses Testsystems unterliegt nach Bindung an Proteine einer Farbänderung, die sich photometrisch in einer Absorptionzunahme bei 595 nm äußert. Aus dem Vergleich der gemessenen OD mit den OD-Werten einer Eichkurve, die aus definierten Konzentrationen an Bovinem Serumalbumin (BSA) ermittelt wurde, lässt sich nun die Proteinmenge näherungsweise bestimmen.

### 2.2.7. Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine in Gegenwart eines hohen SDS-Überschusses elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dabei lagert sich das negativ geladene SDS in konstanten Gewichtsverhältnissen an die Proteine an und kompensiert deren Eigenladung so, dass alle Proteine etwa ihrer Größe entsprechend negativ geladen sind und zur bei Anlegen einer Spannung zur Anode wandern. Dabei werden die Proteine zuerst in einem niederprozentigem Sammelgel aufkonzentriert, von welchem dann alle Polypeptide gemeinsam in das eigentliche Trenngel übergehen.

## Material & Methoden

Der Aufbau der verwendeten Gelapparaturen und das Gießen der Gele ist der Beschreibung der Gerätehersteller (BIOMETRA, Göttingen) zu entnehmen, die genaue Zusammensetzung der Gellösungen ist in der nachfolgenden Tabelle beschrieben. Für die jeweilige Proteinanalyse aus den Überständen wurde 5 µg und für die Analyse der aufgeschlossenen Zellen wurde 50 µg Protein in einem Gesamtvolumen 20 µl mit 5 µl fünffach konzentriertem SDS-Probenpuffer (125 mM Tris pH 6,8, 2% 2-β-Mercaptoethanol, 10% Glycerin, 1 mM EDTA, 0,005% Bromphenolblau) versetzt. Für die Westernblotanalyse der einzelnen Fraktionen eines Saccharosegradienten wurde zu jeweils 10 µl einer Fraktion, ohne deren Proteingehalt weiter zu bestimmen, 30 µl H<sub>2</sub>O und 10 µl fünffach SDS-Probenpuffer gegeben. Nachdem dann die Proben für 10 min bei 92°C aufgeköcht und kurz abzentrifugiert wurden, sind sie auf das Gel aufgetragen worden. Die Elektrophorese erfolgte in einem speziellem SDS-PAGE Laufpuffer (25 mM Tris/HCl pH 7,5, 190 mM Glycin, 0,1% SDS) bei 20 bis 60 mA.

Bestandteile	Trenngel 12,5%	Sammelgel 5%
30% Acrylamid-0,8% Bisacrylamid-Stammlösung	7,5 ml	0,99 ml
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	3,6 ml	1,2 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	3,3 ml	2,61 ml
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamine)	15 µl	6 µl
10% Ammoniumpersulfat (APS)	90 µl	30 µl

Für große Gele, die für die Analyse von Saccharosegradienten benötigt wurden, wurden die doppelten Volumen der oben aufgeführten Komponenten verwendet.

### 2.2.8. Färbung mit Coomassie Brilliant Blau

Für die Anfärbung von aufgetrennten Proteinen wurden die Proteingele nach der SDS-Gelelektrophorese mindestens fünf Stunden lang bei RT in einer Färbelösung (45% Ethanol, 10% Essigsäure, 0,25% Coomassie Brilliant Blau R250) inkubiert. Anschließend wurden die gefärbten Gele in einer Entfärbelösung (45% Ethanol, 10% Essigsäure) solange leicht geschüttelt, bis die Proteinbanden klar erkennbar waren.

Zur Konservierung wurden die Gele anschließend auf Whatman 3 mm – Papier im Vakuum bei 65°C für zwei Stunden getrocknet.

### 2.2.9. Westernblotanalyse

Der Transfer von aufgetrennten Proteinen aus einem Polyacrylamid-Trenngel auf eine 0,45 µm Nitrozellulosemembran erfolgte in einer Fast-Blot „semidry“-Apparatur (BIOMETRA, Göttingen) unter Verwendung eines leitfähigen BIORAD-Transferpuffers (150 mM Glycin, 25 mM Tris pH 8,3, 10% Methanol) für 45 min bei einer maximalen Stromstärke von 0,6 A. Die Proteine wandern nach Anlegen der Spannung, entsprechend ihrer nach SDS-Behandlung negativen Ladung, in Richtung Anode und werden auf der Nitrozellulose immobilisiert. Der erfolgte Proteintransfer wurde durch reversible Proteinfärbung mit Ponceau S-Lösung (0,2 g Ponceau S, 3 g Trichloressigsäure, 3 g Sulfosalicylsäure, in 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub><sup>241</sup> überprüft. Anschließend wurde die Färbung mit Wasser oder TTBS (500 mM NaCl, 25 mM Tris pH 7,5, 0,02 M Tween 20) wieder ausgewaschen. Der spezifische Nachweis spezifischer Proteine auf der Nitrozellulosemembran beruht auf der Bindung eines primären, monoklonalen Antikörpers und dessen Erkennung durch einen sekundären, Enzym-konjugierten Antikörper. Die chemische Reaktion durch das an den sekundären Antikörper gekoppelten Enzym alkalische Phosphatase (AP) mit Substrat führt zu einer Anfärbung, welche dann die Position des gesuchten Proteins auf der Membran anzeigt. Um freie und unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran abzusättigen, wurde diese nach dem Blotten über Nacht bei RT in einer 5 % Magermilch-TBS (tris buffered saline: 150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7,5)-Lösung inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran drei Mal für 10 min mit TTBS (tween-tris buffered saline: 150mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, 0,02 M Tween 20, pH 7,5)-Lösung gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper für eine Stunde bei RT. Anschließend wurde die Membran wie zuvor gewaschen, der sekundäre, AP-gekoppelte Antikörper zugegeben und wiederum für eine Stunde bei RT inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde dann durch abschließendes Waschen (s. o.) entfernt. Die Färbereaktion wurde schließlich durch Zugabe von AP-Färbelösung (400 µl NBT/BCIP-Stocklösung in 20 ml AP-Puffer (100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris<sup>241</sup> gestartet und nach dem Erreichen der gewünschten Intensität der Färbung durch Spülen der Membran mit Wasser

gestoppt. Die eingesetzten Antikörper mit den entsprechenden Verdünnungen sind im Anhang aufgelistet.

### 2.2.10. Quantifizierung des HIV-1 Capsidantigens (p24-ELISA)

Um die Menge des Pr55<sup>gag</sup> in Kulturüberständen zu quantifizieren, setzte man sie in unterschiedlichen Verdünnungen im *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) ein. Dazu wurden 96-well *MaxiSorp*-ELISA-Platten (NUNC, Wiesbaden) bei 4°C über Nacht mit 100 µl einer 1:1000-Verdünnung des CA (p24)-spezifischen monoklonalen M01-Antikörpers (Polymun, Wien, A) in 0,1 M Carbonatpuffer (pH 9,5) inkubiert, was zur unspezifischen Bindung der Antikörper an die Plastikoberfläche des *wells* führte. Anschließend wusch man die Platten 3 x mit 100 µl Waschpuffer (0,05% Tween 20 in PBS<sub>ohne</sub>). Die unterschiedlichen Verdünnungen der Zelllysate wurden in dem Medium erstellt, das auch für die Kultivierung von 293T-Zellen Verwendung fand. Danach konnten je 100 µl der verdünnten Proben in je ein *well* gegeben werden. Nach Inkubation für eine Stunde bei 37°C, in der CA an den immobilisierten M01-Antikörper bindet, wurde 6 x mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend gab man pro *well* 100 µl des CA-spezifischen, biotinylierten, monoklonalen Antikörpers 37G12 (Polymun, Wien, A; Verdünnung 1:80.000 in PBS<sub>ohne</sub> / 1% BSA) zu und inkubierte den Ansatz für eine Stunde bei RT. Nach 10 x Waschen mit Waschpuffer wurden 100 µl eines 0,05 U/ml Streptavidin-HRP (*horseradish peroxidase*)-Konjugates (Roche, Mannheim; 500 U/ml, verdünnt 1:10.000 in PBS<sub>ohne</sub> / 1% BSA) zu den Proben gegeben und für 30 min. bei RT inkubiert. Nach 10 x Waschen mit Waschpuffer wurden die Antikörperkonjugate mit 100 µl einer 1:1-Verdünnung der „OptEIA“ TMB (Tetramethylbenzidin)-Substratlösung (BD Biosciences, San Diego, USA) angefärbt und für 5-10 min. im Dunkeln inkubiert. Mit je 50 µl 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> konnte die Farbreaktion gestoppt und die Absorption bei 450 nm im *Microplate Reader Mode* 680-Lesegerät (Biorad, München) mit dem zugehörigen Programm *Microplate Manager* 5.2 (Biorad laboratories, Hercules, USA) gemessen werden. Die Pr55<sup>gag</sup>-Konzentration ließ sich mit Hilfe einer Kalibrierungskurve unter Verwendung serieller Verdünnungen von gereinigtem CA (Polymun, Wien, A) abschätzen.

### 2.2.10. Quantifizierung von murinem CD40L mit Hilfe der ELISA Technologie

Für die Mengenbestimmung von murinem CD40L in Zellkulturüberständen und VLP Präparationen wurde das Protokoll von einem humanen CD40L *Sandwich*ELISA der

## Material & Methoden

---

Firma BD Pharmingen adaptiert. Hierfür wurden 96-well *MaxiSorp*-ELISA-Platten (NUNC, Wiesbaden) bei 4°C über Nacht mit 100 µl einer Verdünnung (2µg/ml in 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 9,0) des für murinen CD40L-spezifischen monoklonalen Antikörpers (Hamster anti-mouse CD40L, Klon MR1) inkubiert. Anschließend wusch man die Platten 3 x mit 100 µl Waschpuffer (0,05% Tween 20 in PBS<sub>ohne</sub>) und blockte die Platten mit Blockpuffer (10% FKS in PBS<sub>ohne</sub>) für mindestens 1 h bei Raumtemperatur. Inzwischen wurden die Verdünnungen des aufgereinigtem MegaCD40L (20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,63 und 0,31 ng/ml) der als Standard diente, und die 1:10 Verdünnung der Proben (Verdünnung in Block/Tweenpuffer (PBS<sub>ohne</sub> mit 10% FKS und 0,05% Tween-20)) hergestellt. Nach erneutem dreimaligem Waschen der Platten wurden die Proben und die Verdünnungen des Standards auf die Platten aufgetragen und für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Platten erneut mindestens vier Mal gewaschen und danach wurden jeweils 100 µl einer Verdünnung (1µg/ml in Blockpuffer) des biotinylierten, CD40L-spezifischen Detektionsantikörper (R&D Systems) aufgetragen. Nach einer weiteren einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten mindestens vier Mal gewaschen. Anschließend wurde 100 µl eines 0,05 U/ml Streptavidin-HRP (*horseradish peroxidase*)-Konjugates (Roche, Mannheim; 500 U/ml, verdünnt 1:1000 in Blockpuffer) zu den Proben gegeben und für 30 min. bei RT inkubiert. Nach >5 x Waschen mit Waschpuffer wurden die Antikörperkonjugate mit 100 µl einer 1:1-Verdünnung der „OptEIA“ TMB (Tetramethylbenzidin)-Substratlösung (BD Biosciences, San Diego, USA) angefärbt und für 5-10 min. im Dunkeln inkubiert. Mit je 50 µl 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> konnte die Farbreaktion gestoppt und die Absorption bei 450 nm im *Microplate Reader Mode* 680-Lesegerät (Biorad, München) mit dem zugehörigen Programm *Microplate Manager* 5.2 (Biorad laboratories, Hercules, USA) gemessen werden. Die Konzentration des murinen CD40L ließ sich mit Hilfe einer Kalibrierungskurve unter Verwendung der seriellen Verdünnungen von gereinigtem MegaCD40L (Apoxis, Lausanne) abschätzen.

### 2.3. Immunologische Analysemethoden

#### 2.3.1. Haltung und Immunisierung von Versuchstieren

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

Wie jeweils pro Immunisierungsstudie vermerkt, wurden die Tiere im Alter von acht Wochen grundimmunisiert, gefolgt von je nach Schema ein oder zwei *Booster*-Immunisierungen nach dem *Priming*.

Zur intramuskulären (i.m.) Immunisierung wurden die Tiere zunächst mittels des Inhalationsnarkotikums Isoflurane (Baxter, Unterschleißheim) betäubt. Für die Immunisierungen wurde die Region um die Einstichstelle rasiert und die gewünschte Menge eines entsprechenden Antigens in einem Volumen von je 50 µl langsam in beide Schienbeinmuskeln (*tibialis anterior*) injiziert.

#### 2.3.2. Präparation und Isolierung von Milzzellen (Splenozyten)

Für die Untersuchung der mitogenen Eigenschaften von Antigenen, sowie der zellulären Immunantwort mittels diverser immunologischer Methoden wurden murine Milzzellen benötigt.

Zur Gewinnung von Milzzellen wurden die Versuchstiere durch Genickbruch getötet, deren Milzen unter sterilen Bedingungen entnommen und in 5 ml Puffer (PBS<sub>ohne</sub>, 5 % FKS) pro Organ überführt. Zur Herstellung von Einzelzellsuspensionen wurden die Milzen unter einer Sterilwerkbank mit Hilfe eines Stempels einer 5 ml Spritze vorsichtig durch ein Nylonsieb (FALCON, Heidelberg, 100 µm Porengröße) in eine Petrischale zerrieben. Diese erhaltene Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und für fünf Minuten in einer Tischzentrifuge bei RT und 300 g pelletiert. Damit die Erythrozyten aufgeschlossen und damit aus dem Zellgemisch entfernt werden, wurde das Pellet pro verwendeten Organ in 5 ml Lysepuffer (150 mM NH<sub>4</sub>Cl, 1 mM KHCO<sub>3</sub>, 0,1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7,2) aufgenommen und bei 300 g fünf Minuten zentrifugiert. Danach wurden die Zellen zur Abtrennung des freigesetzten Hämoglobins dreimal mit 50 ml PBS, 5 % FKS gewaschen. Anschließend wurde die Lebendzellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und durch Zugabe von Kompletmedium (RPMI-Medium, 5 % FKS, 1 %

## Material & Methoden

---

P/S, 50  $\mu$ M 2-Mercaptoethanol, 1 % Glutamin) auf eine Konzentration von  $2 \times 10^7$  pro ml eingestellt.

Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank gehalten. Auf diese Weise konnten je nach Größe der Milz bis zu  $10^8$  Zellen gewonnen werden. Die isolierte Zellpopulation setzt sich zu aus 60 – 70 % aus B-Lymphozyten, zu etwa 15 – 20 % aus CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sowie aus 10% Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen zusammen. Zudem befindet sich eine geringe Zahl neutrophiler Granulozyten, NK-Zellen und Fibroblasten in den isolierten Milzzellen.

### 2.3.3. Präparation und Isolierung von murinen Knochenmarkszellen

Die Ober- und Unterschenkelknochen der getöteten Mäuse wurden präpariert und das Muskelgewebe entfernt. Die Knochen wurden dann in 5 ml Puffer (PBS<sub>ohne</sub>, 5 % FKS) überführt. Anschließend wurden unter einer Sterilwerkbank die Knochenenden abgeschnitten und das Knochenmark mit frischem Puffer in eine Petrischale herausgespült. Die Zellsuspension wurde dann in 50 ml Falcon überführt und die Lyse der Erythrozyten erfolgte analog zu Kapitel 2.3.2. . Danach wurde die Lebendzellzahl bestimmt und die Zellkonzentration auf  $2 \times 10^7$  Zellen /ml mit Kompletmedium eingestellt (siehe 2.3.2.).

### 2.3.4. Präparation und Isolierung muriner B220<sup>+</sup> B-Lymphozyten

Aus den, wie in Kapitel (s.o.) beschrieben, gewonnenen Splenozyten wurden mit Hilfe von CD45R(B220) MicroBeads und MACS<sup>®</sup> LS Säulen (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) die CD45R(B220) positiven Zellen nach den Vorgaben des Herstellers aufgereinigt. Das CD45R bzw. B220 Antigen, eine Tyrosinphosphatase, ist auf B-Lymphozyten während aller Entwicklungsstadien hindurch präsent, wird aber bei der Ausdifferenzierung zu Plasmazellen herabreguliert. CD45R/B220 ist der gebräuchlichste PanB-Lymphozyten Marker.

Die Aufreinigung basiert darauf, dass die magnetisierten CD45R(B220) Microbeads an die B-Lymphozyten binden. Wenn die Zellsuspension auf eine MACS<sup>®</sup> LS Säule, die im Magnetfeld eines MACS<sup>®</sup> Separators plziert wurde, geladen wird, werden die markierten B-Lymphozyten aufgrund der wirkenden magnetischen Kräfte in der Säule zurückgehalten. Alle anderen vorhandenen Zellsubpopulationen, an denen die Microbeads nicht binden konnten, werden aus der Säule gewaschen. Entfernt man

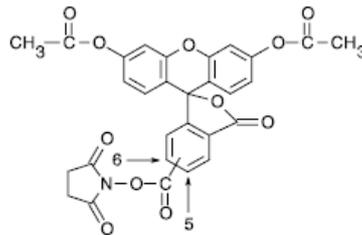
dann die Säule aus dem Magnetfeld, können die zurückgebliebenen CD45R/B220<sup>+</sup> Zellen als die positiv selektionierte Fraktion eluiert werden.

Die Reinheit der selektionierten Fraktion wurde dann mittels eines  $\alpha$ -murin CD45R/B220 spezifischen, PE bzw. FITC gekoppelten Antikörper (BD PharMingen, #553089 bzw. #553087) im FACS analysiert.

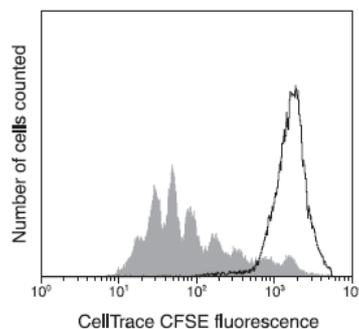
### 2.3.5. Quantifizierung der Proliferation von B-Lymphozyten mittels CFSE

Carboxyfluoresceindiacetatsuccinimidylester (CFSE) kann passiv in Zellen diffundieren und ist solange farblos und nichtfluoreszierend bis die Acetatgruppen von intrazellulären Esterasen abgespalten werden und der stark fluoreszierende Carboxyfluoresceinsuccinimidylester entsteht (siehe Abb. 3A).

**A**



**B**



**Abb.3: A)** Struktur des Carboxyfluoresceindiacetatsuccinimidylester (CFSE) (Invitrogen).

**B)** Humane, periphere Blutlymphozyten wurden isoliert und mit CFSE gefärbt. Ein Teil der Population wurde in der parentalen Generation mittels Mitomycin C arretiert (Schwarzer Peak). Die restlichen Zellen wurden mit Phytohemagglutinin stimuliert und konnten 5 Tage lang proliferieren. Die grauen Kurven repräsentieren die Tochtergenerationen (Invitrogen).

Die Succinylestergruppe reagiert mit intrazellulären Aminen, welche dann fluoreszierende Konjugate bilden. Diese Farbstoff-Protein Konjugate werden in den Zellen zurückgehalten und auch nicht an benachbarte Zellen weitergegeben. Teil sich nun die gefärbte Zelle, werden die Konjugate gleichmäßig an die Tochterzellen weitergegeben, d.h. die Stärke der Fluoreszenz in den Zellen nimmt ab.

Analysiert man nun die Zellpopulation per FACS kann man die Proliferation und die Generationenfolge anhand der abnehmenden Fluoreszenzintensitäten (*Peaks*) verfolgen (siehe Abb. 3B).

### 2.3.6. Quantifizierung der Zahl IFN- $\gamma$ produzierender CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung der Frequenz Pr55<sup>Gag</sup>-spezifischer zytotoxischer T-Zellen wurden die Mäuse der verschiedenen Immunisierungsgruppen getötet, die Milzen wie in Kapitel 2.3.2. Mäusen entnommen und in vitro auf  $2 \times 10^7$  Zellen pro ml mit Kompletmedium eingestellt. Danach wurden jeweils 100  $\mu$ l der Milzzellsuspension und 0,2  $\mu$ l Blockierungslösung BFA (Brefeldin A, Sigma #B-6542) pro Napf einer 96-Napf-Flachbodenplatte pipettiert. Zur Bestimmung der Zahl Pr55<sup>Gag</sup>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit dem Peptid A9I (0,2  $\mu$ l), welches ein H-2<sup>d</sup> restringiertes p24 CTL-Epitop beinhaltet<sup>242</sup>, stimuliert. Zur Messung Env-spezifischer CTL-Antworten wurde das V3-Peptid<sup>243, 244</sup> aus der V3-Schleife des HIV Hüllproteins gp120 verwendet. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit je 0,1  $\mu$ l PMA und Ionomycin verwendet. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die entweder mit dem irrelevanten Peptid Pol oder mit 100  $\mu$ l RPMI-Medium stimuliert worden waren. Anschließend wurden die Ansätze für sechs Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen für fünf Minuten bei 1200 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit 200  $\mu$ l PBS ohne bivalente Ionen (1% FKS, 1 mg/ml NaN<sub>3</sub>) wurden die Zellen in 96-Napf-Rundbodenplatten transferiert. Die Blockierung der Fc-Rezeptoren erfolgte durch Zugabe von 1  $\mu$ l CD16/32 Antikörper (CD16/32- $\alpha$ -mouse: PharMingen #0141A) in 100  $\mu$ l FACS-Puffer. Die Inkubationsdauer beträgt mindestens zehn Minuten bei 4°C.

Zur Differenzierung von T-Helfer- und zytotoxischen T-Zellen wurden pro Napf 10  $\mu$ l einer 1:20 Antikörperverdünnung von CD4-FITC (CD4-FITC- $\alpha$ -mouse, PharMingen #01064D) und CD8-APC (CD8a-APC- $\alpha$ -mouse; PharMingen #01049A) zugegeben und für 25 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach einem weiterem zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer-II (PBS ohne bivalente Ionen, 1mg/ml NaN<sub>3</sub>) wurden 250  $\mu$ l pro Napf Cytofix/Cytoperm (4 % PFA, 1 % Saponin; PharMingen #2091KZ) zugegeben und die Zellen auf Eis für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach weiterem zweimaligem Waschen mit jeweils 200  $\mu$ l (pro Napf) Perm/Wash (PBS, 0,1 % Saponin; PharMingen #2091KZ) erfolgte die intrazelluläre Färbung unter

Verwendung eines IFN- $\gamma$ -PE- $\alpha$ -mouse (PharMingen #18115A) Antikörpers. Pro Napf wurden 100  $\mu$ l Perm/Wash Puffer vorgelegt, 10  $\mu$ l einer 1:20 Verdünnung dieses Antikörpers zugegeben und die Ansätze für 25 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach dem anschließenden zweimaligem Waschen mit Perm/Wash Puffer wurden die Zellen in 200  $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Die anschließende Bestimmung IFN- $\gamma$  produzierender Zellen erfolgte am FACS-Calibur (PharMingen). Zuerst wurde die Gesamtpopulation an Lymphozyten bestimmt und anschließend mit Hilfe der Oberflächenmarker auf CD4- und CD8-positive Zellen gated. Mindestens 25000 CD8-positive Zellen wurden aufgenommen und bezüglich ihrer IFN- $\gamma$  Produktion untersucht.

### 2.3.7. Bestimmung IFN- $\gamma$ produzierender Splenozyten mittels ELISpot Technologie

Alternativ zur intrazellulären IFN- $\gamma$ -Färbung kann die Bestimmung der Anzahl IFN- $\gamma$ -sezernierender Zellen auch im ELISpot Assay erfolgen.

Dafür wurden zunächst mit Nitrozellulose beschichtete 96-Napf Zellkulturplatten (MAHA-S45 Millipore, Eschborn) mit 100  $\mu$ l einer Anti-Maus IFN- $\gamma$  (R4-6A2) Antikörperverdünnung (1:500 verdünnt in PBS; siehe auch Tab. B-5) über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit *Blocking* Reagenz (PBS +1 % FKS) unter sterilen Bedingungen, wurde die Platte 1 h bei 37 °C mit 200  $\mu$ l *Blocking* Reagenz blockiert. Anschließend wurde das *Blocking* Reagenz quantitativ entfernt und je 100  $\mu$ l unterschiedlicher Stimulationsreagenzien in den preinkubierten Wells vorgelegt. Die Stimulationsreagenzien enthielten entweder spezifisches oder unspezifisches Peptid (10 mM) je 1:500 in RPMI Medium verdünnt. Als weitere Negativkontrolle für die Stimulation diente RPMI Medium. Als Positivkontrolle wurde eine PMA/Iono-Lösung verwendet, die unspezifisch eine starke IFN- $\gamma$ -Produktion induziert (PMA/Iono-Lösung: 0,1  $\mu$ g/ml Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), 1  $\mu$ g/ml Ionomycin (Iono) in RPMI Medium). Danach wurden 100  $\mu$ l einer frisch präparierten Splenozytensuspension ( $1 \times 10^7$  Zellen/ml) zu den Stimulationsansätzen gegeben und 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der *in vitro* Restimulation wurden die Zellen durch sechsmaliges Waschen mit Wasch-/Lysepuffer (PBS mit 0,05 % Tween-20) lysiert. Anschließend wurden je 100  $\mu$ l eines sekundären, biotinylierten Anti-Maus IFN- $\gamma$  Antikörpers (XMG1.2) (1:1000 verdünnt in PBS; siehe auch Tab. B-5) zugegeben und weitere 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die ELISpot-Platte erneut zehnmal mit Wasch-/ Lysepuffer

gewaschen, 100 µl eines Streptavidin-AP-Konjugats (1:5000 verdünnt in PBS) (Roche, Mannheim) zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach weiterem zehnmalem Waschen mit Wasch-/Lysepuffer wurde durch Zugabe von je 50 µl AP-Färbelösung (100 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5) gefärbt. Nach deutlicher Entwicklung von lila-gefärbten Spots auf der Nitrozellulosemembran, wurde die Färbereaktion durch Waschen mit deionisiertem Wasser abgestoppt, die Platten getrocknet und die Anzahl der SFU (*spot forming units*) im ELISpot-Reader (Bioreader-2000, Biosys GmbH, Karben) quantifiziert.

### 2.3.8. Bestimmung von spezifisch Antikörper sezernierenden Zellen mittels ELISpot Technologie

Dieser ELISpot Assay ist eine Abwandlung des IFN- $\gamma$  und basiert auf der Publikation von Slifka *et al.* <sup>245</sup> und wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Mit dieser Methode ist es möglich die Frequenz von B-Plasmalymphozyten, die Antigen-spezifische Immunglobuline sezernieren, zu bestimmen.

Hierfür wurden zunächst mit Nitrozellulose beschichtete 96-Napf Zellkulturplatten (MAHA-S45 Millipore, Eschborn) mit 100 µl einer Antigenverdünnung (10 µg/ml rekombinantes Env gp140 oder aufgereinigte 97CN001 Gag VLP verdünnt in PBS<sub>ohne</sub>) über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer inkubiert.

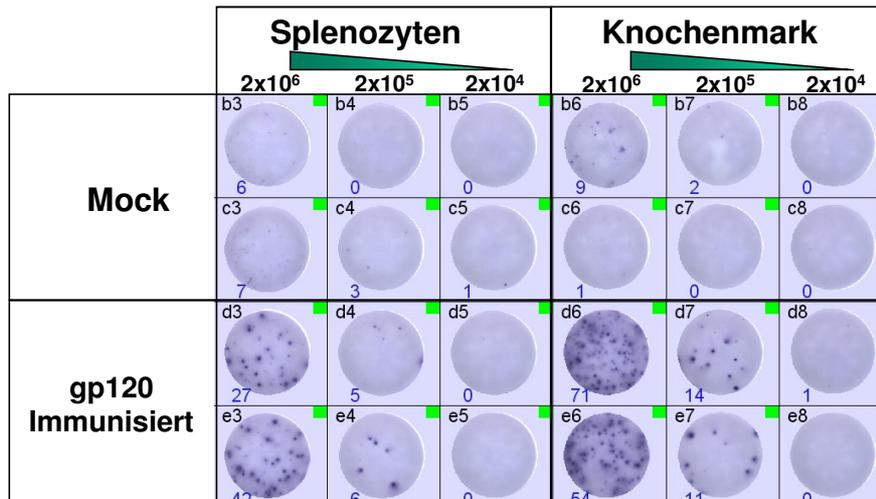
Am nächsten Tag wurden die Platten drei Mal mit PBS-T (PBS<sub>ohne</sub> mit 0,1% Tween-20) und drei Mal mit PBS<sub>ohne</sub> gewaschen. Anschließend wurden die Platten mindestens 1h bei 37°C mit 200 µl/Napf Komplettmedium (siehe 2.3.2.) geblockt. Danach wurden jeweils 100 µl einer frisch präparierten Splenozyten- (siehe 2.3.2.) bzw. Knochenmarkszellsuspension (siehe 2.3.3.) ( $2 \times 10^7$  Zellen/ml) pro Napf auf die Platten gegeben und mit jeweils weiteren 100 µl Komplettmedium versetzt. Eine Zellkonzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen pro Napf erwies sich in einem Vorversuch (siehe Abb. 4A) als optimal.

Die Platten mit den Zellen wurden dann für 16 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Platten drei Mal mit PBS<sub>ohne</sub> und drei Mal mit PBS-T gewaschen. Anschließend wurden 100 µl/Napf des AP gekoppelten Anti-Maus Immunoglobulin Antikörpers (Biorad, #170-6520; 1:1000 verdünnt in PBS-T mit 1% FKS) zugegeben und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Platten sechs Mal mit PBS-T und drei Mal mit PBS<sub>ohne</sub> gewaschen. Nun wurden die Platten durch Zugabe von je 50 µl AP-Färbelösung (100

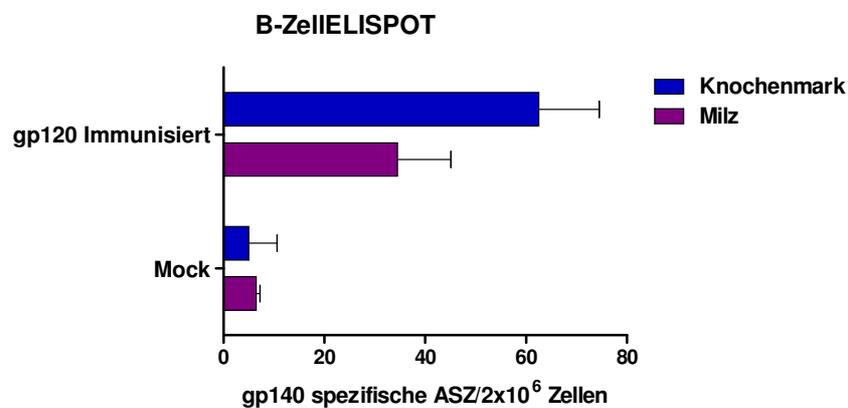
## Material & Methoden

mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5) gefärbt. Nach deutlicher Entwicklung von lila-gefärbten Spots auf der Nitrozellulosemembran, wurde die Färbereaktion durch Waschen mit deionisiertem Wasser abgestoppt, die Platten getrocknet und die Anzahl der SFU (*spot forming units*) im ELISpot-Reader (Bioreader-2000, Biosys GmbH, Karben) quantifiziert (siehe Abb. 4B).

**A**



**B**



**Abb. 4: A)** Entwickelte ELISpot Platte nach Inkubation mit Splenozyten und Knochenmarkszellen von immunisierten Mäusen, die mehrmals mit 97CN54Env gp120 immunisiert wurden, bzw. von nicht immunisierten Mäusen (Mock). Verschiedene Konzentrationen (2x10<sup>6</sup>; 2x10<sup>5</sup>; 2x10<sup>4</sup>) der präparierten Zellen wurden für 16 h bei 37 h auf einer mit rekombinatem 97CN54 Env gp140 beschichteten ELISpot Platte inkubiert. Anschließend wurde die Platte gegen murine Immunglobuline mit Hilfe eines spezifischen, AP-gekoppelten Antikörpers entwickelt. **B)** Auswertung des B-ZellELISPOT hinsichtlich der Frequenz von Zellen (ASZ) pro 2x10<sup>6</sup> Zellen, die für Env gp140 spezifische Antikörper sezernieren.

### 2.3.9. Gewinnung von Mausseren

Den Versuchstieren wurden je nach Immunisierungsplan durch Anritzen der Schwanzvene mit einem sterilen Skalpell Blut entnommen (100-500 µl). Zur Serumgewinnung wurde das Blut zunächst 1 h bei 37 °C und anschließend 1 h bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Blutproben zentrifugiert (5.200 x g; 4 °C; 10 min) und der klare Überstand als Serum in frische Probengefäße überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Serum bei -20°C gelagert.

### 2.3.10. Antikörper-ELISA

#### *2.3.10.1 Bestimmung der humoralen Immunantworten gegen 97CN54 Env gp140 und 97CN001 Gag*

Die Bestimmung der Antikörpertiter von Gag- und Env-spezifischen Gesamtimmunglobulinen erfolgte mittels Endpunktdilutions-ELISA. Dafür wurden 96-Napf Maxisorb Platten (Nunc, Wiesbaden) mit je 100 ng VLP HIV-1 97CN001 Pr55<sup>gag</sup> bzw. rekombinantes Env gp140 in 100 µl Carbonatpuffer (0,2 M NaHCO<sub>3</sub> pH 9,5 eingestellt mit 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) beschichtet (finale Proteinkonzentration je Napf 1 µg/ml) und über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer inkubiert.

Für die Analyse der Gag-spezifischen Antikörper wurden die Seren der Versuchstiere in Verdünnungspuffer (PBS<sub>ohne</sub>; 2 % (v/v) FCS; 3 % (v/v) Tween-20) seriell verdünnt (1:100/ 1:500/ 1:2500/ 1:12500/1:62500 /1:312500). Nach fünfmaligem Waschen der präinkubierten 96-Napf Platten mit Waschpuffer (PBS<sub>ohne</sub>; 0,05% Tween-20) wurden je 100 µl der hergestellten Serumverdünnungen auf die Platten aufgetragen und 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Platten sechsmal mit Waschpuffer gewaschen und mit je 100 µl einer geeigneten Verdünnung eines HRP-gekoppelten Antikörpers (siehe Tab. B-6) 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem sechsmaligem Waschen wurden je 100 µl TMB-Substratlösung (BD, Heidelberg) zugegeben. Im Dunkeln wurden die Proben bei Raumtemperatur so lange inkubiert, bis eine deutliche blaue Farbentwicklung eintrat. Dann wurde die Reaktion mit 100 µl 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt und die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch bestimmt.

Die Messung der Env gp140 spezifischen Antikörper erfolgte analog, nur für das Blocken der Platten wurde PBS<sub>ohne</sub> mit 2% BSA, zum Verdünnen der Seren PBS<sub>ohne</sub> mit 1% BSA und zum Waschen der Platten nur PBS<sub>ohne</sub> verwendet.

## Material & Methoden

---

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

### *2.3.10.2 Bestimmung der unspezifischen Immunglobulinsekretion*

Für die Bestimmung der unspezifischen Immunglobulinsekretion wurden 96-well *MaxiSorp*-ELISA- bei 4 °C über Nacht mit 100 µl einer Verdünnung (2 µg/ml in 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 9,0) des für murinen Immunglobuline spezifischen Antikörpers (Goat Anti-IgG (H+L chain specific), Southern-Biotech) inkubiert. Anschließend wusch man die Platten 3 x mit 100 µl Waschpuffer (0,05% Tween 20 in PBS<sub>ohne</sub>) und blockte die Platten mit Blockpuffer (10% FKS in PBS<sub>ohne</sub>) für mindestens 1 h bei Raumtemperatur. Inzwischen wurden die Verdünnungen 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,63 und 0,31 ng/ml eines murinen IgG2a Antikörpers (*affinity purified mouse IgG2a isotype control*, eBioscience), der als Standard diente, und die 1:10, 1:100 und 1:1000 Verdünnungen der Proben (Verdünnung in Block/Tweenpuffer (PBS<sub>ohne</sub> mit 10% FKS und 0,05% Tween-20)) hergestellt. Nach erneutem dreimaligem Waschen der Platten wurden die Proben und die Verdünnungen des Standards auf die Platten aufgetragen und für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Platten erneut mindestens vier Mal gewaschen und danach wurden jeweils 100 µl einer Verdünnung (1 µg/ml in Blockpuffer) des HRP gekoppelten, für murine Immunglobuline spezifischen Detektionsantikörper (Dako) aufgetragen. Nach einer weiteren einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten mindestens fünf Mal gewaschen. Anschließend wurden die Antikörperkonjugate mit 100 µl einer 1:1-Verdünnung der „OptEIA“ TMB (Tetramethylbenzidin)-Substratlösung (BD Biosciences, San Diego, USA) angefärbt und für 5-10 min. im Dunkeln inkubiert. Mit je 50 µl 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> konnte die Farbreaktion gestoppt und die Absorption bei 450 nm im *Microplate Reader Mode 680*-Lesegerät (Biorad, München) mit dem zugehörigen Programm *Microplate Manager 5.2* (Biorad laboratories, Hercules, USA) gemessen werden. Die Konzentration der murinen Immunglobuline ließ sich mit Hilfe einer Kalibrierungskurve unter Verwendung der seriellen Verdünnungen des gereinigten IgG2a (eBioscience) abschätzen.

## Ergebnisse

### 1. Generierung von HIV-1 Stamm C GagPolNef Konstrukten mit verschiedenen molekularen Eigenschaften

Als Ausgangskonstrukt für eine auf HIV-1 Stamm C GagPolNef basierende Vakzine sollte das innerhalb der Arbeitsgruppe hergestellte 97CN54 GagPolNef-pcDNA3.1(+) Plasmid dienen.



Abb. 1: Schematische Darstellung des kodonoptimierten 97CN54 GagPolNef Konstrukts. Myr- : Myristylierungssignal durch eine Punktmutation entfernt (Glycin (1G) zu Alanin (1A)); ΔFS: kein *frame shift*, Durchlesekonstrukt, d.h. keine Verschiebung im Leserahmen; Pr- : Protease durch eine Punktmutation inaktiviert (25D zu 25N); RT-N: Reverse Transkriptase N-terminaler Teil; RT-C: Reverse Transkriptase C-terminaler Teil; RT: Aktives Zentrum der Reversen Transkriptase; scNef: *scrambled* Nef, Nef in der Mitte geteilt und anschließend N- (N) und C- (C) terminaler Teil des Proteins miteinander vertauscht.

Dieses basiert auf dem chinesischen Virusisolat 97CN54<sup>246, 247</sup> und wurde für die Expression in Säugerzellen kodonoptimiert. Das Konstrukt wurde im Rahmen klinischer Studien (EuroVacc 01 und 02) in Lausanne und in London auch im Menschen getestet<sup>248, 249, 121</sup>. In diesen Studien wurde 97CN54 GagPolNef zusammen mit dem 97CN54 Env gp120 Konstrukt, die beide von der Geneart AG konzipiert, kodonoptimiert und synthetisiert wurden, sowohl als DNA Vakzine sowie in Form eines rekombinanten Vacciniavirus verabreicht<sup>250</sup>. Die hierdurch induzierten T-Zell Antworten richteten sich hauptsächlich gegen Env und nur zu einem geringeren Teil auch gegen die Gag und Pol Komponenten der Vakzine, wobei bei den meisten untersuchten Studienteilnehmern nur die Env-spezifischen Antworten über einen längeren Zeitraum nachweisbar waren.

Als Vakzine der nächsten Generation sollten folgende Veränderungen in das bestehende Konstrukt eingeführt werden:

- i. Wiederherstellung des Myristylierungssignals um eine Freisetzung virusähnlicher Partikel und damit *cross-priming* von Pr55<sup>gag</sup> zu gewährleisten.
- ii. Einführung eines *frame shift* für eine verbesserte Gag Expression.

# Ergebnisse

- iii. Wiederherstellung der viralen Proteaseaktivität, um eine Prozessierung der Subkomponenten zu ermöglichen und damit eine Partikelfreisetzung zu verbessern.

## 1.1. HIV-1 Stamm C Pr55<sup>Gag</sup>

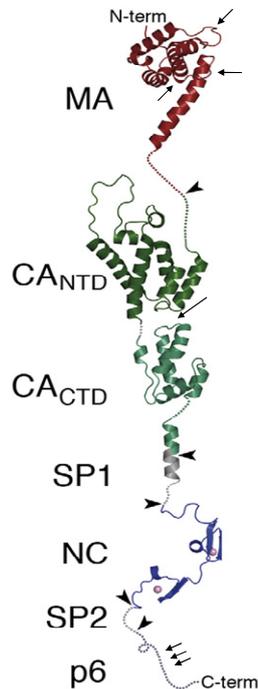
Bei der Wiederherstellung des Myristylierungssignals im Gag fiel auf, dass dieses immer noch Defizite in der Partikelfreisetzung aufwies. Ein Abgleich der Pr55<sup>Gag</sup> Aminosäuresequenz des 97CN54 mit der des 97CN001 Isolats<sup>251</sup>, welches dem gleichen Patienten entstammt, ergab sieben punktuelle Aminosäuresubstitutionen. Unter Zuhilfenahme verschiedener Publikationen konnte eine Topographie des Pr55<sup>Gag</sup> Proteins mit den wichtigsten Strukturen erstellt werden<sup>252, 41, 253, 254, 255, 256</sup>.

### A

AA 1 - 80	MA H1	MA H2	MA H3	MA H4	MA H5
97CN001	MGARASILRGGKLDKWEKIRLRPGGKKHYMLKHLVWASRELERFALNPGLLE <sup>T</sup> SEGCKQIMKQLOPALQ <sup>TGTEELRSLFN</sup>				
97CN54	MGARASILRGGKLDKWEKIRLRPGGKKHYMLKHLVWASRELERFALNPGLLE <sup>T</sup> SEGCKQIMKQLO <sup>SALQ</sup> TGTEELRSLFN				
AA 81 - 160	MA H6	CA <sup>N</sup> β-hairpin	CA <sup>N</sup> H1		
97CN001	TVATLYCVHTE IDVRDTKEALDKIEE <sup>E</sup> QNKIQQKTQAKEADGKVSQNYPIVQNLQGMVHQPISPRTLN <sup>AWVKVVEEKA</sup>				
97CN54	TVATPYCVHTE IDVRDTREALDKIEE <sup>E</sup> QNKIQQKTQAKEADGKVSQNYPIVQNLQGMVHQPISPRTLN <sup>AWVKVVEEKA</sup>				
AA 161 - 240	CA <sup>N</sup> H2	CA <sup>N</sup> H3	CA <sup>N</sup> H4	CypA	CA <sup>N</sup> H5 CA <sup>N</sup>
97CN001	F <sup>S</sup> PEVIPMF <sup>S</sup> ALS <sup>E</sup> GATPQDLN <sup>T</sup> MLN <sup>T</sup> VG <sup>G</sup> HQAAMQILKDTINEEAAEWDR <sup>L</sup> HPVHAGPIA <sup>P</sup> GQMREP <sup>R</sup> GS <sup>D</sup> IAGT <sup>T</sup> SNL				
97CN54	F <sup>S</sup> PEVIPMF <sup>S</sup> ALS <sup>E</sup> GATPQDLN <sup>T</sup> MLN <sup>T</sup> VG <sup>G</sup> HQAAMQILKDTINEEAAEWDR <sup>L</sup> HPVHAGPIA <sup>P</sup> GQMREP <sup>R</sup> GS <sup>D</sup> IAGT <sup>T</sup> SNL				
AA 241 - 320	H6	CA <sup>N</sup> H7	MHR	CA <sup>C</sup> H1	CA <sup>C</sup> H2
97CN001	QE <sup>Q</sup> IAWMTSNPPV <sup>P</sup> VGDIYKRWIILGLNKIVRMYSPTSILDIKQGP <sup>K</sup> EPFR <sup>D</sup> YVDR <sup>F</sup> FKTLRAEQATQDV <sup>KNWMTDTLLV</sup>				
97CN54	QE <sup>Q</sup> IAWMTSNPPV <sup>P</sup> VGDIYKRWIILGLNKIVRMYSPTSILDIKQGP <sup>K</sup> EPFR <sup>D</sup> YVDR <sup>F</sup> FKTLRAEQATQ <sup>GV</sup> KNWMTDTLLV				
AA 321 - 400	CA <sup>C</sup> H3	CA <sup>C</sup> H4	CA-NC spacer		
97CN001	Q <sup>N</sup> ANPDCKTILRALGPGASIEEMTACQGVGGP <sup>SH</sup> KAKVLA <sup>EAM</sup> SQ <sup>T</sup> NSAILM <sup>Q</sup> RSNFKGSKRIVK <sup>CF</sup> NCGKEGHIARN <sup>C</sup>				
97CN54	Q <sup>N</sup> ANPDCKTILRALGPGASIEEMTACQGVGGP <sup>SH</sup> KAKVLA <sup>EAM</sup> SQ <sup>T</sup> NSAILM <sup>Q</sup> RSNFKGSKRIVK <sup>CF</sup> NCGKEGHIARN <sup>C</sup>				
AA 401 - 480					
97CN001	RAPRKKGCWKC <sup>G</sup> KEGHQ <sup>M</sup> KDCTERQANFLGKIWP <sup>SH</sup> KGRPGN <sup>F</sup> LQNGPE <sup>PTAP</sup> PEESFRFGEETT <sup>TP</sup> SQKQEPIDKELYP				
97CN54	RAPRKKGCWKC <sup>G</sup> KEGHQ <sup>M</sup> KDCTERQANFLGKIWP <sup>SH</sup> KGG <sup>P</sup> GN <sup>F</sup> LQNR <sup>PE</sup> PTAPPEESFRFEEETT <sup>TP</sup> SQKQEPIDKELYP				
AA 481 - 497					
97CN001	L <sup>T</sup> SLKSLFGNDPSSQ				
97CN54	L <sup>T</sup> SLKSLFGNDPSSQ				

■ Ubiquitinylierungssignal      ■ Zinkfingerdomäne      ■ β-Faltblatt      **MHR:** Major Homology Region  
■ Interaktionsdomäne      ■ Mutation      ■ α-Helix      **CypA:** Cyclophilin A Binding Site  
■ CA-NC spacer: Protease Schnittstelle

**B**



**Abb. 2: A)** Schematische Darstellung des Aminosäureabgleichs von CN54 Gag und 97CN001 Gag. Wichtige strukturelle Domänen sind farblich und die sich unterscheidenden Aminosäuren rot gekennzeichnet. **B)** Dreidimensionales Modell des Pr55<sup>gag</sup>, das von hochaufgelösten Strukturen und Modellen der einzelnen Domänen abgeleitet wurde (Ganser-Pornillos *et al.* <sup>257</sup>). Unstrukturierte und Linker- Domänen sind mit gepunkteten Linien, die Schnittstellen der viralen Protease sind mit (◄) gekennzeichnet. Die ungefähren Positionen der Aminosäuresubstitutionen sind mit (◄) markiert.

Ein Abgleich mit der Los Alamos HIV-1 Datenbank ergab, dass alle gefundenen Substitutionen nahe bei oder innerhalb wichtiger und äußerst konservierter Regionen des Pr55<sup>gag</sup> liegen. Zudem wurde von 97CN001 nicht nur die Provirussequenz sondern auch infektiöse Virionen isoliert, was eine erfolgreiche Partikelfreisetzung impliziert.

In Folge dieser Erkenntnisse sollten die 97CN001 Gag Aminosäuresubstitutionen in das 97CN54 Gag eingeführt werden.

Die wildtyp Gensequenz des 97CN001 Gag wurde mit Unterstützung der Geneart AG an den Kodongebrauch von Säugerzellen angepasst, um sogenannte *inhibitory or instability elements* (INS) <sup>258</sup> zu entfernen, welche i) die RNA Stabilität reduzieren, ii) den Kernexport viraler RNAs regulieren und iii) im Kontext zellulärer und HI-viraler Transaktivatoren die zeitliche Abfolge der HIV-1 Genexpression kontrollieren. Durch die Kodonoptimierung wurde damit die Pr55<sup>gag</sup> Expression von viralen bzw. zellulären Kontrollen entkoppelt und somit gesteigert. Im Falle eines kodonoptimierten HIV-1 Pr55<sup>gag</sup> vom Stamm HX10 konnte gezeigt werden, dass korrelierend mit der verbesserten Antigenproduktion, die Immunogenität im Vergleich

## Ergebnisse

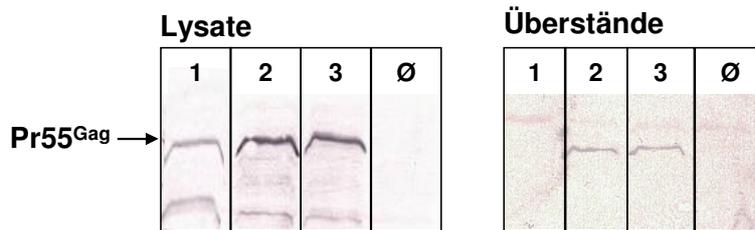
---

zum wildtyp Gen signifikant verstärkt wird <sup>259, 260</sup>. Die Optimierung bietet auch hinsichtlich der Sicherheit möglicher Vakzinekandidaten Vorteile, indem das Risiko möglicher Rekombinationen durch den Verzicht auf das transaktive Rev-Protein und das RNA Verpackungssignal, sowie die Vermeidung homologer Sequenzen zum HIV wildtyp Genom dramatisch gesenkt wird <sup>261</sup>.

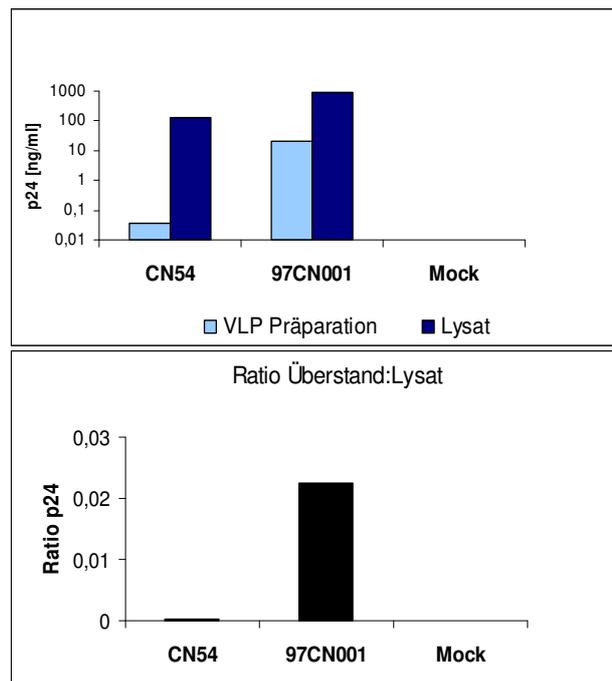
Nach Erhalt des kodonoptimierten Konstrukts wurde die Expression und die Partikelbildung von 97CN001 Pr55<sup>gag</sup> in der humanen Zelllinie 293T mittels transienter Transfektion untersucht. Zum Vergleich wurden Zellen mit den Konstrukten 97CN54 und IIIB Gag transfiziert. IIIB Gag diente aufgrund seiner Fähigkeit große Mengen an VLP zu bilden als Positivkontrolle. 48h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und aufgeschlossen. Die in den Überständen enthaltenen VLP wurden mittels Ultrazentrifugation aufkonzentriert. Die Zelllysate und die VLP Präparation wurden auf ein 12,5%iges SDS-PA Gel aufgetragen und mittels Elektrophorese aufgetrennt. Die separierten Proteine wurden mit Hilfe eines Westernblots auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und unter Verwendung eines p24-spezifischen Antikörpers auf das Vorhandensein von Pr55<sup>gag</sup> analysiert.

# Ergebnisse

**A**



**B**



**Abb. 3: A)** Westernblot-Analyse der Zelllysate und der mittels Ultrazentrifugation aufkonzentrierten Zellüberstände unter Verwendung eines p24 spezifischen Antikörpers. 1: 97CN54 Gag; 2: 97CN001 Gag; 3: IIB Gag; Ø: Mock **B)** Analyse der Lysate und Überstände mit Hilfe eines p24 spezifischen SandwichELISA.

Mit diesem Konstrukt konnte gezeigt werden (Abb. 3 A), dass das neue 97CN001 Gag Konstrukt eine im Vergleich zu 97CN54 gesteigerte Freisetzung von virus-ähnlichen Partikeln aufwies, die annähernd die des IIB Pr55<sup>gag</sup> erreicht. In einem HIV-1 p24 spezifischen SandwichELISA konnte weitherin gezeigt werden, dass im Falle von CN54 in den Zellen zwar Gag gebildet wird, aber im Gegensatz zu 97CN001 kaum etwas von den Zellen freigesetzt wird.

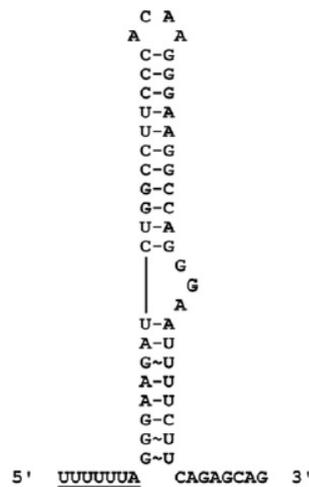
## 1.2. HIV-1 Stamm C GagPolNef mit *frame shift*

Nachdem nun eine ausreichende Partikelfreisetzung gewährleistet war, wurde das 97CN54 Gag im GagPolNef Konstrukt durch 97CN001 ersetzt. Der nächste Schritt war die Einführung eines Leserahmenssprungs, einen sogenannten *frame shift*.

## Ergebnisse

Dieser wurde im Bereich bp 1293 – 1345 in das GagPolNef Durchlesekonstrukt eingefügt. Die *frame shift* Sequenz (siehe Abb. 4) induziert in 5% der Translationsereignisse einen Leserahmensprung, d.h. die Ribosomen verrutschen um ein Nukleotid und geraten somit in einen anderen Leserahmen. Für dieses Konstrukt bedeutet dies, dass zu ca. 95% Gag und zu ca. 5% GagPolNef Protein translatiert wird <sup>262, 263</sup>.

**A**



**B**

TTTTTTTAGGGAAAATCTGGCCCTCCACAAGGGAAGGCCAGGGAATTTTCTTCAGAA

**C**



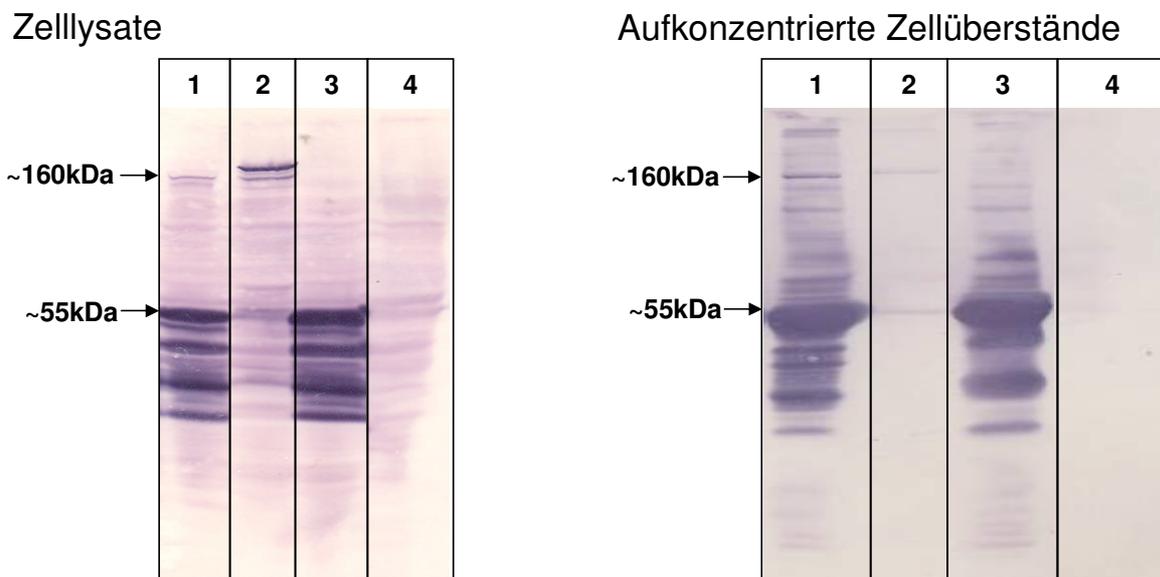
**Abb. 4:** **A)** Sequenz und berechnete Sekundärstruktur der HIV-1 *frame shift* induzierenden Region. Diese besteht aus einem uridinreichen Heptamer (unterstrichen) und einer Haarnadelschleifenstruktur (*stem-loop*). **B)** Sequenz der eingefügten *frame shift* induzierenden Region. Die Sequenz des uridinreichen Heptamers (unterstrichen) ist gekennzeichnet **C)** Konsensussequenz der *frame shift* induzierenden Region. Je konservierter ein Nucleotid in der Sequenz desto größer der Buchstabe. (Abbildung adaptiert nach Marcheschi *et al.*<sup>264</sup>)

Um die Funktionalität des *frame shift* zu zeigen, wurden humane 293T Zellen mit den Expressionskonstrukten 97CN001 Gag (M+)-pcDNA3.1(+), 97CN001 GagPolNef (M+, ΔFS, P-)-pcDNA3.1(+), 97CN001 GagPolNef (M+, FS, P-)-pcDNA3.1(+) und als Kontrolle mit dem Leervektor pcDNA3.1(+) transient transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Überstände und die Zellen geerntet. Die Überstände wurden mittels Zentrifugation von Zelltrümmern befreit, die Zellen hingegen wurden lysiert und aufgeschlossen. Die virus-ähnlichen Partikel wurden aus den Überständen

## Ergebnisse

mittels Ultrazentrifugation aufkonzentriert. 50 µg der Zelllysate und 5 µg der Präparationen wurden per SDS-PA Gelelektrophorese und Westernblot unter Verwendung eines p24-spezifischen Antikörpers analysiert.

Mit der Westernblot Analyse konnte gezeigt werden, dass durch das Einfügen des *frame shift* sich die Expression des GagPolNef verändert. Im Vergleich zum Durchlesekonstrukt entsteht weniger GagPolNef Protein, welches durch die Bande bei ca. 160 kDa repräsentiert wird, dafür wird nun aber Pr55<sup>gag</sup> gebildet, welches im Gel bei etwa 55 kDa bandiert. Das Expressionsverhältnis von Pr55<sup>gag</sup> zu GagPolNef im *frame shift* Konstrukt dürfte in etwa 95 zu 5 entsprechen.



**Abb. 5:** Vergleichende Westernblot-Analyse von Zelllysaten und von aufgereinigten Zellüberständen mit 97CN001 GagPolNef (Myr+, FS, P-)-pcDNA3.1 (Spur 1), mit 97CN001 GagPolNef (Myr+, ΔFS, P-)-pcDNA3.1 (Spur 2), mit 97CN001 Gag (Myr+)-pcDNA3.1 (Spur 3) und mit dem Leervektor pcDNA3.1 (Spur 4) transient transfizierter 293T Zellen. Auf das 12,5%-ige SDS-Polyacrylamidgel wurden jeweils 5 µg Protein der Zellüberstände und 50 µg der Lysate aufgetragen. Der Nachweis von Pr55<sup>gag</sup> erfolgte unter Verwendung eines p24-spezifischen monoklonalen Antikörpers.

Bei dem *frame shift* Konstrukt wurden vergleichbare Mengen an Pr55<sup>gag</sup> in den Zellüberstand abgegeben wie bei dem SynGag Konstrukt. Durch das effizientere Knospen wurde neben Gag auch vermehrt GagPolNef in den Überstand abgegeben.

### 1.3. HIV-1 Stamm C GagPolNef mit *frame shift* und aktiver Protease

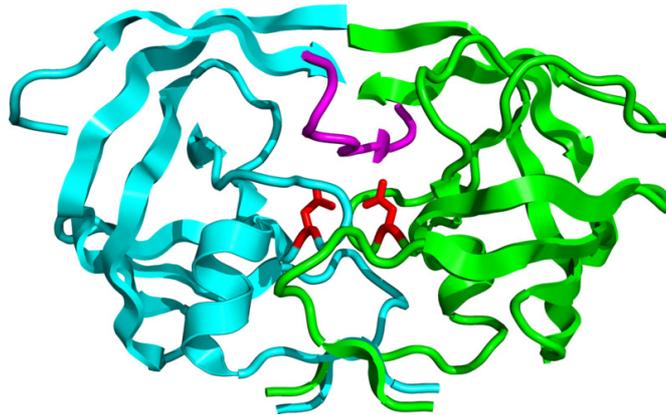
Die HIV-1 Protease liegt im Virion als Dimer vor (siehe Abb. 6 A) und prozessiert während der Reifung des Viruspartikels die Gag- und GagPol Vorläuferproteine in ihre Untereinheiten. In dem Ausgangskonstrukt 97CN54 GagPolNef wurde durch gezielte Punktmutation an Position 25 Asparaginsäure (D) in Asparagin (N)

## Ergebnisse

umgewandelt (siehe Abb. 6 B). Durch diese Mutation im aktiven Zentrum der Protease wurde diese inaktiviert.

Um die Funktion wiederherzustellen wurde das Asparagin (N) zu Asparaginsäure (D) revertiert. Die inaktive bzw. aktive Variante der Protease wurden zusammen mit dem *frame shift* jeweils als ein Zwischenkonstrukt (FS, P- bzw. FS, P+) konzipiert, von Geneart AG synthetisiert und in das Ausgangskonstrukt kloniert.

**A**



**B**

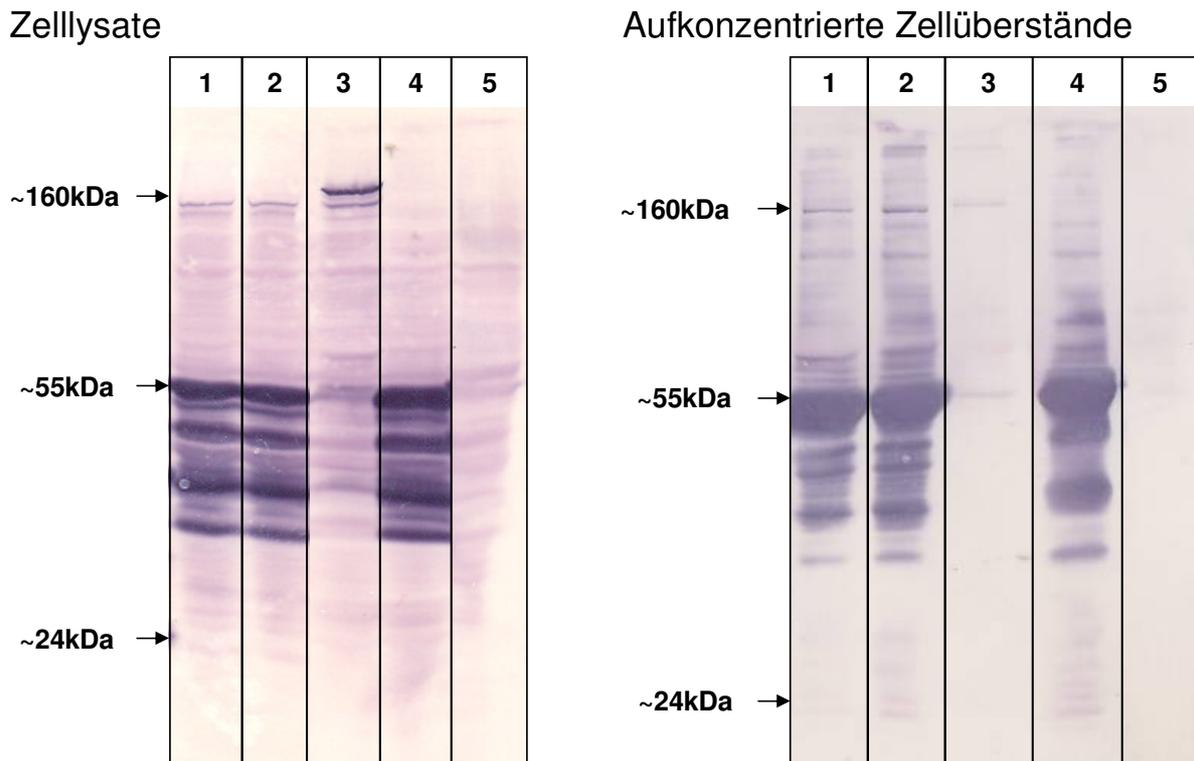
<b>Aktiv</b>	PQITLWQRPLVTIKIGGQLKEALL <u>D</u> TGAGDVTLEDLNLPGKWKPKMIGGIGGFVKVRQYEQIPIEICGHKAI
<b>Inaktiv</b>	PQITLWQRPLVTIKIGGQLKEALL <u>N</u> TGAGDVTLEDLNLPGKWKPKMIGGIGGFVKVRQYEQIPIEICGHKAI
<b>Aktiv</b>	GTVLVGPTPVNIIGRNLLTQLGCTLNF
<b>Inaktiv</b>	GTVLVGPTPVNIIGRNLLTQLGCTLNF

**Abb. 6: A)** Struktur der HIV-1 Protease (Grün und Zyan) komplexiert mit einem Polypeptidsubstrat (Magentarot). Die zwei Asparaginaminosäuren, die das aktive Zentrum der Protease bilden, sind rot gekennzeichnet (Quelle: Wikipedia; Protein Data Bank). **B)** Aminosäuresequenzabgleich der aktiven und der inaktivierten Protease. Blau dargestellt ist die Asparaginsäure (D) im aktiven Zentrum (unterstrichene Buchstaben) der funktionellen Protease. Durch die Punktmutation dieser Asparaginsäure (D, blau dargestellt) zu Asparagin (N, rot dargestellt) wurde die Protease inaktiviert.

Die Funktionalität der Protease wurde mit Hilfe einer transienten Transfektion von 293T Zellen überprüft. 48 Stunden nach Transfektion wurden Zellen und Zellüberstände geerntet und, wie oben beschreiben, die Zellen lysiert und die Überstände aufkonzentriert.

Die Analyse der Zelllysate und der aufkonzentrierten Überstände erfolgte mit Hilfe von SDS-PAGE und mit anschließendem Westernblot unter Verwendung eines HIV-1 p24-spezifischen Antikörpers.

## Ergebnisse



**Abb. 7:** Vergleichende Westernblot-Analyse von Zelllysaten und von aufgereinigten Zellüberständen mit 97CN001 GagPolNef (Myr+, FS, P 25D)-pcDNA3.1 (Spur 1), mit 97CN001 GagPolNef (Myr+, FS, P-)-pcDNA3.1 (Spur 2), mit 97CN001 GagPolNef (Myr+,  $\Delta$ FS, P-)-pcDNA3 (Spur 3), mit 97CN001 Gag (Myr+)-pcDNA3.1 (Spur 4) und mit dem Leervektor pcDNA3.1 (Spur 5) transient transfizierter 293T Zellen. Auf das 12,5%-ige SDS-Polyacrylamidgel wurden jeweils 5  $\mu$ g Protein der Zellüberstände und 50  $\mu$ g der Lysate aufgetragen. Der Nachweis von Pr55<sup>gag</sup> erfolgte unter Verwendung eines p24-spezifischen monoklonalen Antikörpers.

Bei einer aktiven Protease sollte das Pr55<sup>gag</sup> in die Untereinheiten p17, p24, p7 und p6 prozessiert werden. Demnach sollte im Westernblot eine deutliche Bande bei etwa 24 kDa sichtbar sein. Deren Fehlen ließ aber auf eine noch immer defekte Protease schließen.

Daraufhin wurde ein Sequenzabgleich mit dem Referenzvirus 97CN001 durchgeführt (siehe Abb. 8), bei dem eine nicht belegte Mutation an Position 29 gefunden wurde. Aufgrund der Nähe zum aktiven Zentrum könnte diese die Protease in ihrer Funktion behindern.

Durch eine *QuickChange* PCR mit dem Zwischenkonstrukt FS P+ wurde an dieser Position das Glycin durch Asparaginsäure (G29D) ersetzt, so dass die Aminosäuresequenz der Proteasesequenz von 97CN001 entsprach.

## Ergebnisse

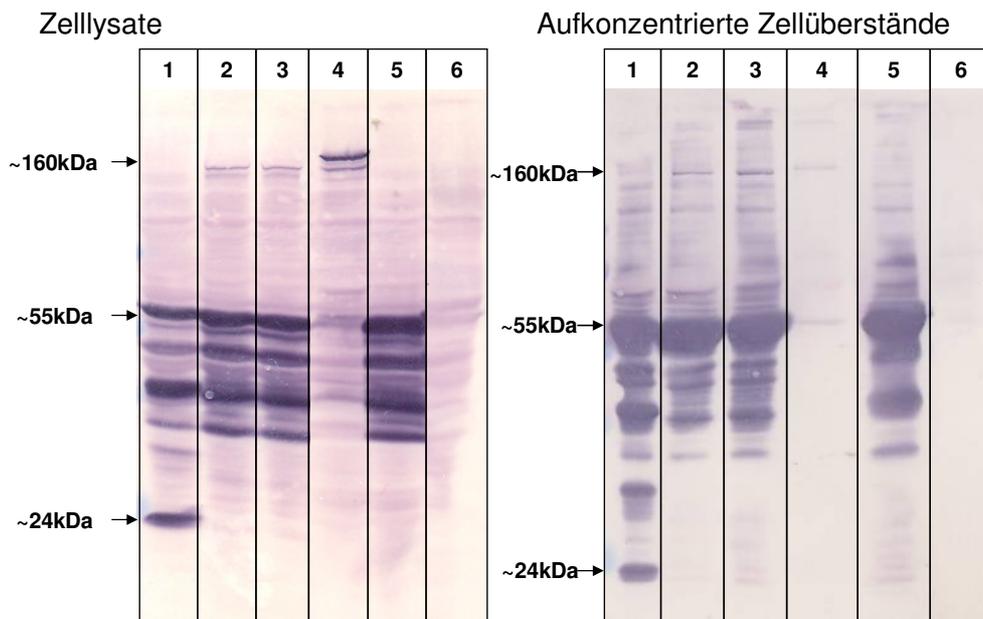
Position  
25    29

**Abgleich der Aminosäuresequenz**

97CN54	PQITLWQRPLVTIKIGGQLKEAL <u>LD</u> TGAGDTVLEDLNLP GKWKPKMIGGIGGF IKVRQYEQIPIEICGHKAI
97CN001	PQITLWQRPLVTIKIGGQLKEAL <u>LD</u> TGADDTVLEDLNLP GKWKPKMIGGIGGF IKVRQYEQIPIEICGHKAI
97CN54	GTVLVGPTPVNI IGRNLLTQLGCTLNF
97CN001	GTVLVGPTPVNI IGRNLLTQLGCTLNF

**Abb. 8:** Aminosäuresequenzabgleich der Protease von 97CN54 und 97CN001. Die Sequenz des aktiven Zentrums ist unterstrichen und die katalytische Asparaginsäure an Position 25 blau hervorgehoben. Der Sequenzunterschied zwischen 97CN54 und 97CN001 an Position 29 ist rot hervorgehoben.

Die neu generierte Protease wurde dann mittels transients Transfektion von 293T Zellen mit, wie in Kapitel 1.1. beschrieben, anschließender Analyse der Zelllysate und –überstände im Westernblot unter Verwendung eines p24-spezifischen, monoklonalen Antikörpers überprüft.



**Abb. 9:** Vergleichende Westernblot-Analyse von Zelllysaten und von aufgereinigten Zellüberständen mit 97CN001 GagPolNef (Myr+, FS, P 25D/29D)-pcDNA3.1 (Spur 1), mit 97CN001 GagPolNef (Myr+, FS, P 25D/29G)-pcDNA3.1 (Spur 2), mit 97CN001 GagPolNef (Myr+, FS, P-)-pcDNA3.1 (Spur 3), mit 97CN001 GagPolNef (Myr+, ΔFS, P-)-pcDNA3.1 (Spur 4), mit 97CN001 Gag (Myr+)-pcDNA3.1 (Spur 5) und mit dem Leervektor pcDNA3.1 (Spur 6) transient transfizierter 293T Zellen. Auf das 12,5%-ige SDS-Polyacrylamidgel wurden jeweils 5 µg Protein der Zellüberstände und 50 µg der Lysate aufgetragen. Der Nachweis von Pr55<sup>gag</sup> erfolgte unter Verwendung eines p24-spezifischen monoklonalen Antikörpers.

Durch die Revertierung der Aminosäure an Position 29 von Glycin zu Asparaginsäure wurde die Funktion der Protease wiederhergestellt. Eine Spaltung des Pr55<sup>gag</sup> Vorläuferproteins in die Subkomponenten p17, p7 und p6 konnte zwar auf Grund der Verfügbarkeit passender Antikörper nicht gezeigt werden. Der eindeutige Nachweis von p24, mit einem Molekulargewicht von ca. 24 kDa, sowohl in

## Ergebnisse

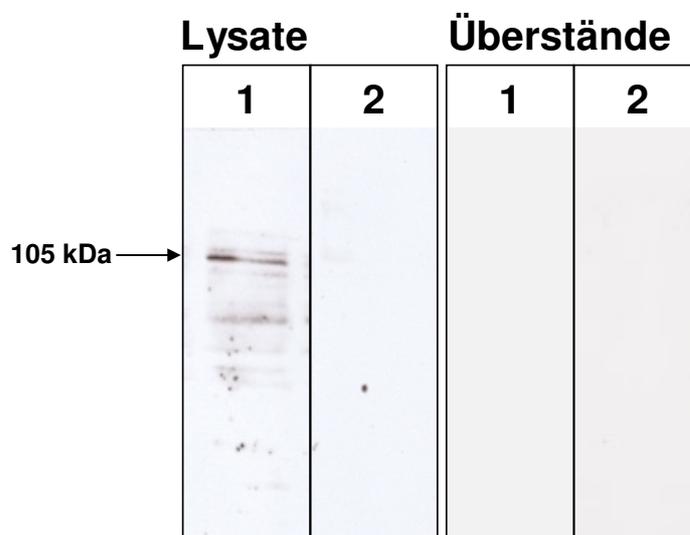
den Lysaten als auch in den aufgereinigten Partikeln der 97CN001 GagPolNef (Myr+, FS, P 25D/29D) Transfektion, lässt auf eine erfolgreiche Prozessierung von Pr55<sup>gag</sup> durch die Protease schließen.

Inwiefern die Protease in diesem artifiziellen GagPolNef Konstrukt die Prozessivität die der im HI-Virion vorkommenden erreicht, wurde nicht quantifiziert, dennoch sollte die Aktivität ausreichen, um eine virale Prozessierung des Pr55<sup>gag</sup> nachzuahmen.

### 1.4. HIV-1 Stamm C PolNef

Für immunologische Studien war die Entkopplung des PolNef Leserahmen vom Gag Leserahmen von Interesse. Für diese Fragestellungen genügte eine inaktive Protease in dem konzipierten 97CN54 PolNef Konstrukt. Zumal könnte die Zytotoxizität der aktiven Protease bei einer höheren Expression als in dem *frame shift* Konstrukt (siehe 1.3) sich als nachteilig für die Expression erweisen könnte.

Das PolNef Konstrukt konnte über eine PCR mit den Oligonukleotiden CN54 PolNef fw und rv aus dem Durchlesekonstrukt 97CN001 GagPolNef (Myr+, ΔFS, P-) gewonnen werden. Das PCR-Produkt wurde dann mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen KpnI und XhoI in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1(+) kloniert.



**Abb. 10:** Analyse der mit CN54 PolNef transient transfizierten 293T Zellen mit Hilfe eines Pol-spezifischen Antikörpers (Spur 1). 50 µg der Zelllysate und 5 µg der aufkonzentrierten Überstände wurden per SDS-PAGE und anschließendem Westernblot mit Hilfe eines Pol-spezifischen, monoklonalen Antikörper untersucht. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit dem Leervektor pcDNA3.1(+) transfiziert wurden (Spur 2).

Die Expression des Polyproteins wurde, wie bereits beschrieben, mittels transienter Transfektion in humanen 293T Zellen mit anschließender Analyse der Zelllysate und

# Ergebnisse

---

-überstände mit Hilfe eines Westernblots unter Verwendung eines Pol-spezifischen Antikörpers überprüft. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit dem Leervektor pcDNA3.1(+) transfiziert wurden.

In den Zelllysaten ließ sich deutlich das PolNef Polyprotein mit einer Masse von circa 105 kDa nachweisen. Dieses wurde nicht von den Zellen freigesetzt oder sezerniert und ließ sich daher in den Überständen nicht nachweisen.

Nachdem eine hohe Expression gewährleistet war, konnte dieses Konstrukt für Immunisierungsstudien verwendet werden.

## 1.5. Kurzzusammenfassung

Durch den Austausch des ursprünglichen 97CN54 Gag gegen das von 97CN001 konnte die Partikelfreisetzung deutlich verbessert werden. Das erfolgreiche Einfügen eines *frame shift* verbesserte die Freisetzung von GagPolNef Partikeln im Vergleich zum Durchlesekonstrukt. Durch die Identifikation und die Revertierung der Punktmutation an Position 29 der Protease konnte deren Aktivität wiederhergestellt werden.

Aufgrund dieser Modifikationen stehen nun weiterentwickelte Expressionskonstrukte für eine HIV-1 Vakzine zur Verfügung.

## 2.1. Immunologische Eigenschaften der GagPolNef Konstrukte im Balb/C Mausmodell

Für die folgenden Immunisierungsstudien wurden alle beschriebenen Konstrukte verwendet mit Ausnahme von 97CN001SynGagPolNef (Myr+, FS, P 25D/29D) und 97CN001SynGagPolNef. 97CN001SynGagPolNef (Myr+, FS, P 25D/29G) wurde aufgrund der inaktiven Protease nicht eingesetzt und die Variante mit der aktiven Protease, 97CN001SynGagPolNef (Myr+, FS, P 25D/29D), stand zum Beginn der Studien noch nicht zur Verfügung.

### 2.1.1. Vergleich der immunologischen Eigenschaften des GagPolNef Durchlesekonstrukts mit dem *frame shift* Konstrukt

In dieser Immunisierungsstudie (IS1) wurden fünf Gruppen mit jeweils sechs weiblichen Balb/C Mäusen mit den in Tabelle 1 dargestellten Konstrukten intramuskulär (i.m.) immunisiert. Jede Maus erhielt 80 µg des jeweiligen Konstrukts, von denen alle in dem Expressionsvektor pcDNA3.1(+) vorlagen. Als Kontrolle

## Ergebnisse

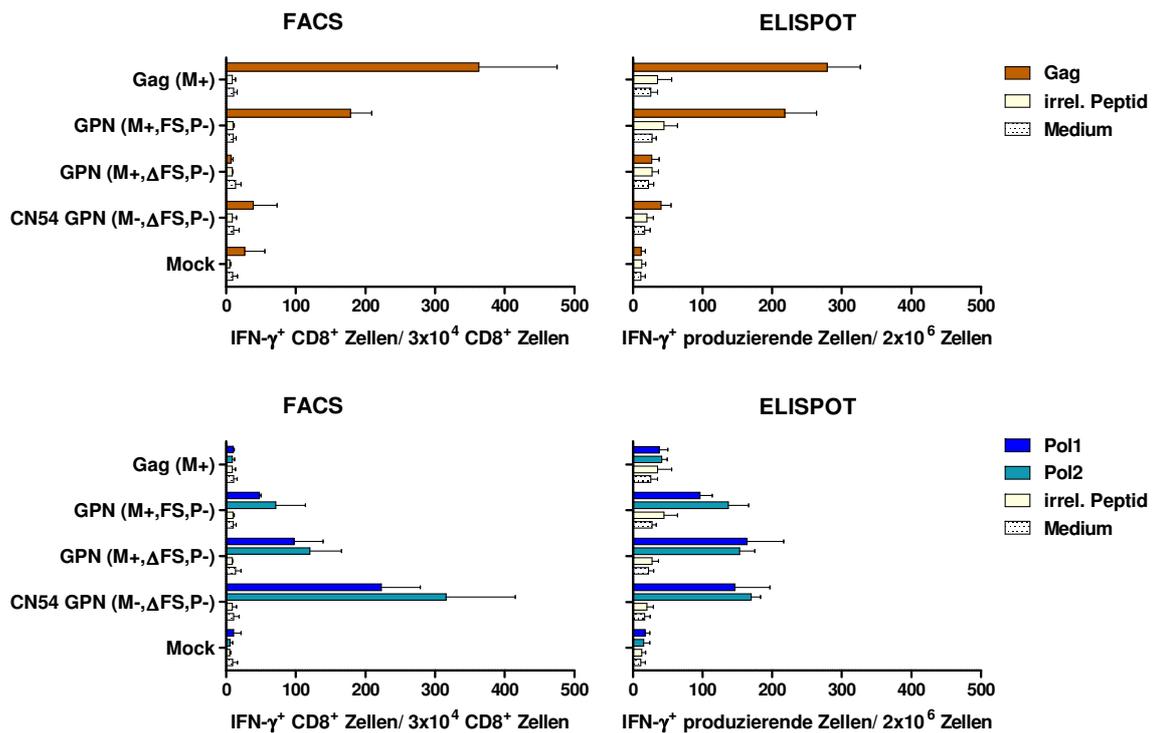
dienten nicht immunisierte Mäuse (Mock), als Referenz wurde jeweils eine Gruppe mit 97CN001Gag bzw. mit dem ursprünglichen 97CN54 GagPolNef immunisiert.

Gruppe	DNA	Schematische Darstellung
<b>1</b>	<b>97CN001 Gag (Myr+)</b>	
<b>2</b>	<b>97CN001 GPN (Myr+, FS, P-)</b>	
<b>3</b>	<b>97CN001 GPN (Myr+, ΔFS, P-)</b>	
<b>4</b>	<b>97CN54 GPN (Myr-, ΔFS, P-)</b>	
<b>5</b>	<b>Mock</b>	-

**Tabelle 1:** Schematische Darstellung der in der Immunisierungsstudie 1 (IS1) eingesetzten DNA Konstrukte.

Zwölf Tage nach Immunisierung wurde den Mäusen die Milz entnommen und daraus die Splenozyten präpariert. Diese wurden dann mit einem Gag- und zwei Pol-spezifischen Peptiden restimuliert. Die Stärke der Immunantwort wurde anschließend anhand der Frequenz IFN- $\gamma^+$  CD8 $^+$  T-Zellen mittels Durchflusszytometrie und dem Anteil aller IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen per ELISpot bestimmt.

## Ergebnisse



**Abb. 11:** Bestimmung Gag- und Pol-spezifischer zytotoxischer T-Zellen nach Immunisierung mit den verschiedenen GagPolNef Varianten mittels der Durchflusszytometrie bzw. ELISpot Technologie. 12 Tage nach der Immunisierung wurde den Mäusen Milzzellen entnommen, und für die Zytometrieanalyse mit 10  $\mu$ M Gag, Pol1 oder Pol2 Peptid für 6 h unter Zugabe von Brefeldin A bei 37°C stimuliert. Als Negativkontrollen dienten Zellen, die mit Medium oder dem irrelevanten Peptid V3-18 inkubiert wurden. Die Analyse der Zellen erfolgte unter Verwendung fluoreszenzgekoppelter, spezifischer Antikörper gegen CD8 und intrazellulärem IFN- $\gamma$ .  $3 \times 10^4$  CD8<sup>+</sup> Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie auf die Produktion von IFN- $\gamma$  analysiert. Für die ELISpot Analyse wurden die Milzzellen für 24 h mit den oben beschriebenen Peptiden und Negativkontrollen bei 37°C inkubiert. Die Anzahl IFN- $\gamma$  produzierender Zellen wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen ELISpot-Kits analysiert. Die Balkendiagramme repräsentieren jeweils die Mittelwerte von drei (Durchflusszytometrie) bzw. sechs (ELISpot) Stimulationsansätzen.

Alle mit 97CN001 Gag immunisierten Mäuse zeigten eine starke, spezifische Immunantwort (im Mittel 363 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> pro  $3 \times 10^4$  CD8<sup>+</sup> Zellen und 279 IFN- $\gamma$  produzierende Zellen pro  $2 \times 10^6$  Zellen (*spot forming cells*; SFC)). Bei den GagPolNef immunisierten Tieren fiel auf, dass die Gag-spezifischen Antworten am stärksten bei der 97CN001 GPN (M+, FS, P-) Gruppe war (179 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> und 218 SFC). Die beiden GagPolNef ( $\Delta$ FS) Konstrukte hingegen induzierten nur äußerst schwache bis keine Gag-spezifischen Antworten (7 bzw. 39 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> und 27 bzw. 40 SFC). Die Pol-spezifischen Antworten hingegen waren bei diesen Konstrukten stärker (97 bzw. 223 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> und 163 bzw. 146 SFC bei dem Pol1 Peptid und 120 bzw. 315 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> und 153 bzw. 170 SFC bei dem Pol2 Peptid) als bei den mit 97CN001

## Ergebnisse

---

GPN (M+, FS, P-) immunisierten Mäusen (71 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> und 97 SFC bei dem Pol1 Peptid und 48 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> und 137 SFC bei dem Pol2 Peptid).

Auffallend war zudem, dass die Myristylierung des Durchlesekonstrukts schwächere Gag-spezifische Antworten (7 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> und 27 SFC) induziert als die nicht myristylierte Variante (39 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> und 40 SFC).

### **2.1.2. Einfluss der Myristylierung auf die Induzierung einer Gag-spezifischen Immunantwort**

Um den Einfluss des Myristylierungssignals auf die Ausbildung einer Gag-spezifischen Immunantwort näher zu untersuchen, wurde eine weitere Immunisierungsstudie (IS2A) durchgeführt. Sieben Gruppen mit jeweils sechs weiblichen Balb/C Mäusen wurden mit jeweils 80  $\mu$ g der in Tabelle 2 aufgeführten Konstrukte i.m. immunisiert. Die Konstrukte 97CN001 GPN (Myr-, FS, P-) und 97CN001 GPN (Myr-,  $\Delta$ FS, P-) wurden freundlicherweise von Dr. med. Dipl. Ing. Josef Köstler zur Verfügung gestellt. Als Kontrolle dienten nicht immunisierte Mäuse (Mock), als Referenz wurde jeweils eine Gruppe mit 97CN001 Gag bzw. mit dem ursprünglichen 97CN54 GagPolNef immunisiert.

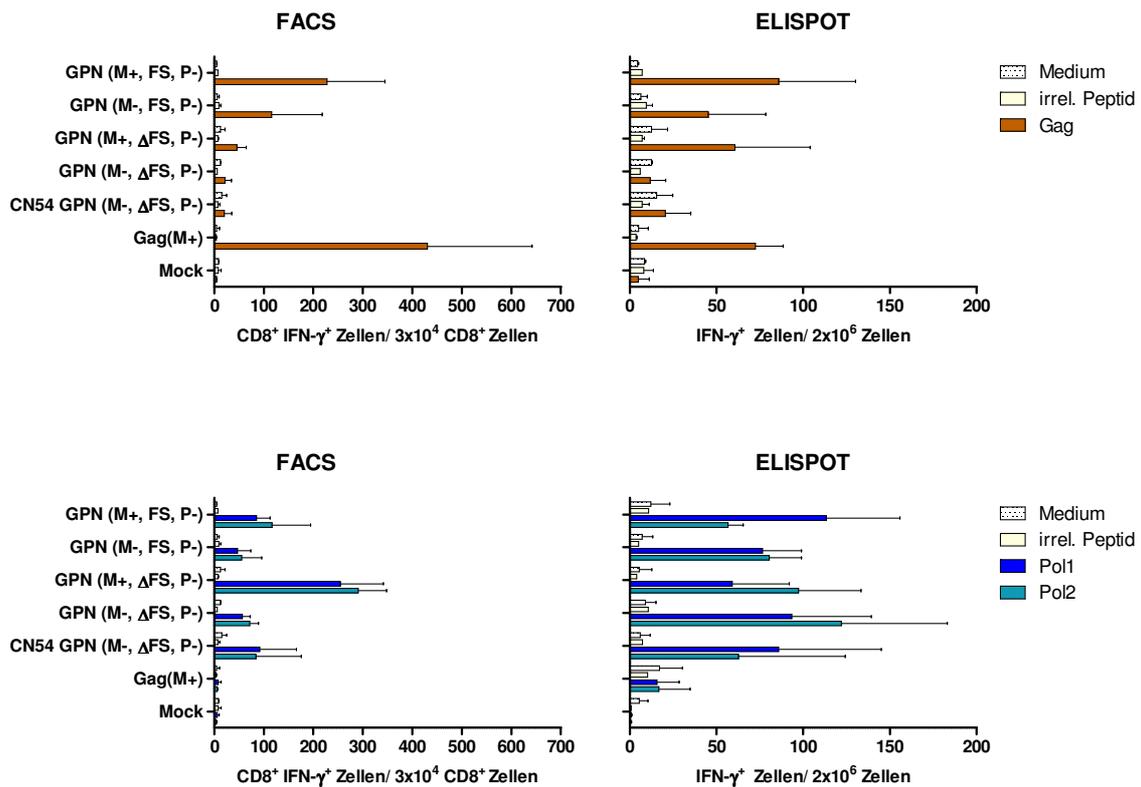
## Ergebnisse

Gruppe	DNA	Schematische Darstellung
1	<b>97CN001 GPN (Myr+, FS, P-)</b>	
2	<b>97CN001 GPN (Myr-, FS, P-)</b>	
3	<b>97CN001 GPN (Myr+, ΔFS, P-)</b>	
4	<b>97CN001 GPN (Myr-, ΔFS, P-)</b>	
5	<b>97CN54 GPN (Myr-, ΔFS, P-)</b>	
6	<b>97CN001 Gag (Myr+)</b>	
7	<b>Mock</b>	-

**Tabelle 2:** Schematische Darstellung der in der Immunisierungsstudie 2A (IS2A) eingesetzten DNA Konstrukte.

Wie in der ersten Studie wurde zwölf Tage nach Immunisierung den Mäusen die Milz entnommen und daraus die Splenozyten präpariert. Diese wurden mit jeweils dem Gag und den zwei Pol Peptiden restimuliert. Die Stärke der Immunantwort wurde anschließend anhand der Frequenz IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Zellen mittels Durchflusszytometrie und dem Anteil aller IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen per ELISpot bestimmt.

# Ergebnisse



**Abb. 12:** Bestimmung Gag- und Pol-spezifischer zytotoxischer T-Zellen nach Immunisierung mit den verschiedenen GagPolNef Varianten mittels der Durchflusszytometrie bzw. ELISpot Technologie. 12 Tage nach der Immunisierung wurde den Mäusen Milzzellen entnommen, und für die Zytometrieanalyse mit 10  $\mu$ M Gag, Pol1 oder Pol2 Peptid für 6 h unter Zugabe von Brefeldin A bei 37°C stimuliert. Als Negativkontrollen dienten Zellen, die mit Medium oder dem irrelevanten Peptid V3-18 inkubiert wurden. Die Analyse der Zellen erfolgte unter Verwendung fluoreszenzgekoppelter, spezifischer Antikörper gegen CD8 und intrazellulärem IFN- $\gamma$ . 3x10<sup>4</sup> CD8<sup>+</sup> Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie auf die Produktion von IFN- $\gamma$  analysiert. Für die ELISpot Analyse wurden die Milzzellen für 24 h mit den oben beschriebenen Peptiden und Negativkontrollen bei 37°C inkubiert. Die Anzahl IFN- $\gamma$  produzierender Zellen wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen ELISpot-Kits analysiert. Die Balkendiagramme repräsentieren jeweils die Mittelwerte von drei (Durchflusszytometrie) bzw. sechs (ELISpot) Stimulationsansätzen.

In dieser Immunisierungsstudie induzierten die *frame shift* Konstrukte erneut stärkere Gag-spezifische Antworten (im Mittel 116 bzw. 228 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> pro 3x10<sup>4</sup> CD8<sup>+</sup> Zellen und 45 bzw. 86 IFN- $\gamma$  produzierende Zellen pro 2x10<sup>6</sup> Zellen (*spot forming cells*; SFC) als die Durchlesekonstrukte (21, 22 und 46 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> und 21, 12 und 61 SFC). Interessanterweise verbessert die Myristylierung sowohl die Gag- (46 bzw. 228 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) als auch die Pol-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell Antworten (255 bzw. 86 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> bei dem Pol1 Peptid und 291 bzw. 117 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> bei dem Pol2 Peptid) im Vergleich zu den nicht myristylierten Varianten (21,22 bzw. 116 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> bei dem Gag Peptid, 92, 57 bzw. 47 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> bei dem Pol1 Peptid und 84, 72 bzw. 55 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> bei dem Pol2 Peptid) um den Faktor 1,8 – 3,5.

## Ergebnisse

---

Im ELISpot ließen sich hinsichtlich der Gag-spezifischen Immunantworten in etwa ähnliche Reaktionen beobachten (61 bzw. 86 SFC im Vergleich zu 20, 12 bzw. 45 SFC), bei den Pol Antworten (59 bzw. 113 SFC bei Pol1 und 97 bzw. 57 SFC bei Pol2 im Vergleich zu 86, 94 bzw. 77 bei Pol1 und 63, 122 bzw. 81 bei Pol2) hingegen lassen sich keine so deutlichen Unterschiede wie in der Zytometrieanalyse messen. Hinsichtlich der Induktion Pol-spezifischer CD8<sup>+</sup> Immunantworten waren die Durchlesekonstrukte (255 bzw. 57 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> bei dem Pol1 Peptid und 291 bzw. 72 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> bei dem Pol2 Peptid im Vergleich zu 86 bzw. 47 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> bei dem Pol1 Peptid und 117 bzw. 55 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> bei dem Pol2 Peptid) etwas potenter. Im ELISpot war dieser Effekt nicht so deutlich (59 bzw. 86 SFC für Pol1 und 97 bzw. 63 SFC für Pol2 im Vergleich zu 113 bzw. 77 SFC für Pol1 und 57 bzw. 81 SFC für Pol2) zu messen.

Die Wiederherstellung des Myristylierungssignals verbessert demnach die Immunantworten zumindest auf CD8<sup>+</sup> T-Zellebene. Zudem korreliert die verbesserte Partikelfreisetzung des 97CN001GPN (Myr+, FS, P-) Konstrukts (siehe Abschnitt 1.2.) mit einer verbesserten Immunantwort.

### **2.1.3. Vergleich der Immunantworten: Durchlesekonstrukt versus *frame shift* Konstrukt versus Einzelkonstrukte**

Im Zuge der Immunisierungsstudie in Abschnitt 2.2. wurde zusätzlich die Fragestellung bearbeitet, ob das *frame shift* GPN Konstrukt hinsichtlich der Immunogenität vergleichbar oder einer Koapplikation der Konstrukte 97CN001Gag und 97CN54 PolNef überlegen ist (IS2B). Hierfür wurden zwei Gruppen von Balb/C Mäusen mit den beiden Konstrukten in einem molaren Mischungsverhältnis 1:1 und einem Verhältnis von 95 Gag zu 5 PolNef, welches dem *frame shift* Ratio entspricht, immunisiert (siehe Tabelle 3). Zum Vergleich sind in Abb. 13 die Ergebnisse der Gruppen, die mit 97CN001 GPN mit und ohne *frame shift*, als auch der Gruppe, die die mit 97CN001 Gag immunisiert worden sind, aufgelistet.

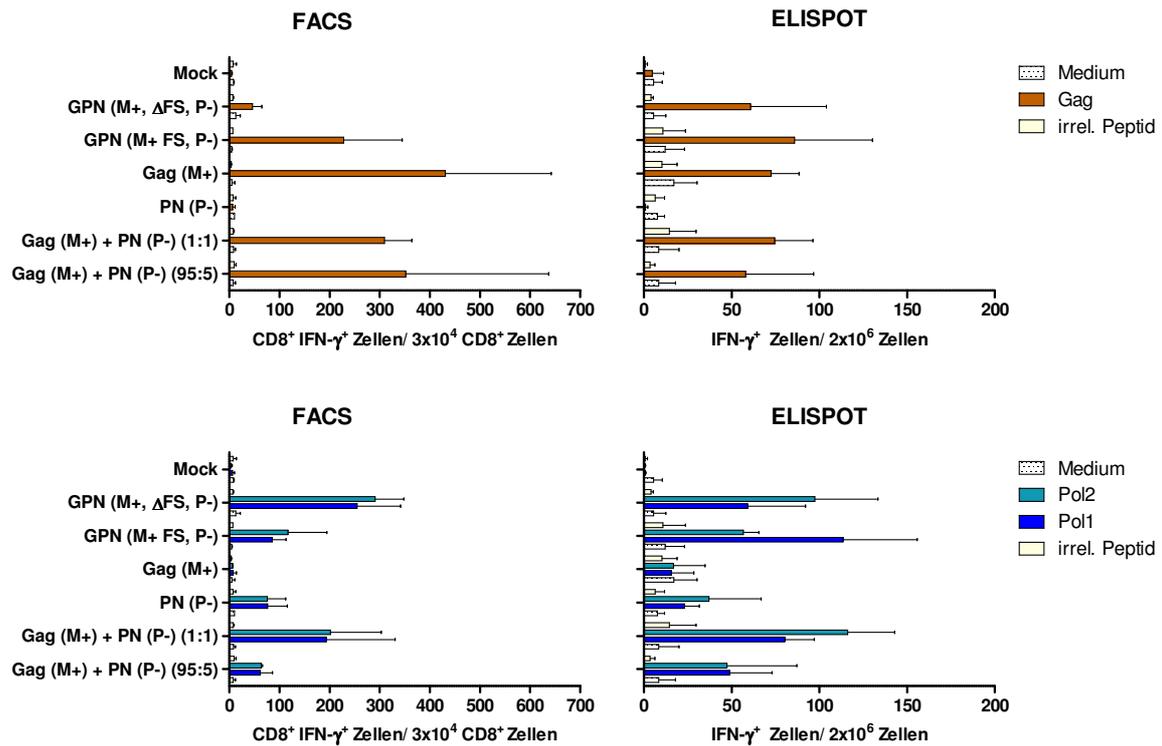
## Ergebnisse

Gruppe	DNA	Schematische Darstellung
1	<b>Mock</b>	-
2	<b>97CN001 GPN (Myr+, ΔFS, P-)</b>	
3	<b>97CN001 GPN (Myr+, FS, P-)</b>	
4	<b>97CN001 Gag (Myr+)</b>	
5	<b>97CN54 PN (P-)</b>	
6	<b>97CN001 Gag (Myr+) + 97CN54 PN (P-) Ratio 1:1</b>	
7	<b>97CN001 Gag (Myr+) + 97CN54 PN (P-) Ratio 95:5</b>	

**Tabelle 3:** Schematische Darstellung der in der Immunisierungsstudie 2B (IS2B) eingesetzten DNA Konstrukte.

Die Entnahme der Milz, die Präparation der Splenozyten, deren Stimulation mit den Gag- und Pol-spezifischen Peptiden und die anschließende Zytometrie- und ELISpot-Analyse erfolgte wie in IS2A.

## Ergebnisse



**Abb. 13:** Bestimmung Gag- und Pol-spezifischer zytotoxischer T-Zellen nach Immunisierung mit den verschiedenen GagPolNef Varianten mittels der Durchflusszytometrie bzw. ELISpot Technologie. 12 Tage nach der Immunisierung wurde den Mäusen Milzzellen entnommen, und für die Zytometrieanalyse mit 10  $\mu$ M Gag, Pol1 oder Pol2 Peptid für 6 h unter Zugabe von Brefeldin A bei 37°C stimuliert. Als Negativkontrollen dienten Zellen, die mit Medium oder dem irrelevanten Peptid V3-18 inkubiert wurden. Die Analyse der Zellen erfolgte unter Verwendung fluoreszenzgekoppelter, spezifischer Antikörper gegen CD8 und intrazellulärem IFN- $\gamma$ .  $3 \times 10^4$  CD8<sup>+</sup> Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie auf die Produktion von IFN- $\gamma$  analysiert. Für die ELISpot Analyse wurden die Milzzellen für 24 h mit den oben beschriebenen Peptiden und Negativkontrollen bei 37°C inkubiert. Die Anzahl IFN- $\gamma$  produzierender Zellen wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen ELISpot-Kits analysiert. Die Balkendiagramme repräsentieren jeweils die Mittelwerte von drei (Durchflusszytometrie) bzw. sechs (ELISpot) Stimulationsansätzen.

Die Mischung der Einzelkonstrukte Gag und PolNef erwies sich im Falle des 95:5 Ratio hinsichtlich der Gag-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell Antworten als immunogener wie das *frame shift* Konstrukt (226 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> im Vergleich zu 352 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>), in der ELISpot Analyse waren beide hier durchaus vergleichbar (61 SFC im Vergleich zu 58 SFC). Auf Ebene der Pol-spezifischen Antworten reagierten die mit dem *frame shift* immunisierten Mäuse etwas stärker (117 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> im Vergleich zu 63 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> bzw. 57 SFC im Vergleich zu 47 SFC für Pol1 und 86 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> im Vergleich zu 62 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> bzw. 113 SFC im Vergleich zu 49 SFC für Pol2).

Die Gruppe, die mit einem 1:1 Ratio immunisiert worden ist, zeigte die stärksten multivalenten Immunantworten, die also sowohl gegen Gag (309 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> und 75

SFC) als auch gegen Pol (193 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> für Pol1 bzw. 202 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> für Pol2 und 80 SFC für Pol1 bzw. 116 SFC für Pol2) gerichtet waren.

Das Durchlesekonstrukt ( $\Delta$ FS) zeigte im Vergleich zu den in diesem Kapitel analysierten Konstrukten relativ schwache Gag-spezifische (46 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> und 61 SFC), aber sehr starke Pol-spezifische (255 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> für Pol1 und 291 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> für Pol2 bzw. 113 SFC für Pol1 und 57 SFC für Pol2) Antworten.

Somit ist festzuhalten, dass eine 1:1 Mischung der Einzelkonstrukte am besten geeignet ist, um gegen beide Komponenten, also sowohl gegen Pr55<sup>gag</sup> als auch gegen PolNef, eine etwa gleich starke Immunantwort zu induzieren.

### 2.1.4. Kurzzusammenfassung

Durch das Einführen des HI-viralen *frame shift* und des Myristylierungssignals am N-Terminus konnte die Immunogenität vor allem hinsichtlich der Gag-spezifischen Antworten gegenüber dem ursprünglichen Durchlesekonstrukt ohne Myristylierungssignal deutlich verbessert werden. Die beste Variante für eine optimale Induktion von Gag- bzw. Pol-spezifische Antworten ist die Applikation der Einzelkonstrukte und damit die Trennung des Gag vom PolNef Leserahmen.

## 2.2. Immunologische Eigenschaften einer multivalenten Gag, PolNef und Env gp120 DNA Vakzine

Nach Validierung zweier Varianten einer GagPolNef Vakzinierung (IS2A und IS2B), sollte eine Studie durchgeführt werden, bei der die Immunogenität der beiden Varianten in Kombination mit 97CN54 Env gp120 als Teil eines multivalenten Vakzins analysiert werden sollte. Das Hüllglykoprotein gp120 ist zwar hochvariabel, besitzt aber auch konservierte Bereiche, die für eine T-Zellantwort interessant wären.

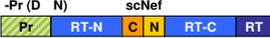
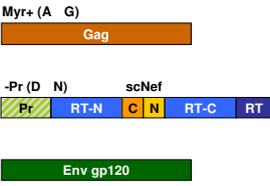
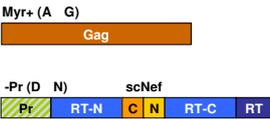
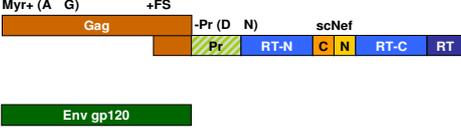
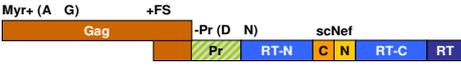
### 2.2.1. Vergleich der Immunogenität der *frame shift* GagPolNef Variante mit den Einzelkonstrukten Gag und PolNef in Kombination mit Env gp120

Die bereits durchgeführten klinischen Studien <sup>121, 248, 249</sup> zeigten, dass die Verabreichung des ursprünglichen 97CN54 GPN (Myr-,  $\Delta$ FS, P-) Konstrukts zusammen mit 97CN54 Env gp120 starke Env-spezifische und schwache bis mittlere Gag-spezifische T-Zellantworten induzierte. Auf Basis der neuen, immunologisch verbesserten GPN Konstrukte, sollte in der folgenden Immunisierungsstudie 3 (IS3)

## Ergebnisse

die Auswirkungen einer Koapplikation der GPN Konstrukte mit 97CN54 Env gp120 untersucht werden.

Gruppen von jeweils 6 weiblichen Balb/C Mäusen wurden jeweils mit 97CN001 GPN (Myr+, FS, P-) bzw. der äquimolaren Kombination von 97CN001 Gag und CN54 PN (P-) in Kombination einer äquimolaren Menge an 97CN54 Env gp120 (siehe Tabelle 4) i.m. immunisiert. Als Kontrollen dienten nicht immunisierte Mäuse und drei Gruppen, die je mit einem Einzelkonstrukt in jeweils äquimolarer Menge immunisiert wurden.

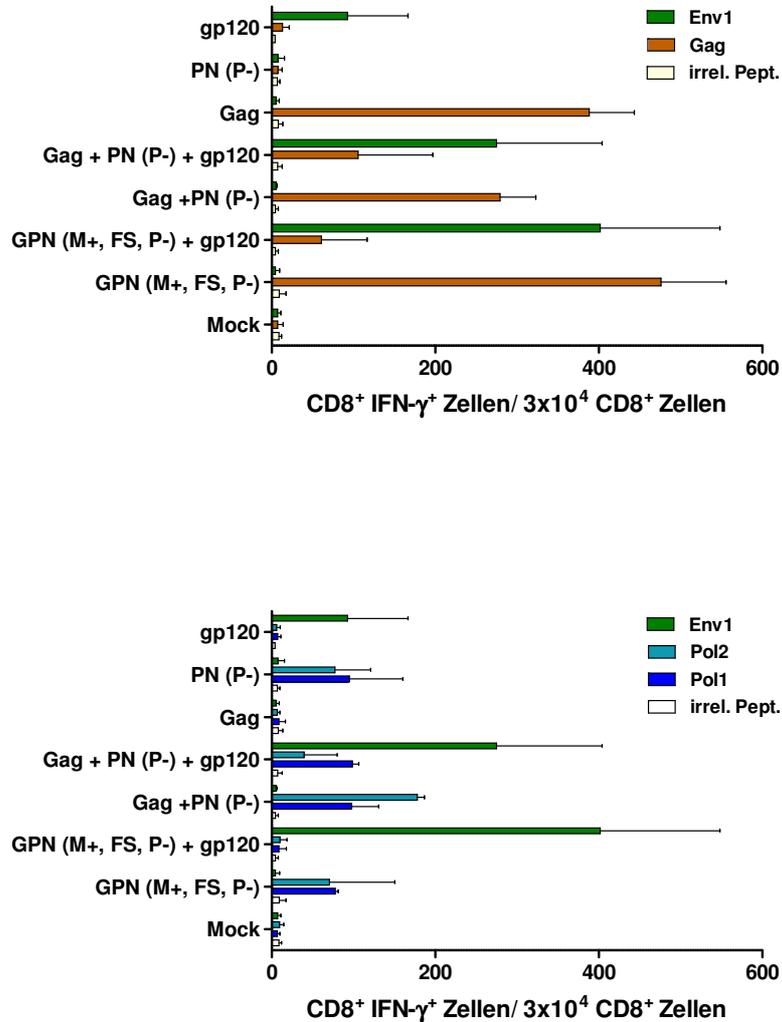
Gruppe	DNA	Schematische Darstellung
1	<b>97CN54 Env gp120</b>	
2	<b>97CN54 PN (P-)</b>	
3	<b>97CN001 Gag (Myr+)</b>	
4	<b>97CN001 Gag (Myr+)</b> <b>CN54 PN (P-)</b> <b>97CN54 Env gp120</b> <b>1:1:1</b>	
5	<b>97CN001 Gag (Myr+)</b> <b>97CN54 Env gp120</b> <b>1:1</b>	
6	<b>97CN001 GPN (Myr+, FS, P-)</b> <b>97CN54 Env gp120</b> <b>1:1</b>	
7	<b>97CN001 GPN (Myr+, FS, P-)</b>	
8	<b>Mock</b>	-

**Tabelle 4:** Schematische Darstellung der in der Immunisierungsstudie 3 (IS3) eingesetzten DNA Konstrukte.

Wie in den vorherigen Studien wurde am Tag 12 nach Immunisierung den Mäusen die Milz entnommen und daraus die Splenozyten präpariert. Diese wurden dann

## Ergebnisse

wieder mit den Gag- bzw. Pol-Peptiden und dieses mal mit einem Env-spezifischen Peptid restimuliert. Die Stärke der Immunantwort wurde anschließend mittels Durchflusszytometrie anhand der Frequenz  $\text{IFN-}\gamma^+$   $\text{CD8}^+$  Zellen ermittelt.



**Abb 14:** Bestimmung Gag-, Pol- und Env-spezifischer zytotoxischer T-Zellen nach Immunisierung mit den verschiedenen GagPolNef Varianten mittels der Durchflusszytometrie. 12 Tage nach der Immunisierung wurde den Mäusen Milzzellen entnommen, und für die Zytometrieanalyse mit  $10 \mu\text{M}$  Gag, Pol1 oder Pol2 und Env1 Peptid für 6 h unter Zugabe von Brefeldin A bei  $37^\circ\text{C}$  stimuliert. Als Negativkontrollen dienten Zellen, die mit dem irrelevanten Peptid A9I inkubiert wurden. Die Analyse der Zellen erfolgte unter Verwendung fluoreszenzgekoppelter, spezifischer Antikörper gegen CD8 und intrazellulärem  $\text{IFN-}\gamma$ .  $3 \times 10^4$   $\text{CD8}^+$  Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie auf die Produktion von  $\text{IFN-}\gamma$  analysiert. Die Balkendiagramme repräsentieren jeweils die Mittelwerte von drei Stimulationsansätzen.

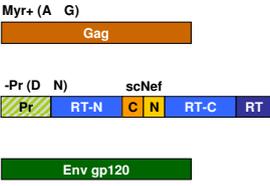
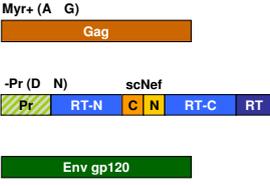
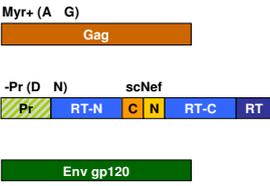
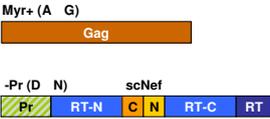
Die Auswertung der Studie zeigte, dass eine Koimmunisierung mit gp120 starke Env-spezifische Antworten lieferte ( $275$  bzw.  $401$   $\text{CD8}^+$   $\text{IFN-}\gamma^+$ ), aber die gegen Gag und Pol gerichteten Antworten abgeschwächt waren ( $105$  bzw.  $60$   $\text{CD8}^+$   $\text{IFN-}\gamma^+$  für Gag und  $99$  und  $9$   $\text{CD8}^+$   $\text{IFN-}\gamma^+$  für Pol1 bzw.  $40$  und  $10$   $\text{CD8}^+$   $\text{IFN-}\gamma^+$  für Pol2) wenn man diese mit den Einzelimmunisierungen bzw. mit der Gag und PolNef Koimmunisierung

(388, 279 und 476 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> für Gag und 95, 98 und 78 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> für Pol1 bzw. 77, 178 und 71 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> für Pol2) vergleicht. Auch die Einzelimmunisierung mit gp120 induzierte schwächere Env-spezifische Antworten (92 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) als die Immunisierungen der Gemische.

### **2.2.2. Vergleich der Immunogenität verschiedener Mengen des Env gp120 Konstrukts bei einer Koimmunisierung mit Gag und PolNef**

Eine weitere Immunisierungsstudie (IS4A) mit Balb/C Mäusen wurde durchgeführt, um zu analysieren, ob die Gag und PolNef Antworten konzentrationsabhängig von Env gp120 verbessert werden könnten. Hierfür wurden Gruppen von jeweils sechs Balb/C Mäusen mit gleichbleibender, äquimolarer Menge an 97CN001 Gag und 97CN54 PolNef i.m. immunisiert und Env gp120 in abnehmender Menge koverabreicht. Als Vergleichsgruppen dienten nicht immunisierte Mäuse, sowie Tiere die mit 97CN001 Gag und 97CN54 PolNef ko- und mit dem Einzelkonstrukt 97CN54 gp120 immunisiert wurden (siehe Tab. 5).

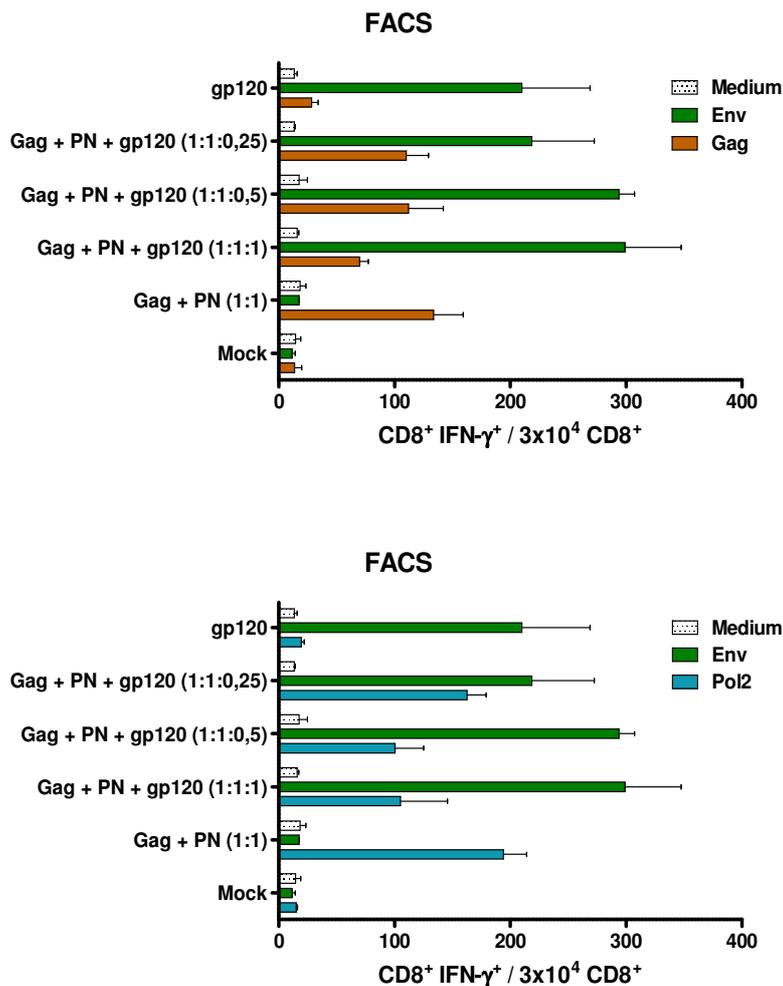
## Ergebnisse

Gruppe	DNA	Schematische Darstellung
1	97CN54 Env gp120	
2	97CN001 Gag (Myr+) 97CN54 PN (P-) 97CN54 Env gp120 1:1:0,25	
3	97CN001 Gag (Myr+) 97CN54 PN (P-) 97CN54 Env gp120 1:1:0,5	
4	97CN001 Gag (Myr+) 97CN54 PN (P-) 97CN54 Env gp120 1:1:1	
5	97CN001 Gag (Myr+) 97CN54 PN (P-) 1:1	
6	Mock	-

**Tabelle 5:** Schematische Darstellung der in der Immunisierungsstudie 4A (IS4A) eingesetzten DNA Konstrukte.

Wie in Immunisierungsstudie 3 beschrieben wurde den Mäusen die Milz an Tag 12 nach Immunisierung entnommen, daraus die Splenozyten präpariert und diese wurden dann wie zuvor mit den Gag- bzw. Pol-Peptiden und dem Env-Peptid restimuliert. Die Stärke der Immunantwort wurde anhand der Frequenz IFN- $\gamma^+$  CD8 $^+$  bestimmt.

# Ergebnisse



**Abb. 15:** Zytometrische Bestimmung Gag-, Pol- und Env-spezifischer zytotoxischer T-Zellen nach Immunisierung mit den 97CN001 Gag und 97CN54 PolNef Konstrukten in Kombination mit verschiedenen molaren Mengen an 97CN54 Env gp120 Konstrukten, die zusammen in die Hinterbeine i.m. appliziert wurden. 12 Tage nach der Immunisierung wurde den Mäusen Milzzellen entnommen, und für die Zytometrieanalyse mit 10  $\mu$ M Gag, Pol2 und Env1 Peptid für 6 h unter Zugabe von Brefeldin A bei 37°C stimuliert. Als Negativkontrollen dienten Zellen, die mit Medium inkubiert wurden. Die Analyse der Zellen erfolgte unter Verwendung fluoreszenzgekoppelter, spezifischer Antikörper gegen CD8 und intrazellulärem IFN- $\gamma$ .  $3 \times 10^4$  CD8<sup>+</sup> Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie auf die Produktion von IFN- $\gamma$  analysiert. Die Balkendiagramme repräsentieren jeweils die Mittelwerte von drei Stimulationsansätzen.

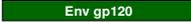
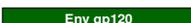
Durch eine Titration der 97CN54 Env gp120 Menge ließ sich bei den geringeren Konzentrationen (Ratio 1:1:0,5 und 1:1:0,25) bessere Gag- und Pol-spezifische Antworten beobachten (112 bzw. 110 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> für Gag und 100 und 163 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> für Pol2) als bei der äquimolaren Koimmunisierung aller drei Konstrukte (70 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> für Gag und 105 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> für Pol2). Interessanterweise waren die Env-spezifischen Antworten bei der 1:1:1 Immunisierung stärker als bei der Env gp120 Einzelimmunisierung (299 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> im Vergleich zu 210 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>). Die Gag- und Pol-spezifischen Antworten hingegen verhielten sich genau umgekehrt (70

CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> für Gag bzw. 105 für Pol2 im Vergleich zu 134 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> für Gag und 194 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> für Pol2).

### **2.2.3. Räumliche Trennung der Applikation von 97CN54 Env gp120, 97CN001 Gag und 97CN54 PN**

In der in Abschnitt 2.2. dargestellten Immunisierungsstudie (IS4A) wurden zusätzlich noch drei Gruppen von Mäusen immunisiert, denen 97CN001 Gag und 97CN54 PN in das linke Hinterbein und 97CN54 Env gp120 in verschiedenen Mengen in das rechte Hinterbein appliziert wurden (IS4B) (siehe Tab. 6). Die Gruppen, denen gp120 räumlich getrennt verabreicht wurde, erhielten das Env Konstrukt in denselben jeweiligen Ratios wie die Gruppen denen gp120 mit Gag und PolNef koverabreicht wurde. In Abb. 16 sind zum Vergleich die Gruppen, denen Env gp120 koimmunisiert wurde, den Gruppen gegenüber gestellt, die gp120 räumlich getrennt von Gag und PolNef erhielten.

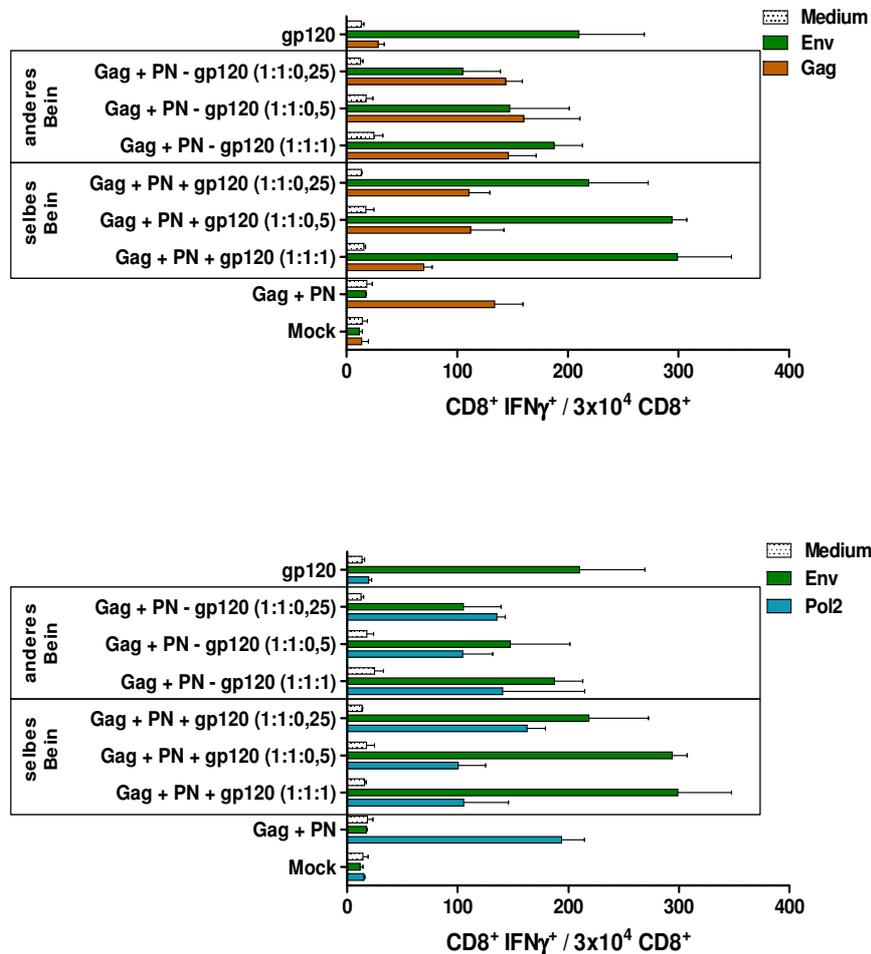
# Ergebnisse

Gruppe	DNA	Schematische Darstellung
1	Env gp120	
2	97CN001 Gag (Myr+) 97CN54 PN (P-) 97CN54 Env gp120 (anderes Bein) 1:1:0,25	<p>Myr+ (A G)  </p> <p>-Pr (D N)      scNef  </p> <hr style="border-top: 1px dashed black;"/> <p style="text-align: center;">  </p>
3	97CN001 Gag (Myr+) 97CN54 PN (P-) 97CN54 Env gp120 (anderes Bein) 1:1:0,5	<p>Myr+ (A G)  </p> <p>-Pr (D N)      scNef  </p> <hr style="border-top: 1px dashed black;"/> <p style="text-align: center;">  </p>
4	97CN001 Gag (Myr+) 97CN54 PN (P-) 97CN54 Env gp120 (anderes Bein) 1:1:1	<p>Myr+ (A G)  </p> <p>-Pr (D N)      scNef  </p> <hr style="border-top: 1px dashed black;"/> <p style="text-align: center;">  </p>
5	97CN001 Gag (Myr+) 97CN54 PN (P-) 97CN54 Env gp120 (selbes Bein) 1:1:0,25	<p>Myr+ (A G)  </p> <p>-Pr (D N)      scNef  </p> <hr style="border-top: 1px dashed black;"/> <p style="text-align: center;">  </p>
6	97CN001 Gag (Myr+) 97CN54 PN (P-) 97CN54 Env gp120 (selbes Bein) 1:1:0,5	<p>Myr+ (A G)  </p> <p>-Pr (D N)      scNef  </p> <hr style="border-top: 1px dashed black;"/> <p style="text-align: center;">  </p>
7	97CN001 Gag (Myr+) 97CN54 PN (P-) 97CN54 Env gp120 (selbes Bein) 1:1:1	<p>Myr+ (A G)  </p> <p>-Pr (D N)      scNef  </p> <hr style="border-top: 1px dashed black;"/> <p style="text-align: center;">  </p>
8	97CN001 Gag (Myr+) 97CN54 PN (P-) 1:1	<p>Myr+ (A G)  </p> <p>-Pr (D N)      scNef  </p>
9	Mock	-

## Ergebnisse

**Tabelle 6:** Schematische Darstellung der in der Immunisierungsstudie (IS4B) eingesetzten DNA Konstrukte.

Der Ablauf der Immunisierung und die Analyse der spezifischen  $CD8^+$   $IFN-\gamma^+$  Zellen mittels Durchflusszytometrie erfolgte analog zu IS4A.



**Abb. 16:** Zytometrische Bestimmung Gag-, Pol- und Env-spezifischer zytotoxischer T-Zellen nach Immunisierung mit den 97CN001 Gag und 97CN54 PolNef Konstrukten in Kombination mit verschiedenen molaren Mengen an 97CN54 Env gp120 Konstrukten, die entweder zusammen oder räumlich getrennt in die Hinterbeine i.m. appliziert wurden. 12 Tage nach der Immunisierung wurde den Mäusen Milzzellen entnommen, und für die Zytometrieanalyse mit 10  $\mu$ M Gag, Pol2 und Env1 Peptid für 6 h unter Zugabe von Brefeldin A bei 37°C stimuliert. Als Negativkontrollen dienten Zellen, die mit Medium inkubiert wurden. Die Analyse der Zellen erfolgte unter Verwendung fluoreszenzgekoppelter, spezifischer Antikörper gegen  $CD8$  und intrazellulärem  $IFN-\gamma$ .  $3 \times 10^4$   $CD8^+$  Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie auf die Produktion von  $IFN-\gamma$  analysiert. Die Balkendiagramme repräsentieren jeweils die Mittelwerte von drei Stimulationsansätzen.

Durch die Verabreichung des Env gp120 Konstrukts in das andere Bein vor allem bei den höheren Ratios der Vektoren (1:1:1 und 1:1:0,5) konnten bessere Gag- und Pol-spezifische Immunantworten (146 bzw. 160  $CD8^+$   $IFN-\gamma^+$  für Gag und 141 und 104  $CD8^+$   $IFN-\gamma^+$  für Pol2) erzielt werden, als bei der Koverabreichung in dasselbe Bein (70 bzw. 112  $CD8^+$   $IFN-\gamma^+$  für Gag und 105 bzw. 100  $CD8^+$   $IFN-\gamma^+$  für Pol2).

Auffallend war auch, dass die räumlich getrennte Applikation des gp120 (Ratio 1:1:1) vergleichbare Env-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zell Antworten induzierte wie die Einzelimmunisierung (187 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> im Vergleich zu 210 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>). Bei der Koimmunisierung (Ratio 1:1:1) hingegen wurden stärkere (299 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) Antworten gemessen.

### 2.2.4. Kurzzusammenfassung

Auch durch die immunogene Verbesserung der Gag und PolNef Konstrukte konnte keine gleichwertigen Immunantworten bei Koimmunisierung mit Env gp120 gegen alle drei verabreichten Komponenten erzielt werden. Wurde jedoch Env gp120 in geringeren Mengen (Ratio 1:1:0,25) mit Gag und PolNef koverabreicht, konnte ein adverser Effekt auf die Ausbildung der Gag und PolNef spezifischen Immunantworten verhindert werden. Auch durch eine räumliche Trennung der gp120 Applikation von den Gag und PolNef Applikationen konnte eine gleichwertige Immunantwort gegen alle drei Immunogene selbst bei einem Ratio von 1:1:1 erzielt werden. Desweiteren werden stärkere Env-spezifischen Immunantworten bei einer Koimmunisierung des gp120 mit Gag und PolNef induziert als bei einer räumlich getrennten bzw. Einzelimmunisierung.

## 3. CD40L als molekulares Adjuvans

Adjuvantien werden bei Vakzinierungen eingesetzt, um Immunantworten gegen das verabreichte Antigen zu verstärken. Neben im Menschen zugelassenen Adjuvantien wie Aluminiumsalze<sup>265, 266</sup> oder die Squalen-in-Wasser Emulsion MF59<sup>267, 268</sup>, gibt es noch eine Reihe weiterer Substanzen wie etwa Freudsches Adjuvans, das auf Grund teils starker Nebenwirkungen nur im Tiermodell Anwendung finden.

Eine Möglichkeit der Adjuvierung besteht darin, die Vakzine mit einem endogenen, immunstimulatorischen Molekül zu versehen. Hier wird versucht mit einem „köpereigenen“ Adjuvans die Immunantworten zu verstärken und bestenfalls gezielt in eine Th1 bzw. Th2 Antwort zu modulieren.

In dieser Arbeit wurden die stimulatorischen Eigenschaften des CD40 Liganden (CD40L, CD154) und dessen Eignung als Adjuvans untersucht. CD40L (Abb. 17) wird als Trimer primär auf aktivierten T-Zellen exprimiert und gehört zur Familie der TNF homologen Molekülen. Der Ligand bindet an CD40 auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen und aktiviert diese in Kombination mit dem T-

## Ergebnisse

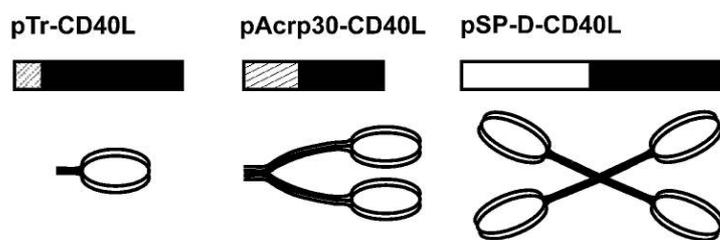
Zellrezeptor-MHC Komplex. Unter anderem wird durch die CD40-CD40L Interaktion die Aktivität von B-Zellen reguliert.



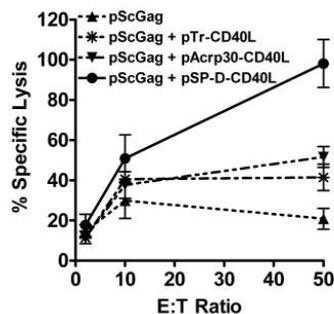
**Abb.17:** Dreidimensionale Darstellung eines CD40L Trimers (von oben betrachtet; Quelle: PBD).

Der Nachteil, dass nur mehrere Trimere des CD40L stimulatorisch wirken, konnte durch Multimerisierung der Trimere überwunden werden <sup>229</sup>. Durch Immunisierungsstudien mit DNA Konstrukten konnte gezeigt werden, dass je höher der Grad der Oligomerisierung des CD40L war, desto stärker waren die induzierten zellulären Immunantworten (siehe Abb.18).

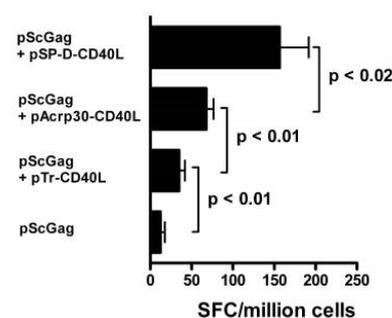
**A**



**B**



**C**



**Abb. 18: A)** Schematische Darstellung multimerer CD40L Varianten. pTr-CD40L stellt ein

## Ergebnisse

---

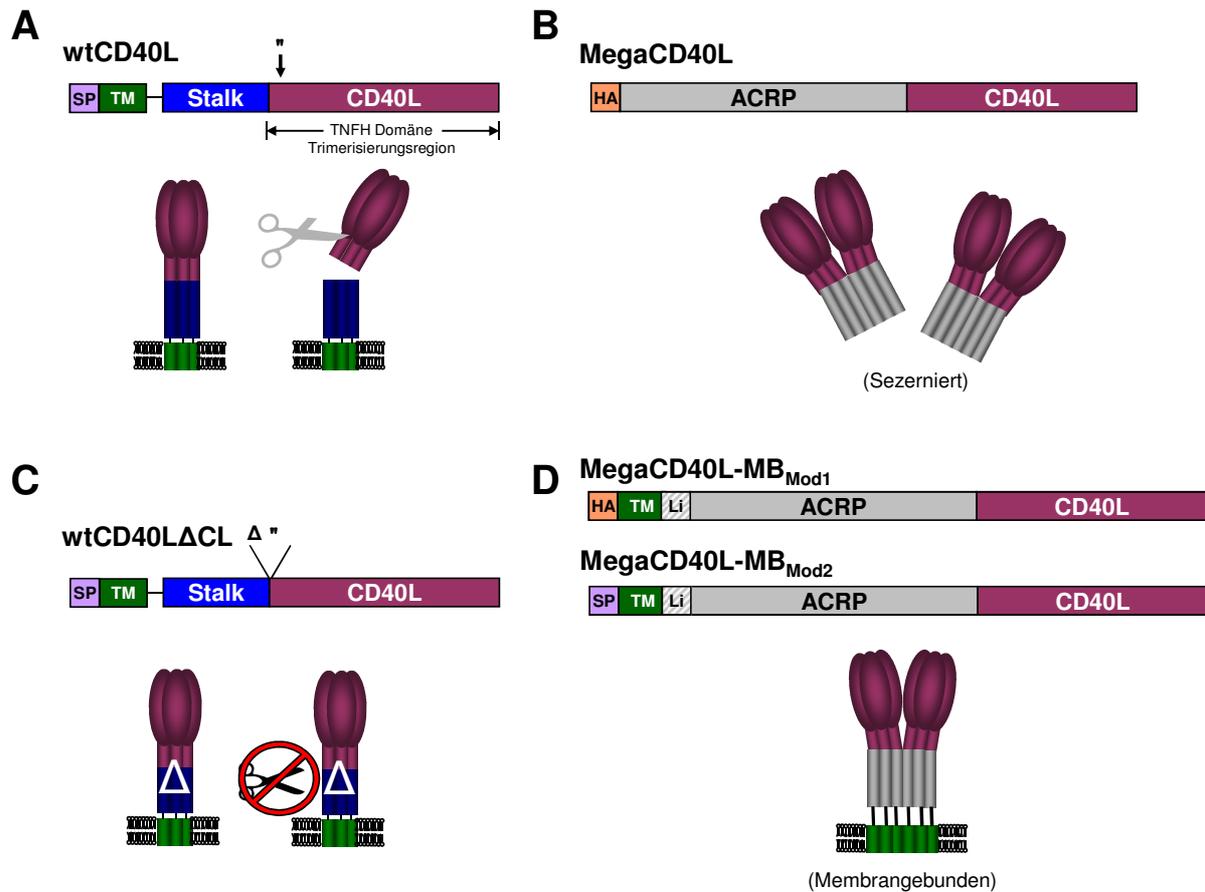
monovalentes CD40L-Trimer dar, als Oligomerisierungsdomäne dient ein Leucinzipper (schraffierte Fläche). pAcrp30-CD40L und pSP-D-CD40L bilden 2- bzw. 4-Trimer CD40L. Deren Oligomerisierungsregionen aus dem Acrp30 (schraffierte Fläche) und SP-D (weiße Fläche) Protein sind in der Lage sich spontan zu multimeren Strukturen mit trimeren Armen zusammen zu lagern. Die biologisch aktive CD40L Domäne ist als schwarze Fläche dargestellt. Analyse der Adjuvanseigenschaften von multimeren CD40L Varianten mittels **B**) Zytotoxizitätsanalyse von CD8<sup>+</sup> T-Zellen. **C**) IFN- $\gamma$  ELISpot Analyse. (Abbildung adaptiert nach Stone *et al.*<sup>229</sup>).

Acrp30: *Adipocyte Complement Related Protein of 30kDa*; SP-D: *Surfactant Protein D*;

### 3.1. Konzipierung und Generierung verschiedener membranständiger CD40L Varianten

Ausgehend von diesen Ergebnissen sollte die Eignung des CD40L als Adjuvans auf der Oberfläche von HIV-1 Pr55<sup>gag</sup> virus-ähnlicher Partikel untersucht werden. Als Ausgangskonstrukte dienten die *per se* membranständige wildtyp Variante<sup>269</sup> und eine sezernierte 2-Trimer Version, die auf der ACRP30-CD40L Variante von Stone *et al.*<sup>229</sup> basiert und von der Firma Apoxis (Lausanne, Schweiz) zur Verfügung gestellt wurde. Da der wildtyp CD40L (wtCD40L) eine Schnittstelle für eine ADAM Protease (A Disintegrin And Metalloprotease) verfügt<sup>270, 271, 272</sup> und somit von der Zelloberfläche abgespalten werden kann, wurde die wtCD40L $\Delta$ CL Variante basierend auf der Publikation von Pietravalle *et al.*<sup>273</sup> konzipiert. Bei dieser wurde die Schnittstelle ohne Funktionsverlust des Proteins deletiert, um eine Abspaltung zu verhindern. Die Varianten wtCD40L und wtCD40L $\Delta$ CL wurden von der Firma Geneart AG kodonoptimiert und synthetisiert.

## Ergebnisse



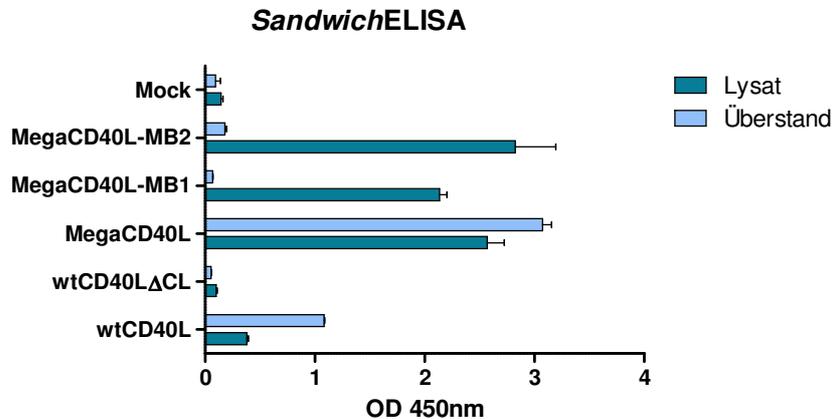
**Abb. 19:** Schematische Darstellung der konzipierten CD40L Varianten. **A:** wildtyp CD40L bestehend aus einem Signalpeptid, einer Transmembrandomäne, einer Stalkregion und der CD40L Domäne<sup>274, 275</sup>. **B:** MegaCD40L bestehend aus einem HA Signalpeptid, einer ACRP Oligomerisierungsregion und der CD40L Domäne<sup>229</sup>. **C:** wildtyp CD40L Variante mit deletierter Protease Schnittstelle. **D:** membranständige Varianten des MegaCD40L mit unterschiedlichen Signalpeptiden. SP: wildtyp CD40L Signalpeptid; HA: Hämagglutininsignalpeptid; TM: wildtyp CD40L Transmembrandomäne; Li: Glycin-Alanin Linker; Stalk: Region mit nichtdefinierter Funktion; " : ADAM Proteaseschnittstelle; ACRP: ACRP30 Oligomerisierungsdomäne; CD40L: biologisch aktive Domäne des CD40L.

Die membranständigen Versionen des MegaCD40L (MegaCD40L-MB<sub>Mod1&2</sub>) wurden mittels FusionsPCR generiert, wobei die wtCD40L Transmembrandomäne über einem flexiblen Linker am N-Terminus angefügt wurde. Die beiden Varianten des MegaCD40L-MB unterscheiden sich nur im N-terminalen Signalpeptid, bei Mod1 wurde das HA-Signalpeptid des MegaCD40L verwendet und bei Mod2 das des wtCD40L. Von allen Varianten wurde jeweils eine murine und eine humane Variante generiert und in den Expressionsvektor pcDNA3.1(+) kloniert.

Die Expression der verschiedenen murinen Konstrukte wurde mittels eines selbstentwickelten CD40L spezifischen SandwichELISA analysiert. Hierfür wurden humane 293T Zellen transient mit den verschiedenen CD40L Varianten transfiziert. Als Kontrollen wurden 293T Zellen mit 97CN001 Gag-pcDNA3.1 und dem Leervektor pcDNA3.1(+) transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Überstände

## Ergebnisse

abgenommen und die Zellen geerntet und ein Teil davon lysiert. Die Überstände und Zelllysate wurden dann mit Hilfe des CD40L spezifischen *Sandwich*ELISA analysiert (siehe Abb. 20)



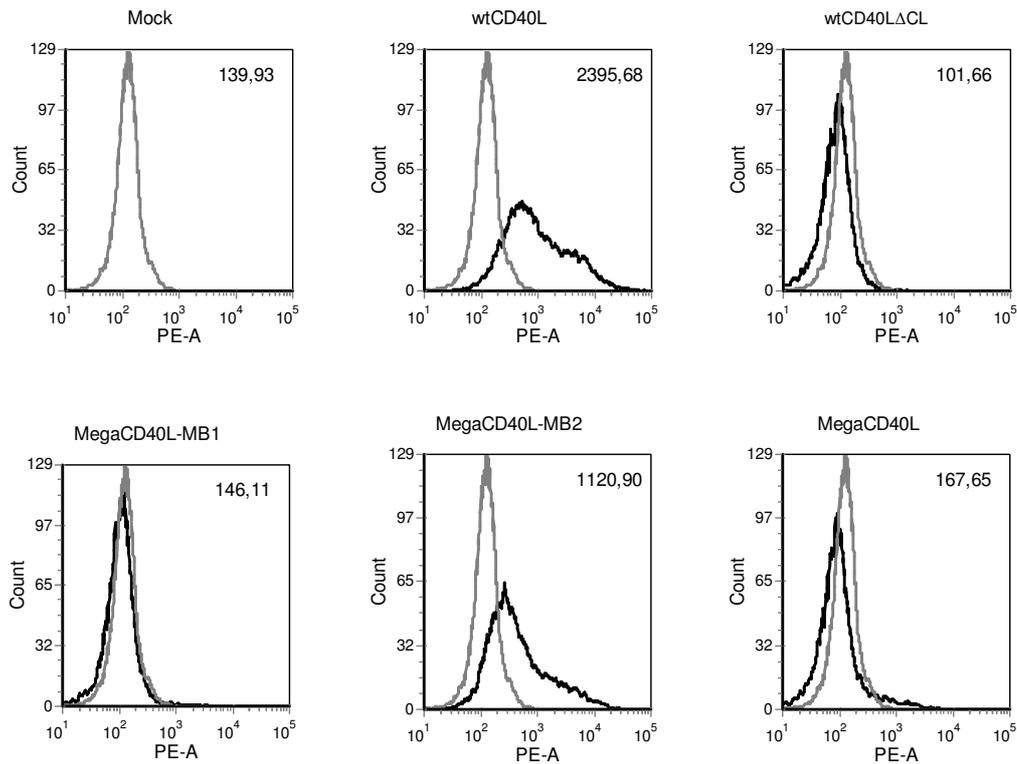
**Abb. 20:** Analyse der Überstände und Zelllysate 48 h nach Transfektion von 293T Zellen mit den jeweiligen CD40L Varianten mit Hilfe eines spezifischen *Sandwich*ELISA

Die Varianten wtCD40L, MegaCD40L und die beiden membranständigen Varianten MegaCD40L-MB wurden sehr stark bis gut von den Zellen exprimiert. wtCD40L wurde zum Teil von den Zellen abgespalten, da es in den Überständen nachweisbar war. MegaCD40L war sowohl in den Lysaten als auch in den Überständen detektierbar und daher wie erwartet von den Zellen sezerniert. Die membranständigen Versionen von MegaCD40L waren nur noch in den Zelllysaten nachweisbar, ein Indiz für eine Verankerung in der Zellmembran. wtCD40L $\Delta$ CL war weder in den Lysaten noch in den Überständen detektierbar. Ob aufgrund der Deletion das Protein fehlgefaltet oder das Epitop der ELISA-Antikörper zerstört wurde ließ sich nicht genauer bestimmen.

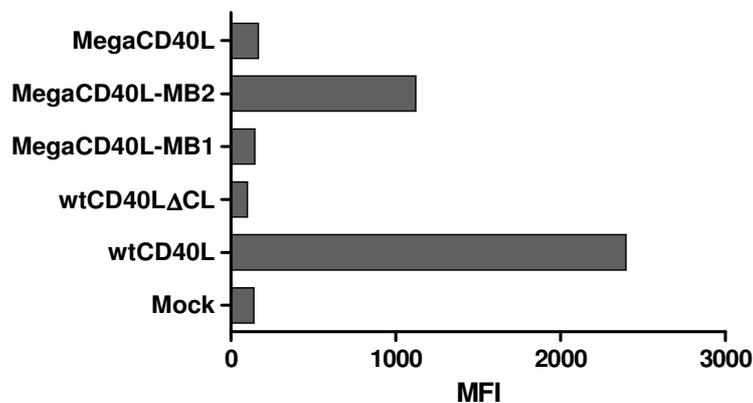
Weiterhin wurde mit einem Teil der Zellen eine zytometrische Analyse durchgeführt, um die Oberflächenexpression der einzelnen Varianten zu untersuchen. Hierfür wurden die Zellen mit einem biotinylierten, CD40L spezifischen, monoklonalen Antikörper inkubiert. Die Bindung des Antikörpers wurde durch Streptavidin-Phycoerythrin detektiert (siehe Abb. 21).

# Ergebnisse

**A**



**B**



**Abb. 21:** Zytometrische Analyse von 293T Zellen, die mit den verschiedenen CD40L Derivaten transfiziert wurden. Die Analyse erfolgte 48 h nach Transfektion mit Hilfe eines CD40L-spezifischen, monoklonalen Antikörpers. Als Kontrollen dienten Zellen die mit dem Leervektor pcDNA3.1 (Mock) transfiziert wurden. **A)** Histogramme der zytometrischen Analyse mit Angabe der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI). **B)** Darstellung der MFI der einzelnen CD40L Varianten als Balkendiagramm.

Die Analysen mittels Durchflusszytometrie ergaben, dass nur die Varianten wtCD40L und MegaCD40L-MB2 auf der Oberfläche der Zellen präsent waren. wtCD40L $\Delta$ CL und MegaCD40L war nicht detektierbar. Anhand der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) konnte ermittelt werden, dass auf den Zellen wtCD40L

## Ergebnisse

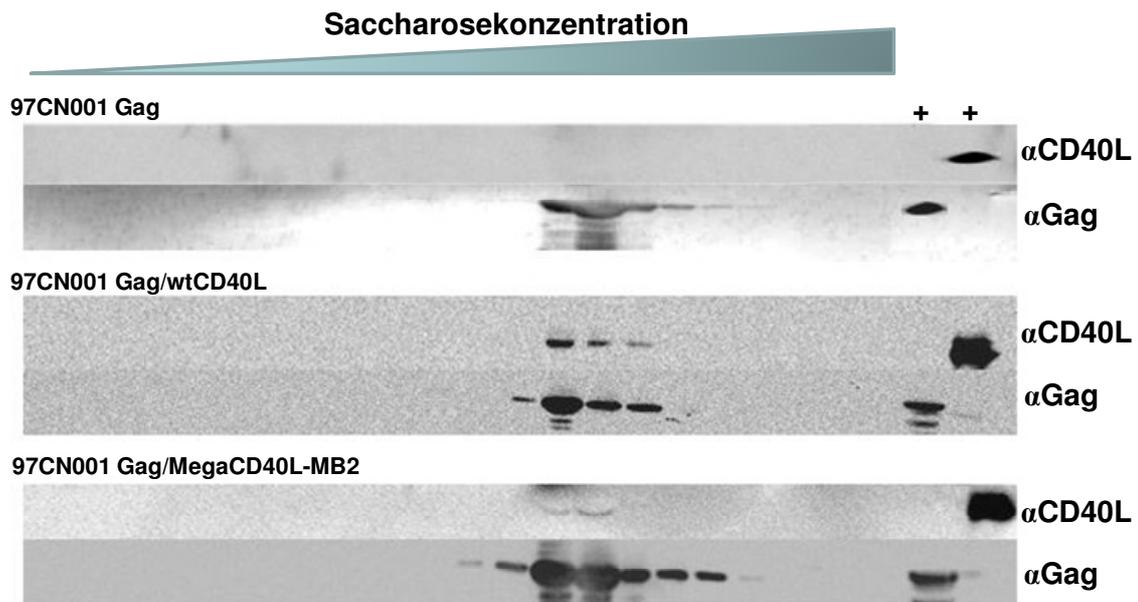
---

etwa um einen Faktor 2,1 präsenter (MFI 2395,68 im Vergleich zu MFI 1120,90) als MegaCD40L-MB2 (Abb. 21 B) war. Aufgrund der fehlenden Oberflächenexpression auf den Zellen wurden die Varianten wtCD40L $\Delta$ CL und MegaCD40L-MB1 von weiteren Versuchen ausgeschlossen.

### **3.2. Pseudotypisierung von VLP mit CD40L**

Nachdem die Expression auf und in den Zellen für wtCD40L und MegaCD40L-MB2 analysiert wurde, sollte mit beiden Varianten pseudotypisierte VLP hergestellt werden. Hierfür wurden 293T Zellen mit 97CN001 Gag-pcDNA3.1 und wtCD40L bzw. MegaCD40L-MB2 in einem von Ratio 2:1 kotransfiziert. 48h nach Transfektion wurden die Überstände geerntet und dann mittels Ultrazentrifugation aufkonzentriert. Die gelösten VLP wurden mit 1  $\mu$ g CD40L spezifischen, biotinylierten Antikörper für 2 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Präparationen auf einen 10-50%igen Saccharosegradienten gegeben und mittels Ultrazentrifugation (99000 x g, 2 h, 4°C) aufgetrennt. Der Gradient wurde dann zu 500  $\mu$ l Fraktionen beginnend bei der 10%igen Schicht abgenommen. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend mit PBS<sub>ohne</sub> versetzt, um die Saccharose auszudünnen, und durch Zentrifugation (40000 x g, 2 h, 4°C) gefällt. Die Überstände wurden verworfen und die Zentrifugationsrückstände in PBS<sub>ohne</sub> aufgenommen. Die Fraktionen wurden dann durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Westernblot unter Verwendung eines p24-spezifischen, monoklonalen Antikörpers, um Pr55<sup>gag</sup> zu detektieren, und eines Streptavidin-HRP Konjugats, um den biotinylierten Antikörper nachzuweisen, analysiert. Sollte sich die jeweilige CD40L Variante auf den Partikeln befinden, würde der daran gebundene, biotinylierte Antikörper in den gleichen Fraktionen wie Pr55<sup>gag</sup> detektierbar sein (siehe Abb. 22).

## Ergebnisse



**Abb. 22:** Sedimentation von 97CN001 Gag VLP, die mit der jeweiligen CD40L Variante pseudotypisiert wurden, in einem Saccharose-Dichtegradienten. Zellkulturüberstände transient transfizierter 293T Zellen wurden 48 h nach Transfektion geerntet und durch Ultrazentrifugation über ein 30%-iges Saccharosekissen vorgereinigt. Die pelletierten Proteine wurden in PBS<sub>ohne</sub> aufgenommen und für 2 h bei 4°C mit einem monoklonalen, biotinylierten CD40L-spezifischen Antikörper inkubiert. Anschließend wurden diese durch Ultrazentrifugation über einem 10 bis 50%-igen Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt. Nach der Zentrifugation wurde der Gradient abgenommen und die erhaltenen Fraktionen über ein 12,5%-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Westernblot mit einem p24-spezifischen, monoklonalen Antikörper bzw. mit Streptavidin-HRP entwickelt. Als Positivkontrollen (+) wurden 5 µg 97CN001 VLP und 1 µg des biotinylierten Antikörper mit auf das Gel aufgetragen.

Die Analyse ergab, dass sowohl wtCD40L als auch MegaCD40L-MB2 in denselben Fraktionen wie Pr55<sup>gag</sup> nachweisbar waren, was auf eine erfolgreiche Pseudotypisierung schließen lässt. MegaCD40L-MB2 lieferte aber im Westernblot ein sehr viel schwächeres Signal als die wildtyp Variante, offenbar wird weniger von diesem auf die VLP verpackt.

### 3.3. Mitogene Eigenschaften der CD40L Varianten

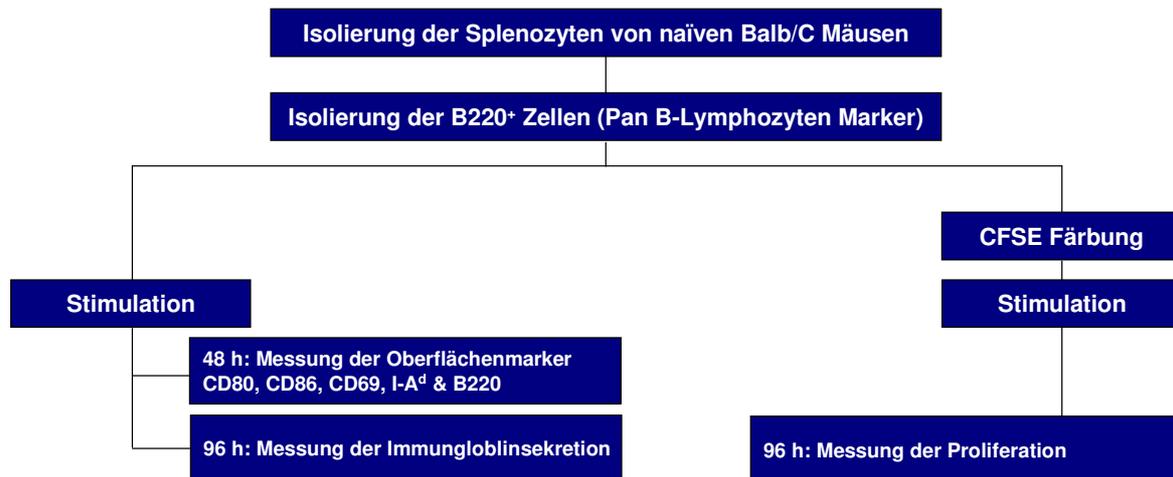
Nachdem virus-ähnliche Partikel erfolgreich mit wtCD40L und MegaCD40L-MB2 pseudotypisiert werden konnten, wurden deren stimulatorischen Eigenschaften zur Proliferation und Aktivierung von B-Lymphozyten untersucht.

Hierfür wurden Splenozyten aus Milzen naiver Mäusen präpariert. Aus diesen wurden mit Hilfe des B220 MACS Systems (Miltenyi) B220<sup>+</sup> Zellen isoliert. Das B220 Antigen wird auf B-Lymphozyten während all ihrer Entwicklungsstadien exprimiert und ist somit ein geeigneter B-Zell Marker.

## Ergebnisse

Die Qualität der Zellaufreinigung wurde anschließend mittels Durchflusszytometrie überprüft (Durchschnitt: 90%-ige Reinheit der B220<sup>+</sup> Zellen).

Anschließend erfolgte eine Einteilung der selektionierten B-Lymphozyten in zwei Gruppen (siehe Abb. 23). Während die eine Gruppe für die Proliferationsanalyse mit 1 µM CFSE gefärbt wurde, die verblieb andere ungefärbt.



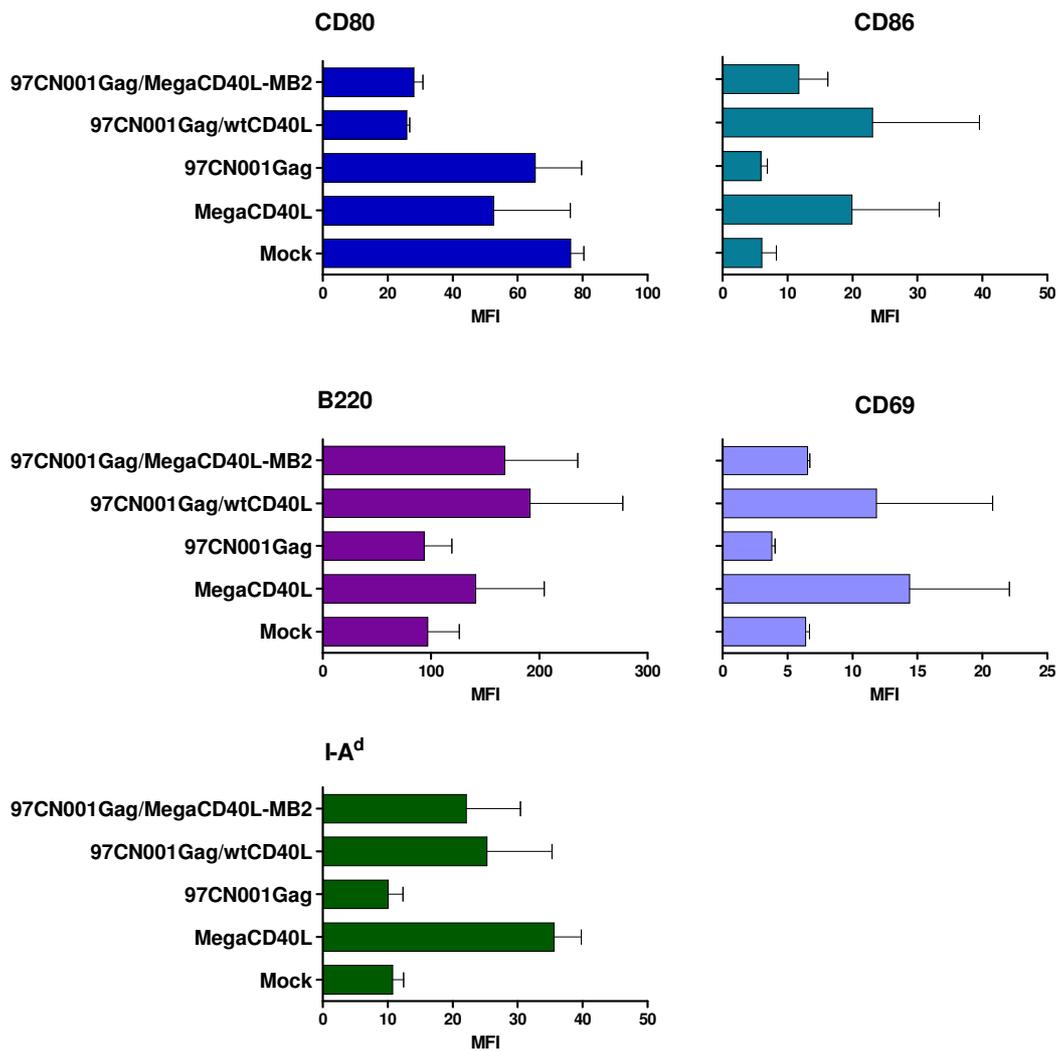
**Abb. 23:** Schematische Darstellung der Versuchsanordnung für die B-Zell Proliferation/Aktivierung durch die mit den CD40L Varianten pseudotypisierten 97CN001 Gag VLP.

Im Falle der ungefärbten Gruppe wurden  $2 \times 10^6$  Zellen, bei der CFSE gefärbten Gruppe  $1 \times 10^6$  Zellen mit 5 µg der jeweiligen VLP Präparation stimuliert. Als Kontrollen dienten nicht stimulierte Zellen und mit 5 µg gereinigtem MegaCD40L stimulierte B-Lymphozyten.

Folgende Kriterien für eine erfolgreiche Aktivierung der B-Lymphozyten wurden anhand mehrerer Publikationen festgelegt<sup>276, 277, 278, 279</sup>: i) Eine Hochregulation von CD86, CD69, I-A<sup>d</sup> (MHC-II), B220 ii) eine Herabregulation von CD80; iii) eine verstärkte Sekretion von Immunglobulinen und iv) Proliferation. Die folgenden Ergebnisse repräsentieren zwei unabhängige Stimulationsversuche mit unterschiedlichen VLP Chargen.

Die Veränderung der Oberflächenexpression von CD80, CD86, CD69, I-A<sup>d</sup> und B220 wurde mit Hilfe spezifischer, fluoreszenzgekoppelter Antikörper in einer zytometrischen Analyse 48 h nach Stimulation der Zellen bestimmt.

# Ergebnisse



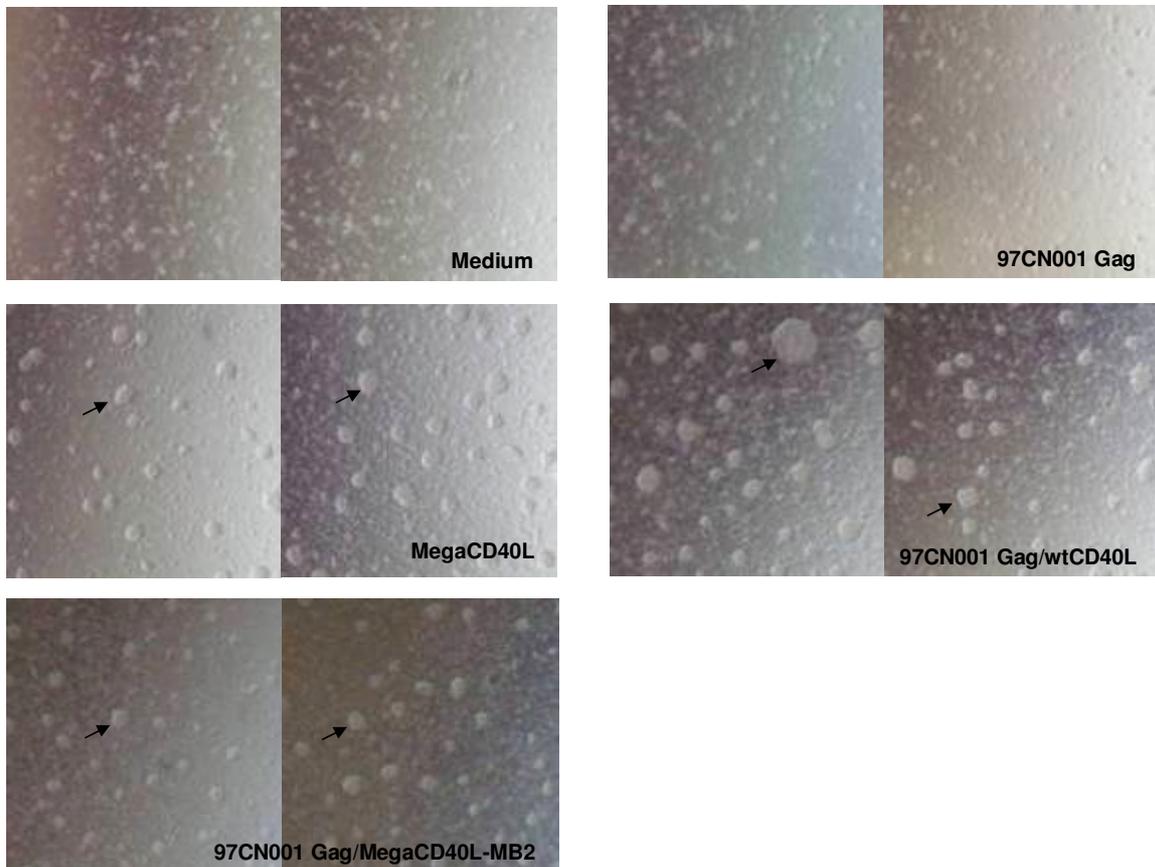
**Abb. 24:** Analyse der Oberflächenexpression von CD80, CD86, B220, CD69 und I-A<sup>d</sup> mittels Durchflusszytometrie 48 h nach Stimulation der B-Lymphozyten. Für die Funktionalitätsbestimmung der CD40L Varianten wurden gereinigte B220<sup>+</sup> B-Lymphozyten für 48 h mit jeweils 5 µg der aufgelisteten 97CN001Gag VLP Varianten stimuliert. Als Negativkontrollen dienten mit Medium stimulierte B-Zellen und B-Zellen, die mit 5 µg 97CN001 Gag VLP stimuliert wurden. Als Positivkontrolle dienten B-Lymphozyten die mit 5 µg aufgereinigten MegaCD40L inkubiert wurden. Eine deutliche Hochregulation von CD86, B220, CD69 und des MHC-I Komplexes I-A<sup>d</sup> und eine deutliche Herabregulation von CD80 im Vergleich zu den Negativkontrollen wird als Aktivierung der B-Lymphozyten gewertet.

wtCD40L und MegaCD40L-MB2 pseudotypisierte VLP induzierten eine deutliche Hochregulation von CD86, I-A<sup>d</sup> und B220 und eine deutliche Herabregulation von CD80 (siehe Abb. 24). Im Falle von CD69 konnte nur wtCD40L eine Hochregulation erreichen. Die pseudotypisierten VLP induzierten eine vergleichbare (CD86, I-A<sup>d</sup>, CD69 nur bei wtCD40L) oder sogar stärkere (CD80 und B220) Aktivierung der B-Lymphozyten.

Nach 96 h wurden die stimulierten B-Zellen unter dem Lichtmikroskop untersucht (siehe Abb. 25). Dabei fielen bei den mit wtCD40L bzw. MegaCD40L-MB2

## Ergebnisse

pseudotypisierten VLP und mit MegaCD40L stimulierten B-Lymphozyten Zellansammlungen auf. Hierbei handelte es sich eventuell um Proliferationszentren, die bei den mit 97CN001Gag VLP bzw. nicht stimulierten Zellen nicht auftraten.

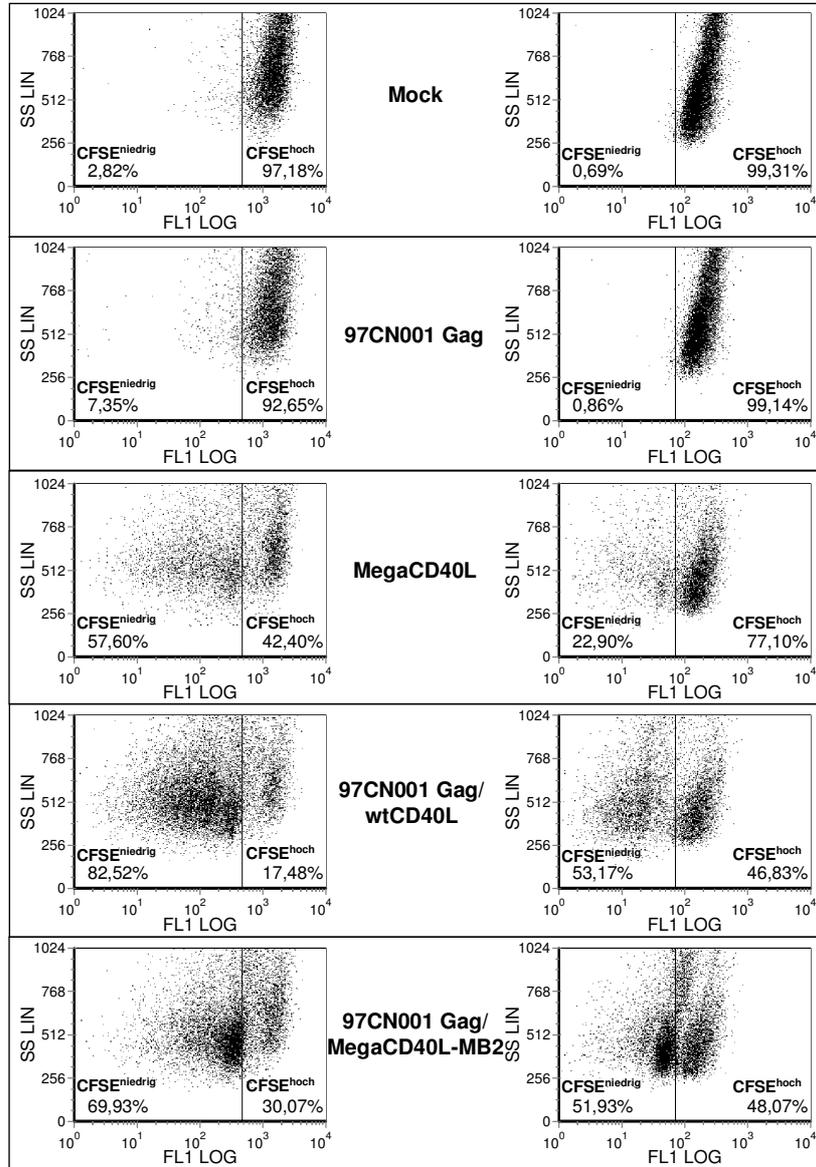


**Abb 25:** Mikroskopische Aufnahmen der B-Lymphozyten 96 h nach Stimulation mit jeweils 5  $\mu$ g der mit den CD40L Varianten pseudotypisierten 97CN001Gag VLP. Als Negativkontrollen dienten Zellen, die mit Medium bzw. mit 5  $\mu$ g 97CN001 VLP stimuliert wurden. B-Zellen die mit 5  $\mu$ g aufgereinigten MegaCD40L stimuliert wurden, fungierten als Positivkontrolle. Mit Pfeilen sind die Ansammlungen eventuell proliferierender Zellen gekennzeichnet.

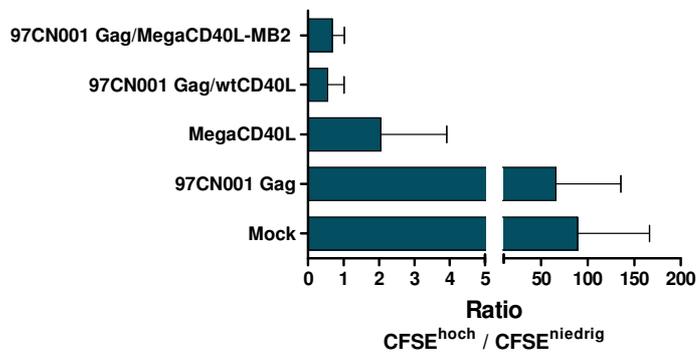
Diese Ansammlungen können als Hinweis für eine verstärkte Proliferation gedeutet werden. Nach der mikroskopischen Analyse wurden die CFSE gefärbten Zellen geerntet und für die zytometrische Analyse vorbereitet. Die Überstände wurden für die Messung der Immunglobulinsekretion mit Hilfe eines spezifischen SandwichELISA eingesetzt.

# Ergebnisse

**A**



**B**



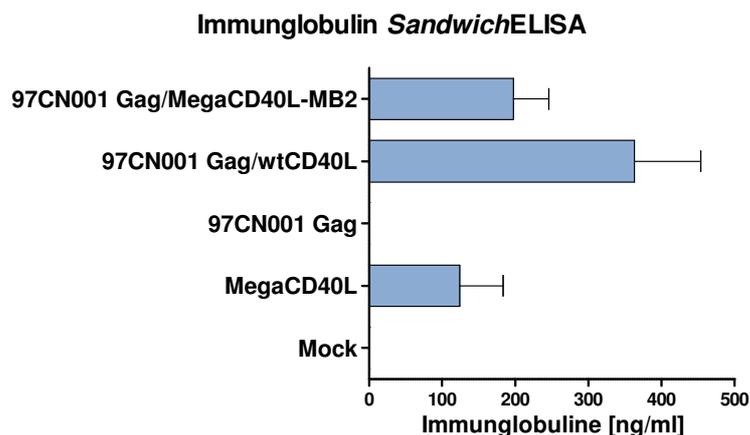
**Abb. 26: A)** Analyse der CFSE gefärbten B-Lymphozyten der unabhängigen Stimulationsversuche 96 h nach Stimulation mittels Durchflusszytometrie. **B)** Graphische Darstellung des Ratios der stark CFSE gefärbten Zellen (CFSE<sup>hoch</sup>) zu den schwach gefärbten CFSE gefärbten Zellen (CFSE<sup>niedrig</sup>).

## Ergebnisse

---

In der FACS Analyse der CFSE gefärbten B-Lymphozyten konnte gezeigt werden, dass die mit wtCD40L und MegaCD40L-MB2 pseudotypisierten VLP und mit MegaCD40L stimulierten Zellen eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität aufwiesen (Abb. 26). Die nicht stimulierten und die mit nicht pseudotypisierten VLP stimulierten Zellen hingegen zeigten keine Abnahme der Intensitäten. Die Abnahme der Fluoreszenzintensitäten kann nur durch eine vermehrte Zellteilung erklärt werden, d.h. beide membranständigen CD40L Varianten haben eine Proliferation der B-Lymphozyten induziert.

Wie bereits oben erwähnt, wurde ein für murine Immunglobuline spezifischer *Sandwich*ELISA mit den Überständen der B-Zellen durchgeführt, um die Antikörpersekretion zu bestimmen (siehe Abb. 27).



**Abb. 27:** Analyse der Zellüberstände der stimulierten B-Lymphozyten mit Hilfe eines für murine Immunglobuline spezifischen ELISA.

Im ELSIA erwiesen sich beide membranständigen CD40L Varianten auf den VLP als sehr potente Induktoren einer unspezifischen Immunglobulinsekretion. Im Vergleich zum aufgereinigten MegaCD40L stimulierten die Partikel assoziierten CD40L Varianten eine stärkere Immunglobulinausschüttung (im Mittel 197 ng/ml für 97CN001 Gag/MegaCD40L-MB2 bzw. 363 ng/ml für 97CN001 Gag/wtCD40L im Vergleich zu 124 ng/ml für MegaCD40L) der B-Zellen.

### **3.4. Adjuvanseigenschaften der partikelgebundenen CD40L Varianten hinsichtlich der Generierung Gag- und Env-spezifischer Immunantworten im Rahmen einer VLP basierten Immunisierungsstudie**

Nachdem die Funktionalität beider membranständigen CD40L Varianten auf virus-ähnlichen Partikeln nachgewiesen werden konnte, wurde eine Immunisierungsstudie mit Balb/C Mäusen angestrebt, in der die Partikel hinsichtlich der Induzierung einer antigenspezifischen erworbenen Immunantwort getestet werden sollten. Zudem wurden in dieser Studie VLP eingesetzt, die mit 97CN54 Env gp145 pseudotypisiert waren. 97CN54 Env gp145 ist eine verkürzte Form des Env gp160 und wurde basierend auf den Publikationen von Kurt Zingler und Randall J. Owens<sup>280, 281</sup> von Dr. Josef Köstler konzipiert, von der Firma Geneart AG kodonoptimiert und synthetisiert. Die gp145 Variante besitzt keine Furinproteaseschnittstelle und keine zytoplasmatische Domäne. Hierdurch sollte eine erhöhte und stabilere Verpackung von Env auf die Virionen erreicht werden.

Durch die zusätzliche Pseudotypisierung der VLP mit 97CN54 Env gp145 sollte analysiert werden, wie neben den Gag-spezifischen auch die Env-spezifischen Immunantworten durch die CD40L Varianten verstärkt oder moduliert werden können. Für ein klinisch relevantes Vakzin ist neben den zellulären Immunantworten auch die Induktion einer Env-spezifischen, speziell eine auf breit neutralisierenden Antikörpern basierende, humorale Antwort von besonderem Interesse.

#### 3.4.1. Biochemische Analyse der verschiedenen VLP Präparationen

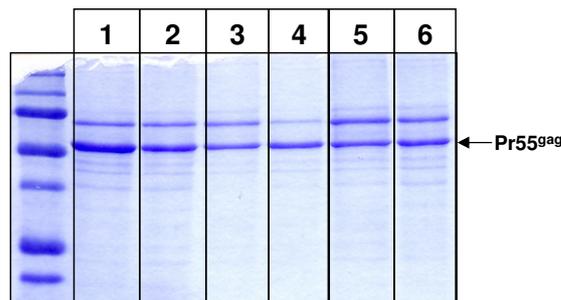
97CN001 Gag VLP wurden mittels transienter Transfektion in 293T Zellen produziert. So wurde 97CN001 Gag mit wtCD40L oder MegaCD40L-MB2 kotransfiziert, um VLP zu erhalten, die mit der jeweiligen Variante pseudotypisiert waren. Für die Produktion von VLP, die neben wtCD40L bzw. MegaCD40L-MB2 noch mit 97CN54 Env gp145 kopseudotypisiert waren, wurde Env gp145 im Ratio 1:1:1 kotransfiziert. Zudem wurden Zellen nur mit 97CN001 Gag transfiziert bzw. nur mit gp145 kotransfiziert, um nicht pseudotypisierte Gag VLP bzw. VLP, die nur mit Env gp145 pseudotypisiert sind, zu produzieren.

48 h nach Transfektion wurden die Überstände der jeweiligen Ansätze geerntet und mittels Ultrazentrifugation durch ein 30%iges Saccharosekissen aufkonzentriert. Die Proteinkonzentration der Präparationen wurde dann mit Hilfe eines Bradford Assay

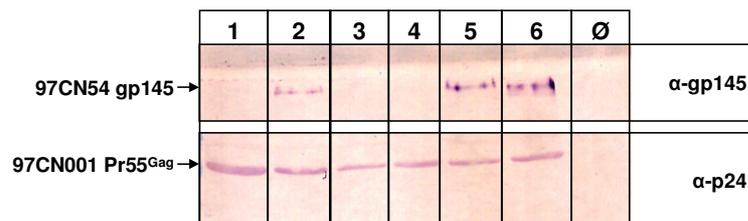
## Ergebnisse

bestimmt. Jeweils 5  $\mu\text{g}$  jeder Präparation wurde mittels CD40L spezifischen *Sandwich*ELISA, SDS-PA Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie Färbung und Westerblot-Analyse unter Verwendung von p24- und Env gp140-spezifischen Antikörpern untersucht (siehe Abb.28). Mögliche LPS Kontaminationen in den Präparationen konnte mit Hilfe eines Limulus Endotoxintests ausgeschlossen werden ( $<0,15$  EU/  $\mu\text{g}$  Protein).

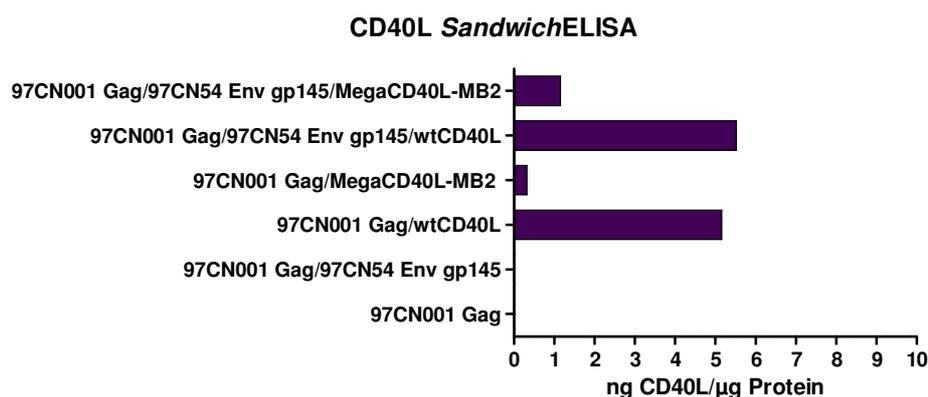
**A**



**B**



**C**



**Abb. 28:** Biochemische Analyse der 97CN001 VLP Präparationen. 5  $\mu\text{g}$  jeder VLP Präparation wurde auf ein 12,5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und mittels Elektrophorese aufgetrennt. **A)** Coomassie Färbung des SDS-Polyacrylamidgels; **B)** Westernblot-Analyse unter Verwendung des p24- bzw. Env gp140-spezifischen, monoklonalen Antikörpers. 1: 97CN001 Gag; 2: 97CN001Gag/CN54 Env gp145; 3: 97CN001 Gag/wtCD40L; 4: 97CN001 Gag/MegaCD40L-MB2; 5: 97CN001 Gag/CN54 Env gp145/wtCD40L; 6: 97CN001 Gag/CN54 Env gp145/MegaCD40L-MB **C)** Analyse und Quantifizierung des CD40L-Gehalts der VLP Präparationen mit Hilfe eines spezifischen *Sandwich*ELISA.

## Ergebnisse

Bei der Analyse fiel auf, dass relativ wenig der CD40L Varianten in den jeweiligen VLP Präparationen vorhanden war, insbesondere MegaCD40L-MB2 wurde sehr schlecht auf die VLP verpackt. Da diese VLP Präparationen aber in einem, wie in Kapitel 3.3. beschriebenen, B-Zell Aktivierungsexperiment auf ihre stimulatorischen Eigenschaften getestet wurden und diese trotz der geringen CD40L Konzentrationen stimulatorisch waren, wurden die Präparationen für die Immunisierungen eingesetzt.

### 3.4.2. Immunologische Eigenschaften der mit den CD40L pseudotypisierten 97CN001 Gag VLP

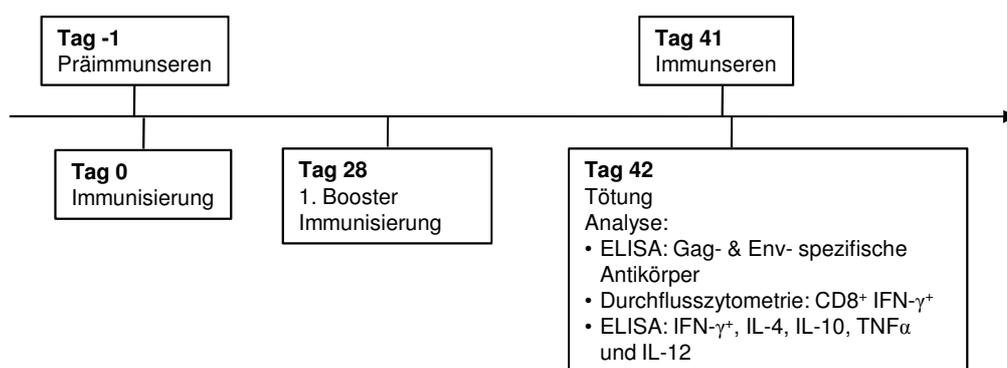
Nachdem die einzelnen Präparationen überprüft wurden und die Präsenz von wtCD40L, MegaCD40L-MB2, Env gp145 und 97CN001 Gag in den jeweiligen Ansätzen verifiziert worden sind, wurden 9 Gruppen von Balb/C Mäusen nach dem in Abb. 29 dargestellten Schema i.m. immunisiert (siehe Abb.29).

**A**

Immunogen	µg	Adjuvans	ng	Route
Mock	-	-	-	-
97CN001Gag	10	-	-	i.m.
97CN001Gag/wtCD40L	10	-	-	i.m.
97CN001Gag/MegaCD40L-MB	10	-	-	i.m.
97CN001Gag/97CN54 gp145	10	-	-	i.m.
97CN001Gag/97CN54 gp145/wtCD40L	10	-	-	i.m.
97CN001Gag/97CN54 gp145/MegaCD40L-MB	10	-	-	i.m.
97CN001Gag + MegaCD40L	10	MegaCD40L	55*	i.m.
97CN001Gag/97CN54 gp145 + MegaCD40L	10	MegaCD40L	55*	i.m.

\*selbe Menge an CD40L wie in den Gruppen 97CN001Gag/wtCD40L & 97CN001Gag/97CN54 gp145/wtCD40L

**B**



**Abb. 29:** Übersicht über die Immunisierungsstudie 5 (IS5): **A)** Tabellarische Auflistung der

## Ergebnisse

---

Versuchsgruppen. **B)** Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Immunisierungsstudie 5.

Als Kontrollgruppen dienten nicht immunisierte Mäuse, Tiere, die nur 97CN001 Gag VLP bzw. Gag VLP pseudotypisiert mit Env gp145 erhielten. Als weitere Kontrollgruppe wurden Mäuse mit 97CN001 Gag VLP bzw. Gag VLP pseudotypisiert mit Env gp145 versetzt mit 55 ng auf gereinigtem MegaCD40L immunisiert. Diese Menge an MegaCD40L entsprach der gemessenen Menge an wtCD40L in den VLP Präparationen 97CN001 Gag/wtCD40L und 97CN001 Gag/wtCD40L/gp145.

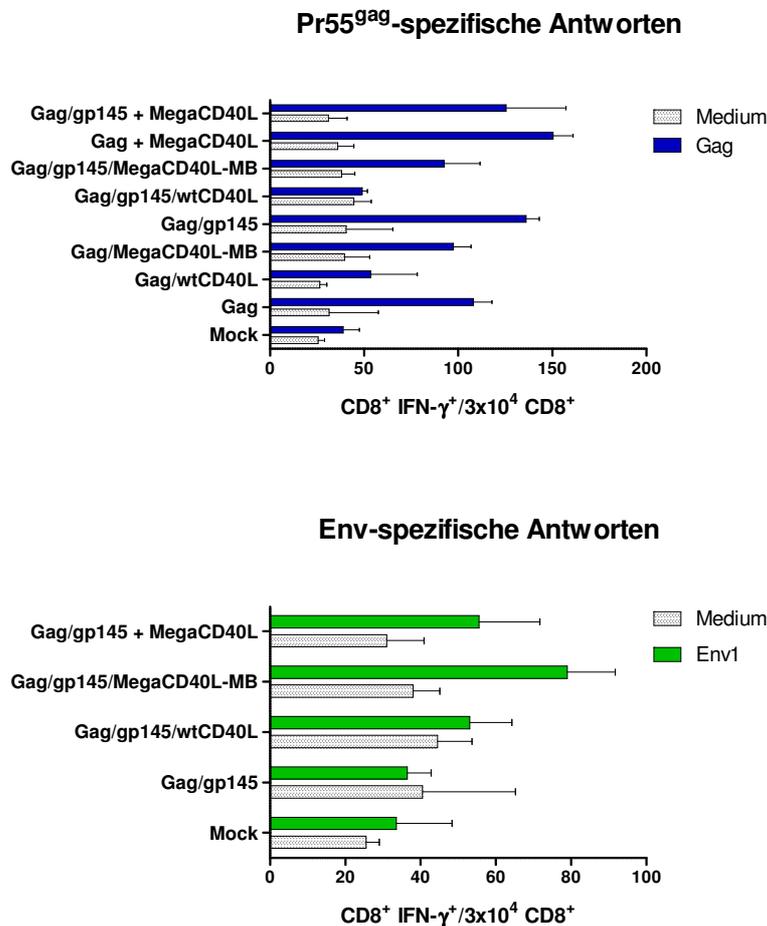
Vor der ersten Immunisierung entnommen Blutproben dienten als Kontrolle für die Auswertung der Gag- bzw. Env-spezifischen, humoralen Immunantworten. An Tag 1 und 28 erhielten die Mäuse jeweils eine Immunisierung mit der jeweiligen VLP Präparation. Einen Tag vor dem Töten der Mäuse wurde ihnen nochmals Blut abgenommen und davon wieder die Seren aufbereitet.

Die Mäuse wurden an Tag 42 durch zervikale Dislokation getötet, ihnen jeweils die Milzen entnommen und daraus die Splenozyten präpariert. Ein Teil der Zellen wurde für 6 h mit einem MHC-I restringiertem Gag Peptid und einem Env1 Peptid restimuliert und anschließend wurde die Frequenz der CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die restlichen Splenozyten wurden für 40 h mit 10  $\mu$ g 97CN001 Gag VLP bzw. mit 10  $\mu$ g rekombinantem 97CN54 Env gp140 restimuliert. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation (3000 x g, 15 min, 4°C) entfernt und die Überstände wurden für die Bestimmung der IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$  und IL-12 Sekretion eingesetzt.

Mittels ELISA wurden zudem die Titer der 97CN001 Gag bzw. 97CN54 Env gp140 spezifischen Antikörper in den Immunsereen bestimmt.

# Ergebnisse

## 3.4.2.1. Ergebnisse der zytometrischen Analyse



**Abb. 30:** Zytometrische Bestimmung Gag- und Env-spezifischer zytotoxischer T-Zellen nach Immunisierung mit den verschiedenen 97CN001 Gag VLP Varianten, die in die Hinterbeine i.m. appliziert wurden. 12 Tage nach der Immunisierung wurde den Mäusen Milzzellen entnommen, und für die Zytometrieanalyse mit 10  $\mu$ M Gag und Env1 Peptid für 6 h unter Zugabe von Brefeldin A bei 37°C stimuliert. Als Negativkontrollen dienten Zellen, die mit Medium inkubiert wurden. Die Analyse der Zellen erfolgte unter Verwendung fluoreszenzgekoppelter, spezifischer Antikörper gegen CD8 und intrazellulärem IFN- $\gamma$ .  $3 \times 10^4$  CD8<sup>+</sup> Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie auf die Produktion von IFN- $\gamma$  analysiert. Die Balkendiagramme repräsentieren jeweils die Mittelwerte von drei Stimulationsansätzen.

Auf Ebene der Gag- und Env-spezifischer CD8<sup>+</sup> Antworten ließ sich keine Steigerung durch die Pseudotypisierung der VLP mit den CD40L Varianten beobachten. Die Pseudotypisierung mit wtCD40L hatte hinsichtlich der Gag-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell Antworten sogar einen adversen Effekt (54 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> pro  $3 \times 10^4$  CD8<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zu 108 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) bzw. die Adjuvierung mit MegaCD40L-MB hatte keinen Einfluss (98 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> im Vergleich zu 108 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>). Ein ähnliches Bild hinsichtlich der Gag-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zell Antworten zeichnet sich auch bei den mit gp145 kopseudotypisierten VLP. Eine Adjuvierung mit wtCD40L induzierte

## Ergebnisse

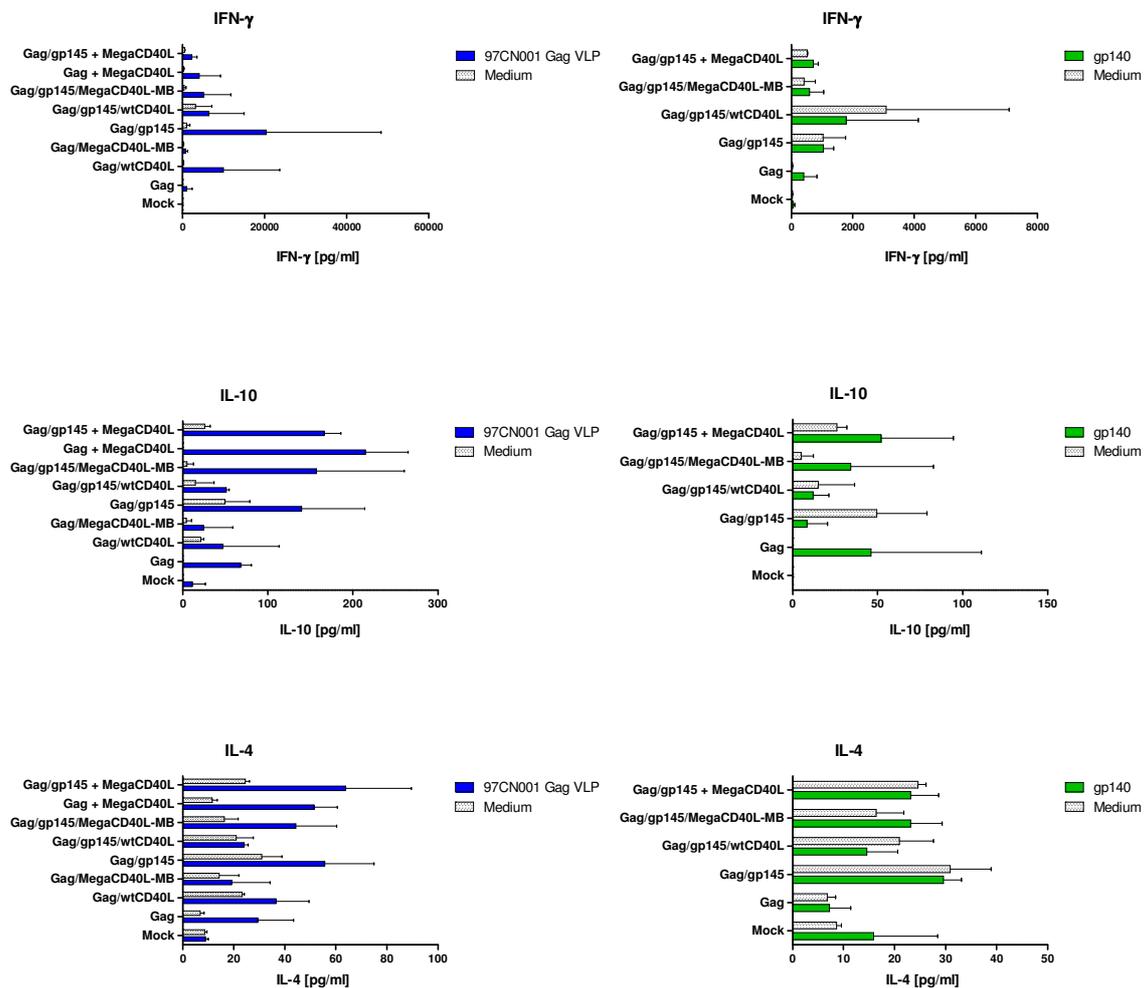
---

wesentlich schlechtere CD8<sup>+</sup> Antworten (49 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> im Vergleich zu 136 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) und eine Adjuvierung mit MegaCD40L-MB etwas schlechtere Immunantworten (93 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> im Vergleich zu 136 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) als die Gag/gp145 VLP. Eine Beimischung des aufgereinigten MegaCD40L führte nur im Falle der Gag VLP zu einer Verstärkung der CD8<sup>+</sup> T-Zell Antworten (150 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> im Vergleich zu 108 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>). Bei den Gag/gp145 VLP zeigte sich kein Effekt durch die Beimischung (125 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> im Vergleich zu 136 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>).

Lediglich eine mäßige Steigerung der Env-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell Antworten wurde durch MegaCD40L-MB Adjuvierung der VLP erzielt (79 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> im Vergleich zu 36 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>). Wobei anzumerken ist, dass die Gag/gp145 Gruppe auch stark auf die Mediumkontrolle reagierte (36 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> für Env1 und 41 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> für Medium) und man daher nicht von einer spezifischen Antwort ausgehen kann. Auch die Gruppe der Gag/gp140/wtCD40L immunisierten Tiere zeigte starke unspezifische Reaktionen auf das Medium und nur etwas stärkere spezifisch für Env (53 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> für Env1 und 44 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> für Medium). Die Zugabe von gereinigtem MegaCD40L zu den Gag/gp145 VLP induzierte zwar deutlich messbare Env-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zell Antworten, diese waren aber schwächer bei den Tieren, die mit Gag/gp145/MegaCD40L-MB immunisiert wurden (79 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> im Vergleich zu 56 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>).

# Ergebnisse

## 3.4.2.2. Ergebnisse der ZytokinELISA Analyse



**Abb. 31:** Analyse der Sekretion der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-10 und IL-4 40 h nach Stimulation der Splenozyten mit 97CN001 Gag VLP bzw. rekombinalem Env gp140 mittels SandwichELISA Technologie. Die Balkendiagramme repräsentieren die Mittelwerte zweier unabhängiger Stimulationen.

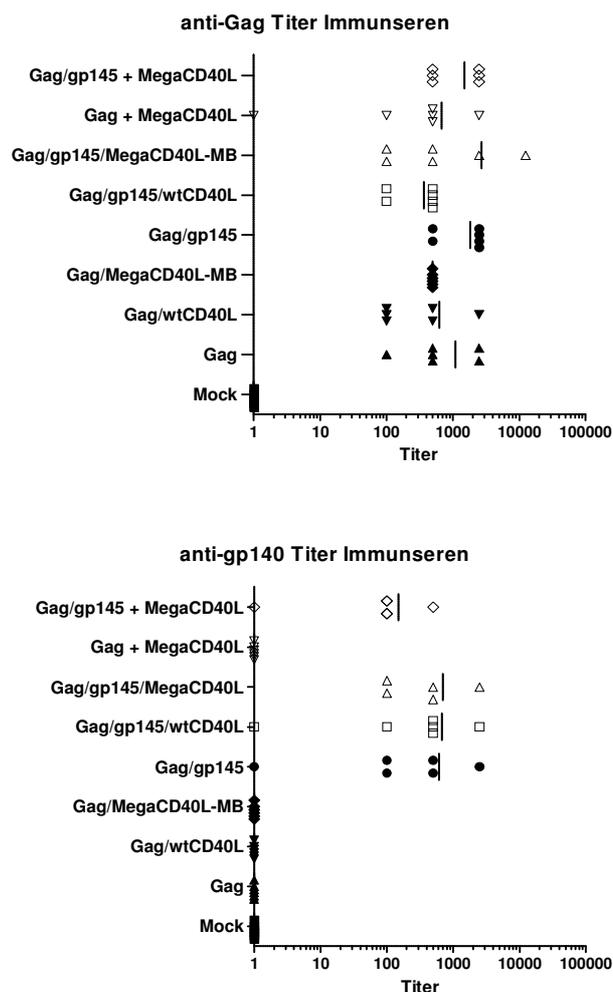
Bei der Analyse der Zytokinsekretion konnte ebenfalls keine Verbesserung der Immunantworten durch Pseudotypisierung der VLP mit den CD40L Varianten festgestellt werden. Zwar war bei den Tieren, die mit Gag/wtCD40L immunisiert wurden, die IFN- $\gamma$  Sekretion stärker als bei Gag bzw. Gag/MegaCD40L-MB (9921 pg/ml im Vergleich zu 1028 bzw. 707 pg/ml) aber bei den Zytokinen IL-10 und IL-4 war die Ausschüttung in etwa so wie bei der Gag Gruppe (47 pg/ml IL-10 und 37 pg/ml IL-4 im Vergleich zu 68 pg/ml IL-10 und 29 pg/ml IL-4). Die Gruppe die mit Gag/MegaCD40L-MB immunisiert wurde, schnitt auch bei diesen Zytokinen am schlechtesten ab (24 pg/ml IL-10 und 19 pg/ml IL-4). Interessanterweise induzierte eine Pseudotypisierung mit Env gp145 mitunter die stärksten Immunreaktionen

## Ergebnisse

(20376 pg/ml IFN- $\gamma$ , 140 pg/ml IL-10 und 56 pg/ml IL-4 im Vergleich zu 1028 pg/ml IFN- $\gamma$ , 68 pg/ml IL-10 und 29 pg/ml IL-4 in der Gag Gruppe) und eine Kopseudotypisierung mit einem der CD40L Derivate konnte keine weitere Steigerung induzieren (20376 pg/ml IFN- $\gamma$ , 140 pg/ml IL-10 und 56 pg/ml IL-4 im Vergleich zu 6428 pg/ml IFN- $\gamma$ , 51 pg/ml IL-10 und 24 pg/ml IL-4 in der Gag/gp145/wtCD40L bzw. 5053 pg/ml IFN- $\gamma$ , 157 pg/ml IL-10 und 44 pg/ml IL-4 in der Gag/gp145/MegaCD40L-MB Gruppe).

Eine Env gp140-spezifische Zytokinsekretion ließ sich aufgrund der hohen unspezifischen Reaktionen bei den jeweiligen mit Medium stimulierten Kontrollgruppen nicht messen. Zudem waren die Zytokine IL-12 und TNF- $\alpha$  nicht in den Überständen detektierbar.

### 3.4.2.3. Ergebnisse der Antikörper Titerbestimmung



**Abb. 32:** Titer Gag- und Env- spezifischer Antikörper nach Immunisierung mit verschiedenen VLP Varianten. Mäuse wurden mit den beschriebenen Antigenpräparationen (siehe Abb. 29 A)

## Ergebnisse

---

immunisiert und der Gehalt Gag- und Env- spezifischer Antikörper in Woche 6, zwei Wochen nach erfolgter Zweitimmunisierung, mittels *Sandwich*ELISA bestimmt.

Bei der Analyse der humoralen Antworten (siehe Abb. 32) konnte außer bei der Gag/gp145/wtCD40L (im Mittel ein Titer von 367) immunisierten Gruppe eine Steigerung der Gag-spezifischen Antikörperantwort durch Gabe von gp145 pseudotypisierten VLP (Titer von 1500 für Gag/gp145+MegaCD40L, 2500 für Gag/gp145/MegaCD40L-MB und 1833 für Gag/gp145) festgestellt werden. Eine Beimischung des aufgereinigten MegaCD40L (Titer von 684) bzw. eine Pseudotypisierung nur mit wtCD40L (Titer von 633) oder MegaCD40L-MB (Titer von 500) verbesserte die Gag-spezifische Immunantwort im Vergleich zur Gag immunisierten Gruppe (Titer von 1100) nicht. Bei der Env-spezifischen humoralen Antwort ließ sich nur eine geringe Steigerung durch die Pseudotypisierung der gp145/Gag VLP mit den CD40L Varianten beobachten (Titer von 683 für Gag/gp145/wtCD40L bzw. Titer von 700 für Gag/gp145/MegaCD40L-MB im Vergleich zu einem Titer von 616 für Gag/gp145). Eine Beimischung von gereinigtem MegaCD40L hatte einen negativen Effekt auf die Induktion der Env-spezifischen Antikörperantworten (Titer von 150).

### **3.5. Adjuvanseigenschaften von MegaCD40L bei der Generierung Gag- und Env-spezifischer Immunantworten im Rahmen einer DNA basierten Immunisierungsstudie**

In einem neuen Ansatz sollten im Rahmen einer DNA Immunisierungsstudie die Adjuvanseigenschaften des MegaCD40L bezüglich der Induktion einer Gag- und Env-spezifischen Immunantwort genauer untersucht werden, wenn dieser ebenfalls als DNA verabreicht wird.

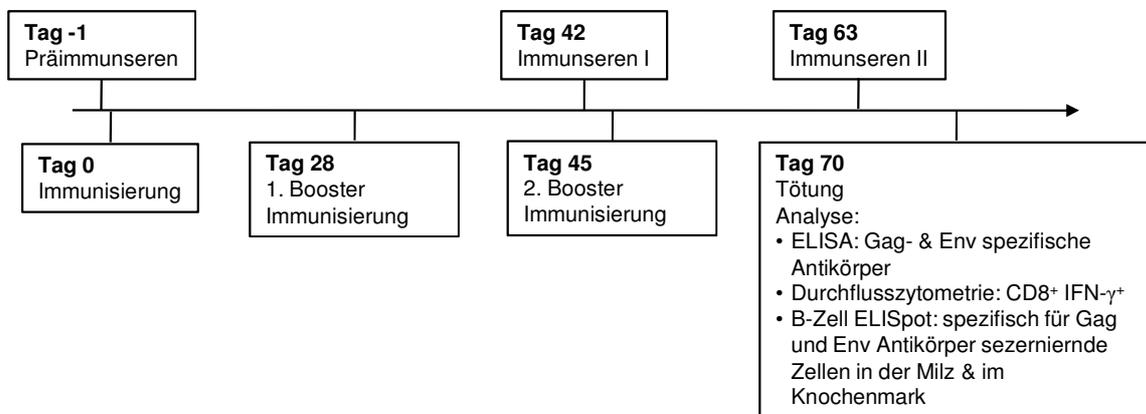
Für diese Immunisierungsstudie 6 (IS6) wurden nach dem in Abb. 33 dargestellten Schemata und Zeitplan 6 Gruppen mit Balb/C Mäusen intramuskulär immunisiert.

## Ergebnisse

**A**

Immunogen	µg	Adjuvans	µg	Route
Mock	-	-	-	-
97CN001Gag + 97CN54 gp145	20/20	MegaCD40L	100	i.m.
97CN001Gag + 97CN54 gp145	20/20	MegaCD40L	20	i.m.
97CN001Gag + 97CN54 gp145	20/20	MegaCD40L	4	i.m.
97CN001Gag + 97CN54 gp145	20/20	-	-	i.m.
97CN001Gag + 97CN54 gp145	80/80	-	-	i.m.

**B**



**Abb. 33: A) Tabellarische Auflistung der Versuchsgruppen. B) Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Immunisierungsstudie 6.**

Für die Studie dienten nichtimmunisierte Mäuse (Mock) als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle fungierten Tiere die mit einer hohen Dosis (80µg) des 97CN001 Gag bzw. 97CN54 Env gp145 Konstrukts immunisiert wurden. In den weiteren Gruppen wurde jeweils 20 µg der beiden Konstrukte mit abnehmenden Mengen (100 µg, 20 µg und 4µg) des MegaCD40L Plasmids appliziert. Als weitere Kontrollgruppe erhielten Mäuse nur 20 µg des 97CN001 Gag bzw. 97CN54 Env gp145 Konstrukts ohne Zugabe des MegaCD40L Plasmids.

An Tag 42 und 63 wurde den Tieren Blut abgenommen und daraus die Seren gewonnen (Immunseren I und II). Als Referenz dienten Seren die einen Tag vor der ersten Immunisierung abgenommen wurden (Präimmunseren).

Die Balb/C Mäuse wurden an Tag 28 und 45 abermals mit den jeweils gleichen Mengen an Immunogenen und Adjuvans immunisiert (*Booster* Immunisierungen).

## Ergebnisse

---

Die Mäuse wurden an Tag 70 durch zervikale Dislokation getötet, ihnen jeweils die Milzen entnommen und daraus die Splenozyten präpariert. Zudem wurden aus den Ober- und Unterschenkelknochen die Knochenmarkszellen gewonnen.

Splenozyten wurden für die Analyse der CD8<sup>+</sup> T-Zellen 6 h mit dem MHC-I restringiertem Gag Peptid und dem Env1 Peptid in Anwesenheit von Brefeldin A restimuliert und anschließend wurde die Frequenz der CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Für die Analyse der CD4<sup>+</sup> Zellen wurden Splenozyten ebenfalls für 6 h mit 97CN001 Gag VLP und rekombinantem 97CN54 Env gp140 inkubiert. Mittels Durchflusszytometrie wurde dann der Anteil der CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> gemessen.

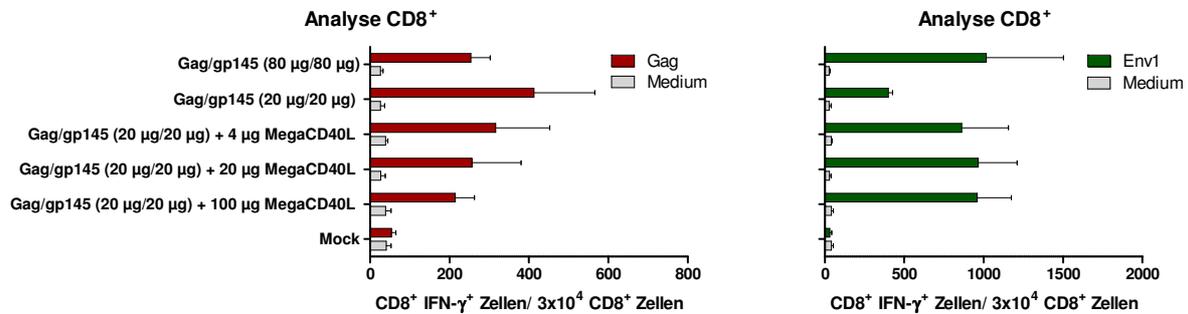
Die restlichen Splenozyten wurden zusammen mit den Knochenmarkszellen für den neu in der Arbeitsgruppe etablierten B-ZellELISpot eingesetzt. Diese wurden für 16 h auf ELISpotPlatten, die entweder mit rekombinantem 97CN54 Env gp140 oder mit 97CN001 Gag VLP beschichtet wurden, inkubiert. Danach wurden die Platten entwickelt und die Anzahl der spezifisch Antikörper sezernierenden Zellen (ASZ) in der Milz bzw. im Knochenmark bestimmt.

Mittels ELISA Technologie wurden noch die Titer der 97CN001 Gag bzw. 97CN54 Env gp140 spezifischen Antikörper in den Immunseren I und II bestimmt.

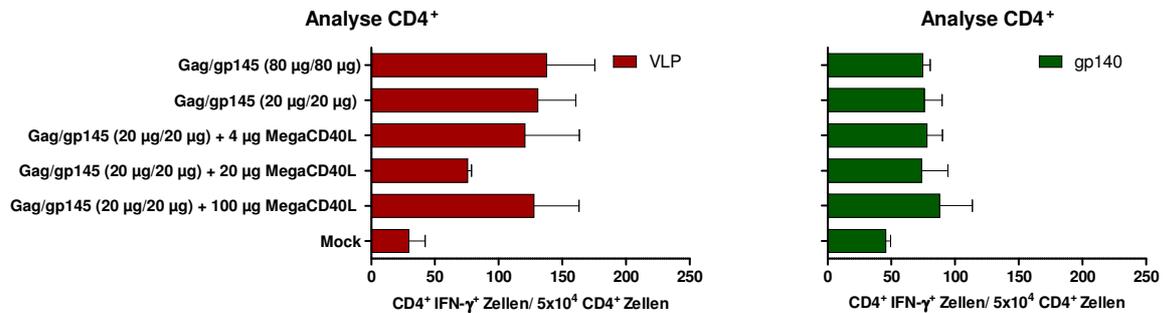
# Ergebnisse

## 3.5.1. Ergebnisse der Durchflusszytometrie

A



B



**Abb. 34:** Zytometrische Bestimmung Gag- und Env-spezifischer zytotoxischer T-Zellen und T-Helferzellen nach Immunisierung mit 97CN001 Gag/97CN54 Env gp145 DNA und den verschiedenen Mengen an MegaCD40L Plasmid, die in die Hinterbeine i.m. appliziert wurden. 70 Tage nach der Erstimmunisierung (siehe Abb. 33 B) wurde den Mäusen Milzzellen entnommen, und für die Zytometrieanalyse der CD8<sup>+</sup> mit 10 µM Gag und Env1 Peptid für 6 h unter Zugabe von Brefeldin A bei 37°C stimuliert. Als Negativkontrollen dienten Zellen, die mit Medium inkubiert wurden. Für die Analyse der CD4<sup>+</sup> Zellen wurden die Splenozyten ebenfalls für 6 h in Anwesenheit von Brefeldin A mit 97CN001 Gag VLP bzw. rekombinantem 97CN54 Env gp140 inkubiert. Die Analyse der Zellen erfolgte unter Verwendung fluoreszenzgekoppelter, spezifischer Antikörper gegen CD8 bzw. CD4 und intrazellulärem IFN-γ. 3x10<sup>4</sup> CD8<sup>+</sup> bzw. 5x10<sup>4</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie auf die Produktion von IFN-γ analysiert. Die Balkendiagramme repräsentieren jeweils die Mittelwerte von drei Stimulationsansätzen.

Bei der Analyse der CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 34 A) konnte eine Verbesserung der Env-spezifischen Antworten in Relation zu der MegaCD40L Menge festgestellt werden (960 CD8<sup>+</sup> IFN-γ<sup>+</sup> bei 100 µg MegaCD40L, 965 CD8<sup>+</sup> IFN-γ<sup>+</sup> bei 20 µg MegaCD40L, 860 CD8<sup>+</sup> IFN-γ<sup>+</sup> bei 4 µg MegaCD40L und 400 CD8<sup>+</sup> IFN-γ<sup>+</sup> ohne Zugabe von MegaCD40L). Die Tiere, die die hohe Dosis an Gag/gp145 (jeweils 80 µg) erhielten, zeigten auch die stärksten Env-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten (1016 CD8<sup>+</sup> IFN-γ<sup>+</sup>).

## Ergebnisse

---

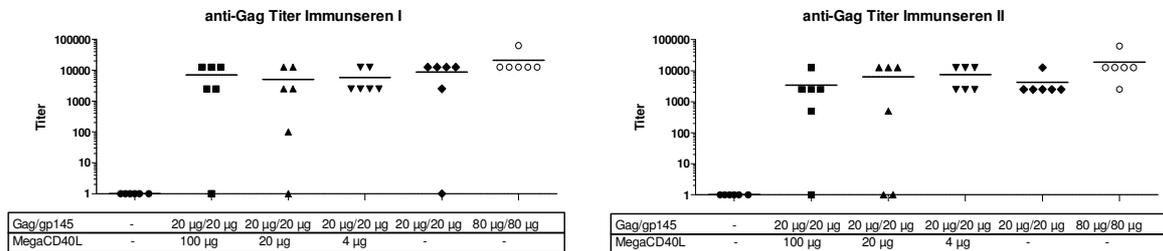
Hinsichtlich der Frequenz der Gag-spezifischen CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen konnte eine Abnahme der Zellzahl in Relation zu der MegaCD40L Menge gemessen werden (214 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> bei 100  $\mu$ g MegaCD40L, 256 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> bei 20  $\mu$ g MegaCD40L, 317 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> bei 4  $\mu$ g MegaCD40L und 412 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> ohne Zugabe von MegaCD40L). Interessanterweise zeigte die Gruppe, die die Hochdosis (80  $\mu$ g) erhalten hatte, im Vergleich zur nicht mit MegaCD40L adjuvierten Gruppe, die nur jeweils 20  $\mu$ g des Gag und Env Konstrukts erhalten hatte, schwächere CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten (254 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> im Vergleich zu 412 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>).

Bei der Analyse der CD4<sup>+</sup> T-Zellantworten konnte keine Korrelation zur eingesetzten MegaCD40L Menge festgestellt werden. Die Gag-spezifischen Antworten bewegten sich in einem Bereich von 121 bis 138 CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> pro  $5 \times 10^4$  CD4<sup>+</sup> Zellen, nur die Gruppe die 20  $\mu$ g MegaCD40L erhalten hatte, zeigte schwächere Reaktionen (76 CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>). Auch bei der Analyse der Env-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellantworten waren die gemessenen Reaktionen von etwa gleicher Stärke (zwischen 74 und 78 CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>), nur bei der Gruppe, die 100  $\mu$ g MegaCD40L erhalten hatte, war die Frequenz der CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> leicht erhöht (88 CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>).

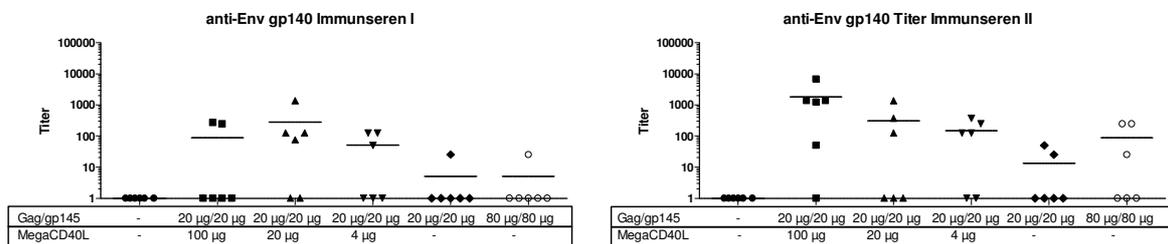
# Ergebnisse

## 3.5.2. Ergebnisse der Antikörper Titerbestimmung

A



B



**Abb. 35:** Titer Gag- und Env- spezifischer Antikörper nach Immunisierung mit Gag/gp145 und unterschiedlichen Mengen an MegaCD40L. Mäuse wurden mit den beschriebenen DNA Mengen (siehe Abb. 33 A) immunisiert und der Gehalt Gag- und Env- spezifischer Antikörper an Tag 42 und Tag 63 (siehe Abb. 33 B) mittels *Sandwich*ELISA bestimmt.

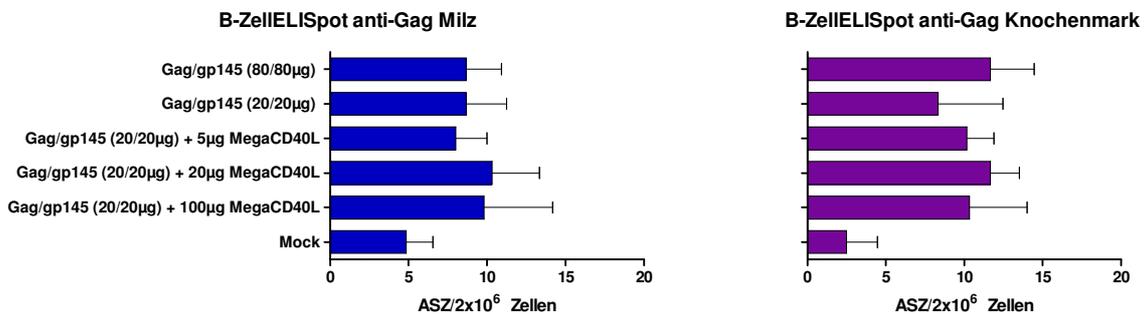
Bei der Analyse der Gag-spezifischen Immunantworten (siehe Abb. 35) ließ sich bei den Immunseren I keine deutliche Relation mit der eingesetzten MegaCD40L Menge feststellen (Titer von 7084 für 100 µg, 5017 für 20 µg, 5833 für 4 µg MegaCD40L und 8750 ohne MegaCD40L). Bei den Immunseren II fiel auf, dass die Titer durch die wiederholte Immunisierung nur bei den mit 20 und 4 µg MegaCD40L adjuvierten Gruppen etwas stiegen (von 5017 auf 6334 bei 20 µg und von 5833 auf 7500 bei 4 µg MegaCD40L), in den beiden anderen Gruppen sanken diese sogar ab (von 7084 auf 3416 bei 100 µg MegaCD40L und von 8450 auf 4167 ohne MegaCD40L). Zudem ließ sich eine negative Korrelation der Gag-spezifischen Titer mit der Menge an koverabreichendem MegaCD40L feststellen (Titer von 3416 für 100µg, 6334 für 20 µg und 7500 für 4 µg), wobei die Gruppe, die kein MegaCD40L Plasmid erhielt, wieder einen etwas niedrigeren Titer aufwies (Titer von 4167). Bei den Mäusen, die mit der Höchstdosis an Gag/gp145 (80 µg) immunisiert wurden, ließ sich auch der höchste Titer messen, der auch durch die weitere Immunisierung nicht anstieg (Titer von 20833 bei den Immunseren I und 191677 bei den Immunseren II).

# Ergebnisse

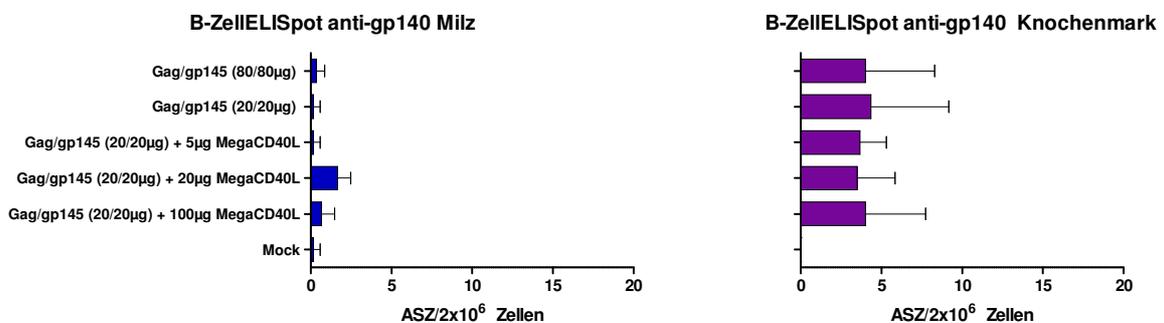
Bei den humoralen, Env-spezifischen Antworten ließ sich bei den Immunseren II die Höhe der Titer mit der Menge an koimmunisiertem MegaCD40L korrelieren (Titer von 1821 für 100 µg, 313 für 20 µg, 146 für 4 µg MegaCD40L und 13 ohne MegaCD40L). Bei den Immunseren I war diese Korrelation noch nicht so deutlich zu messen (Titer von 88 für 100 µg, 284 für 20 µg, 50 für 4 µg MegaCD40L und 5 ohne MegaCD40L). Außerdem stiegen die Env-spezifischen Antikörpertiter nach der erneuten Immunisierung (Titer von 88 auf 1821 für 100 µg, von 284 auf 313 für 20 µg, von 50 auf 146 für 4 µg MegaCD40L und von 5 auf 13 ohne MegaCD40L). Insgesamt gesehen aber waren die Titer schwach und nicht bei allen immunisierten Tieren ließen sich Env-spezifische Antikörper (bei ca. 43%) nachweisen. Auffallend war auch, dass sich auch in der Gruppe, die die Höchstdosis an Gag/gp145 (80µg) erhielt, ebenfalls nur schwache Env-spezifische Antikörpertiter (Titer von 5 bei den Immunseren I und Titer von 88 bei den Immunseren II) messbar waren.

### 3.5.3. Ergebnisse der B-ZellELISpot Analysen

**A**



**B**



**Abb. 37:** Bestimmung der Anzahl der Zellen, die nach Immunisierung mit 97CN001 Gag/97CN54 Env gp145 DNA und den verschiedenen Mengen an MegaCD40L Plasmid für Gag- und Env-spezifische Antikörper sezernieren, mittels ELISpot Technologie. 70 Tage nach der

## Ergebnisse

---

Erstimmunisierung (siehe Abb. 33 B) wurde den Mäusen Milz- und Knochenmarkszellen entnommen und für den B-ZellELISpot eingesetzt.  $2 \times 10^6$  Zellen wurden für 16 h auf ELISpotPlatten, die entweder mit rekombinantem 97CN54 Env gp140 oder mit 97CN001 Gag VLP beschichtet wurden, inkubiert. Danach wurden die Platten gegen murine Immunglobuline entwickelt und die Anzahl der spezifisch Antikörper sezernierenden Zellen (ASZ) in der Milz bzw. im Knochenmark bestimmt. Die Balkendiagramme repräsentieren jeweils den Mittelwert von sechs Stimulationsansätzen.

Im B-ZellELISpot konnte man die Anzahl der ASZ nicht in Relation mit der koverabreichten Menge an MegaCD40L setzen. Insgesamt gesehen war die Anzahl ( $\leq 15$  ASZ pro  $2 \times 10^6$  Zellen) und die Unterschiede der gemessenen ASZ sowohl bei anti-Gag als auch bei anti-Env gp140 zu gering um eine Aussage über die Adjuvanseigenschaften von MegaCD40L treffen zu können.

### 3.6. Kurzzusammenfassung

Trotz erfolgreicher Pseudotypisierung von VLP mit den verschiedenen, membranständigen CD40L Varianten und deren deutlichen stimulatorischen Eigenschaften bezüglich der Aktivierung und Proliferation von B-Lymphozyten ließ sich in der Immunisierungsstudie 5 nur auf Ebene Env-spezifischer  $CD8^+$  T-Zellen Antworten, wenn auch nur für die MegaCD40L-MB Variante, ein deutlich positiver Effekt feststellen.

Bei der Immunisierungsstudie 6, in der MegaCD40L als DNA koverabreicht wurde, konnten Verstärkungen Env-spezifischer  $CD8^+$  T-Zell Antworten als auch Env-spezifischer Antikörperantworten mit steigender Menge an MegaCD40L gemessen werden. Auf Ebene der Gag-spezifischen  $CD8^+$  Antworten hingegen ließ sich ein negativer Effekt des MegaCD40L auf die Induktion spezifischer Antworten feststellen.

# Diskussion

## 1. HIV-1 Stamm C GagPolNef

### 1.1. Einfluss der Aminosäuresubstitutionen in 97CN54 Pr55<sup>Gag</sup> auf die Fähigkeit zur Bildung und Freisetzung virus-ähnlicher Partikel

Wie im Ergebnisteil dargestellt (Abb. 2 A), wurden über den Abgleich der Aminosäuresequenz des Pr55<sup>Gag</sup> von 97CN54 mit 97CN001 an sieben Positionen Unterschiede gefunden. Schon vorher war aufgefallen, dass sich trotz effizienter Transfektion mit 97CN54 Pr55<sup>Gag</sup> keine nennenswerten Mengen an virus-ähnlichen Partikel im Zellüberstand detektieren ließen. Da jedoch infektiöse 97CN001 Viren isoliert wurden, konnte man auf eine erfolgreiche Bildung und Freisetzung von Virionen schließen. Dies war ausschlaggebend für die Entscheidung das 97CN54 Pr55<sup>Gag</sup> durch das 97CN001 zu ersetzen.

Welche Mutationen in 97CN54 für die ineffiziente Partikelfreisetzung verantwortlich ist/sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht. Anhand mehrerer Publikationen<sup>252, 41, 253, 254, 255, 256, 257</sup> konnte eine ungefähre Topographie von 97CN54 und 97CN001 Gag erstellt werden. (siehe Abb. 2 in Kapitel 1.1).

Nach Abgleich aller gelisteter 614 HIV-1 Pr55<sup>Gag</sup> Aminosäuresequenzen in der Los Alamos HIV-1 *Database* war auffallend, dass die meisten Mutationen äußerst konservierte Positionen betreffen. Insbesondere die ersten drei Mutationen (S66, P85 und R98) in 97CN54 liegen in  $\alpha$ -Helices des p17 MA und zudem befindet sich zwischen eine Ubiquitinylierungsdomäne S66 und P85. Ubiquitinylierungen spielen eine wichtige Rolle während des *budding* Prozesses und Mutationen solcher Domänen können diesen beeinträchtigen<sup>282, 254</sup>. Da es sich bei S66 und P85 um nicht konservative Aminosäureaustausche bezüglich 97CN001 handelt, könnte bei 97CN001 die Ubiquitinylierungsdomäne durch Konformationsänderung des Proteins nicht mehr zugänglich sein. Auch die letzten drei Mutationen (G439, R447 und E461) liegen in unmittelbarer Nähe einer Ubiquitinylierungsdomäne. Besonders diese Domäne ist hinsichtlich ihres Einflusses auf den *budding* Prozess gut beschrieben<sup>254</sup>. Wiederum handelt es sich hier um einen jeweils nicht konservativen Austausch der Aminosäure bezogen auf die 97CN001 Sequenz. Auch die letzte gefundene

Mutation 309G ist nicht konservativ bezüglich 97CN001 und liegt zudem in der Nähe der *Major Homology Region* (MHR).

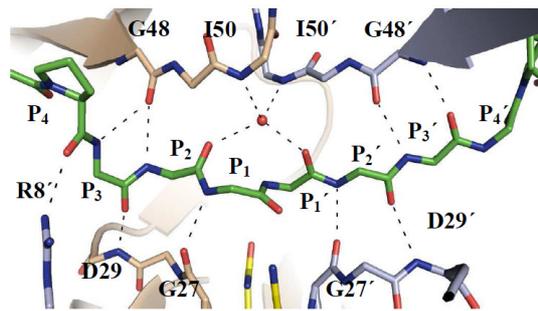
Ob schon einzelne Mutationen oder das Zusammenspiel mehrerer Aminosäureaustausche die defiziente Partikelfreisetzung von 97CN54 verursachen, muss experimentell geklärt werden. Anhand der Literatur konnte kein kritischer Aminosäureaustausch identifiziert werden.

### **1.2. Eigenschaften des *frame shift* GagPolNef Konstrukts**

Die Konzeption der *frame shift* Domäne orientierte sich an den Arbeiten von Dr. Andreas Leihnerer und Marcheschi *et al.* <sup>264</sup>. Bei der Analyse der Überstände und Lysate der transfizierten Zellen konnte gezeigt werden, i) dass der konzipierte Leserastersprung funktioniert und ii) GagPolNef verbessert in den Überstand abgegeben wird als im Falle des Durchlesekonstrukts. Diese verbesserte Abgabe wird nicht durch eine verstärkte GagPolNef Expression erreicht, Durchlese- und *frame shift*-Konstrukt weisen in etwa die gleiche Expressionsrate auf, sondern wahrscheinlich dadurch, dass beim *frame shift*-Konstrukt zu etwa 95% Pr55<sup>gag</sup> entsteht und, analog zum viralen Lebenszyklus, GagPolNef in die Virionen einlagert wird. Dieses wird damit vermehrt in den Überstand abgegeben, anders als das Durchlesekonstrukt, bei dem kein Pr55<sup>gag</sup> entsteht und die Freisetzung von Partikeln erleichtert.

### **1.3. Eigenschaften *frame shift* GagPolNef Konstrukts mit aktiver Protease und Einfluss der Punktmutation G29 auf die Proteaseaktivität**

Bei der Herstellung des ursprünglichen 97CN54 GagPolNef wurde aus Gründen der Sicherheit die darin enthaltene virale Protease inaktiviert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Aktivität der Protease wiederhergestellt. Interessanterweise fand sich ein nicht konservativer Aminosäureaustausch an Position 29, der die Funktion der Protease inhibierte. Recherchen in der Literatur ergaben <sup>283, 284</sup>, dass diese Position essentiell für die Substratbindung ist (siehe Abb. 1).



**Abb. 1:** Wasserstoffbrückennetzwerk zu den Peptidbindungen bei Bindung des repräsentativen RPGNFLQSRP Substratoligopeptids; die Seitenketten der Aminosäuren (Ausnahme: R8') sind zur besseren Übersicht nicht gezeigt<sup>284</sup>; PDB-Code 1MT9

Indem an Position 29 Glycin (97CN54) zu Aspartat (97CN001) revertiert wurde, konnte die Aktivität der Protease wiederhergestellt werden. Zwar wurde nur ein Teil des Pr55<sup>gag</sup> prozessiert, aber ein direkter Vergleich mit der viralen Protease war aufgrund des sehr artifiziellen GagPolNef Konstrukts nicht möglich. Demnach lässt sich nicht bestimmen, inwiefern die angefügte, modifizierte Reverse Transkriptase Domäne, die zudem das *scrambled* Nef enthält, die Protease hinsichtlich der Dimerisierung bzw. in der Prozessivität beeinträchtigt. Ob durch die Prozessierung des GagPolNef Polyproteins durch die Protease neue Epitope zugänglich werden und sich im Vergleich zu dem GagPolNef Konstrukt mit inaktiver Protease dadurch verbesserte Immunantworten induzieren lassen, konnte in dieser Arbeit nicht mehr experimentell geklärt werden.

## 1.4. Molekularbiologische Eigenschaften des 97CN54 PolNef Konstrukts

Durch die erfolgreiche Generierung des PolNef Konstrukts stand ein Vergleichskonstrukt zu den GagPolNef Varianten zur Verfügung. Zum einem war es nun möglich die Gag und PolNef Expression voneinander zu entkoppeln und diese frei in verschiedenen Ratios miteinander zu kombinieren, zum anderen verblieb nun das PolNef in den Zellen und wurde nicht mehr, wie im Falle der myristylierten GagPolNef Varianten, mit Pr55<sup>gag</sup> von den Zellen abgeben. So war es möglich, den Einfluss des *cross-priming* hinsichtlich der Verpackung von PolNef in die Partikel sowie den Einfluss der Expressionsrate von Pr55<sup>gag</sup> auf die von PolNef hinsichtlich der Generierung spezifischer Immunantworten zu analysieren.

### 2.1. Immunologische Eigenschaften der GagPolNef Konstrukte

#### 2.1.1. Verbesserte immunologische Eigenschaften durch Einfügen eines *frame shift*

In den Immunisierungsstudien 1 (IS1) und 2A (IS2A) konnte eine Verbesserung der Immunantworten um den Faktor 1,8 – 3,5 durch das Einfügen eines *frame shift* in das GagPolNef Konstrukt bezüglich der Pr55<sup>gag</sup> spezifischen Antworten erreicht werden. Die Pol-spezifischen Antworten hingegen waren bei den *frame shift* Konstrukten im Vergleich zu den Durchlesekonstrukten etwas abgeschwächt. Diese Verbesserung beruhte nicht nur allein auf der Myristylierung des Konstrukts sondern hauptsächlich, wenn man die nicht myristylierten Varianten in Kap. 2.1.2 des Ergebnisteils miteinander vergleicht, auf dem veränderten Expressionsratio von Pr55<sup>gag</sup> zu PolNef. Warum die Pr55<sup>gag</sup> Antworten im Durchlesekonstrukt schlechter als die des *frame shift* sind, darüber lässt sich nur spekulieren. Eventuell besitzen die beiden Pol Peptide eine stärkere Affinität für den MHC-I Komplex als das Pr55<sup>gag</sup> Peptid und können diesen daraus verdrängen und von der Präsentation ausschließen. Somit würden fast ausschließlich Pol spezifische Immunantworten induziert. Im Falle des *frame shift* Konstrukt liegt in den Zellen etwa 95% Pr55<sup>gag</sup> und zu 5% GagPolNef vor, durch die erhöhte Menge an Gag gegenüber GagPolNef könnte der hypothetische Verdrängungseffekt ausgeglichen werden. Dadurch würde mehr von dem Gag Peptid präsentiert und schließlich auch eine spezifische Immunantwort induziert werden. Eine andere Erklärung könnte eine unterschiedliche Prozessierung des Durchlesekonstrukts im Vergleich zum *frame shift* Konstrukt sein. Wenn das Gag Peptid in geringerem Maße aus dem GagPolNef Kontext von der Protease herausprozessiert wird, kann es auch nur in geringerem Maße dem Immunsystem präsentiert werden. Da wie bereits oben ausgeführt, sich durch das Einfügen des *frame shift* die Menge an Pr55<sup>gag</sup> in den Zellen im Vergleich zum Durchlesekonstrukt erhöht, steigt auch die Menge an herausprozessiertem Gag Peptiden. Dies könnte die verbesserte Induktion von Gag spezifischen Immunantworten erklären.

Um diese These zu überprüfen wurde das Durchlesekonstrukt mit Hilfe des HLA *Peptide Binding Predictions* Programm ([http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/))<sup>285</sup> und mit dem SYFPEITHI Programm

## Diskussion

(<http://www.syfpeithi.de>)<sup>286</sup> hinsichtlich der MHC-I H2-K<sup>d</sup> Präsentation analysiert. Mittels des Programms NetChop 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetChop/>)<sup>287</sup> wurden die Wahrscheinlichkeiten der Prozessierung durch das Proteasom berechnet. Dabei wurden nur die drei verwendeten Peptide, die Dr. Jens Wild experimentell ermittelt hatte, genauer analysiert. Bei dem Gag Epitop war das genaue Nonamer nicht bekannt und daher wurde auf ein 15mer Peptid zurückgegriffen, das das mögliche Epitop beinhaltet. In der Analyse wurde dann das 15mer in allen möglichen Nonamer Kombinationen analysiert.

Position	Aminosäure	Wahrscheinlichkeit der Prozessierung an der jeweiligen Position	Entstehendes Epitop	Epitop
192	Q	0.147095	Q AAMQILKDT	Gag
201	T	0.024174		
193	A	0.169187	A AMQILKDTI	
202	I	0.132748		
194	A	0.385090	A MQILKDTIN	
203	N	0.042849		
195	M	0.828688	M QILKDTINE	
204	E	0.382151		
196	Q	0.024067	Q ILKDTINEE	
205	E	0.382151		
197	I	0.483815	I LKDTINEEA	
206	A	0.753495		
198	L	0.637485	L KDTINEEAA	
207	A	0.285984		
627	V	0.654614	V LVGPTPVNI	Pol 1
637	I	0.751185		
1139	V	0.974759	V YYDPSKDLI	Pol 2
1147	I	0.620243		

**Tabelle 1:** Kurzfassung der NetChop 3.0 Analyse der Prozessierung von GagPolNef durch das Proteasom. Das Programm berechnete die Wahrscheinlichkeiten, dass die in den Immunisierungsstudien (IS1 – IS4) verwendeten Gag- und Pol-Peptide herausprozessiert werden. (Einstellungen: C-term 3.0, Threshold 0.5; Prozessierung durch die Protease ist durch „|“ gekennzeichnet)

Die Analyse ergab (siehe Tabelle 1), dass die beiden Pol-Peptide, die in den Immunisierungsstudien (IS1-IS4) verwendet wurden, mit größerer Wahrscheinlichkeit aus dem GagPolNef-Proteinkontext herausprozessiert werden, als die möglichen

## Diskussion

Gag Peptide. Von den Gag-Peptiden wird am wahrscheinlichsten das Peptid 198-206 entstehen.

H2 <sup>d</sup> Klasse I	Epitop	Sequenz	Position im Protein	score	Rang
H2-K <sup>d</sup>	Pol 2	YYDPSKDLI	1139	3456,00	2
	Gag	AMQILKDTI	194	69,12	58
	Pol 1	LVGPTPVNI	628	57,60	86
	Gag	AAMQILKDT	193	2,88	359
		MQILKDTIN	195	2,4	370
		QILKDTINE	196	<1	>621
		ILKDTINEE	197	<1	>621
LKDTINEEA	198	<1	>621		
KDTINEEAA	199	<1	>621		
H2-D <sup>d</sup>	Pol 2	YYDPSKDLI	1139	<1	>207
	Gag	AMQILKDTI	194	<1	>207
	Pol 1	LVGPTPVNI	628	<1	>207
	Gag	AAMQILKDT	193	<1	>207
		MQILKDTIN	195	<1	>207
		QILKDTINE	196	<1	>207
		ILKDTINEE	197	<1	>207
LKDTINEEA	198	<1	>207		
KDTINEEAA	199	<1	>207		
H2-L <sup>d</sup>	Pol 2	YYDPSKDLI	1139	<1	>537
	Gag	AMQILKDTI	194	1,5	335
	Pol 1	LVGPTPVNI	628	1,2	379
	Gag	AAMQILKDT	193	1,0	525
		MQILKDTIN	195	1,0	410
		KDTINEEAA	199	1,0	413
		ILKDTINEE	197	<1	>537
LKDTINEEA	198	<1	>537		
QILKDTINE	196	<1	>537		

**Tabelle 2:** Ergebnis der HLA Peptide Binding Predictions Analyse für H2<sup>d</sup> Moleküle ( $T(1/2) \geq 1$  (Kurzfassung)) für die Halbwertszeit der MHC-I Dissoziation der in den IS1 – IS4 verwendeten Pol- und Gag-Peptide. Die Peptide sind entsprechend ihres score, also entsprechend ihrer Affinität zum MHC-I Komplex geordnet.

Bei dieser Analyse erhielt das Pol 2 Epitop für H2-K<sup>d</sup> den höchsten score, der bei dieser Analyse für die geschätzte Halbwertszeit der Dissoziation eines Moleküls mit dem MHC-I Komplex steht. Bei den beiden anderen MHC-I Komplexen H2-D<sup>d</sup>

## Diskussion

und H2-L<sup>d</sup> hingegen waren die *scores* sehr niedrig (<2) und die Unterschiede auch sehr gering, d.h. eine Beladung und Präsentation auf diesen MHC-I Molekülen ist äußerst unwahrscheinlich. Demnach besitzt das Pol2-Peptid eine größere Affinität zum H2-K<sup>d</sup> MHC-I Komplex als das Pol1- und das Gag-Peptid an Position 194, die einen *score* in einem vergleichbaren Bereich besitzen (siehe Tabelle 2).

Der Rest der möglichen Gag-Peptide besitzt einen *cutoff score* von < 1, damit ist die Beladung auf den H2-K<sup>d</sup> MHC-I Komplex und die Präsentation dieser Peptide äußerst unwahrscheinlich.

H2 <sup>d</sup> Klasse I	Epitop	Sequenz	Position im Protein	score	
H2-K <sup>d</sup>	Pol 2	YYDPSKDL <b>I</b>	1139	28	
	Pol 1	LVGPTPV <b>I</b>	628	14	
	Gag		AMQILKDT <b>I</b>	194	14
			L <b>K</b> DTINEEA	198	10
			KDTINEEA <b>A</b>	199	8
			ILKDTINE <b>E</b>	197	6
			AAMQILKDT <b>T</b>	193	2
			MQILKDT <b>I</b> N	195	2
			QILKDTINE <b>E</b>	196	2
H2-L <sup>d</sup>	Pol 2	YYDPSKDL <b>I</b>	1139	10	
	Pol 1	LVGPTPV <b>I</b>	628	13	
	Gag		AMQILKDT <b>I</b>	194	8
			L <b>K</b> DTINEEA	198	2
			KDTINEEA <b>A</b>	199	2
			MQILKDT <b>I</b> N	195	2
			QILKDTINE <b>E</b>	196	2
			AAMQILKDT <b>T</b>	193	1
			ILKDTINE <b>E</b>	197	0

**Tabelle 3:** Kurzfassung der SYFPEITHI Analyse (Berechnung für H2<sup>d</sup> Moleküle, Nonamere) für die in den IS1 – IS4 eingesetzten Gag- und Pol-Peptide. Die Analyse bezieht sich auf das Vorkommen von Aminosäuren, die für die Verankerung des Peptids auf dem MHC-I Komplex geeignet sind (fett gekennzeichnet). Je besser die Eignung der Aminosäure für die Verankerung desto höher ist der berechnete *score*. Die Peptide sind entsprechend ihres *score* geordnet. Eine Berechnung für H2-D<sup>d</sup> war laut Programm nicht möglich.

## Diskussion

---

In der SYFPEITHI Analyse (siehe Tabelle 3) wurden alle möglichen Peptide hinsichtlich Aminosäuren, die optimal für die Verankerung in der MHC-I Grube sind (fett gekennzeichnet), untersucht und anhand deren Vorkommen ein *score* errechnet. Je höher der *score*, desto besser ist das Peptid in der MHC-I Grube verankert. Der *score* konnte nur für die MHC-I Moleküle H2-K<sup>d</sup> und H2-L<sup>d</sup> berechnet werden, für H2-Dd war dies laut Programm nicht möglich.

Auch hier schnitt das Pol2-Peptid für H2-K<sup>d</sup> am besten ab. Das Pol1-Peptid und ein mögliches Gag-Peptid (194-202), das in der HLA *Peptide Binding Predictions* Analyse ebenfalls als Zielepitop errechnet wurde, besaßen für H2-K<sup>d</sup> den gleichen *score* von 14. Die anderen möglichen Gag Peptide besaßen einen H2-K<sup>d</sup> *score* von  $\leq 10$ . Bei H2-L<sup>d</sup> waren die Unterschiede zwischen Pol2, Pol1 und dem (194-202) Gag-Peptid nicht so stark, demnach besitzen diese Peptide für diese MHC-I Moleküle in etwa die gleiche Affinität.

So lässt sich festhalten, dass das mögliche Gag-Peptid (194-202) weniger wahrscheinlich als das Pol2-Peptid aus dem Proteinkontext durch die Protease heraus prozessiert wird und zudem eine geringere Affinität zum H2-K<sup>d</sup> bzw. laut SYFPEITHI Programm eine vergleichbare Affinität zum H2-L<sup>d</sup> MHC-I Komplex besitzt. Im Vergleich zum Pol1-Peptid besitzen beide vergleichbare H2-K<sup>d</sup> Affinitäten, aber das Pol1-Peptid wird mit größerer Wahrscheinlichkeit gebildet. Das Gag-Peptid mit der größten Prozessierungswahrscheinlichkeit besitzt laut SYFPEITHI Analyse eine geringere H2-K<sup>d</sup> MHC-I Affinität. Laut dieser Berechnungen spielen beide Hypothesen, also die Affinitäts- und die Prozessierungshypothese, eine Rolle. Demnach wird weniger Gag-Peptid gebildet und im Falle der Gag-Peptide mit den höchsten Prozessierungswahrscheinlichkeiten zudem geringere Affinitäten zum H2-K<sup>d</sup> MHC-I Komplex aufweisen. Dies könnte wie oben postuliert durch eine erhöhte Pr55<sup>Gag</sup> Expression ausgeglichen werden.

Jedoch widersprechen die Ergebnisse aus Kapitel 2.1.2 dieser These. So wurden durch Immunisierung einer äquimolaren (1:1) Mischung der Pr55<sup>Gag</sup> und PolNef Vektoren sowohl starke Gag als auch Pol Antworten induziert. Obwohl das Pr55<sup>Gag</sup> Konstrukt in diesem Fall myristyliert und somit in den Zellen anders lokalisiert war und somit räumlich getrennt von PolNef prozessiert wurde, müsste es dennoch zu einer „Verdrängung“ zugunsten der Pol-Peptide kommen. Da aber laut den Ergebnissen aus Kapitel 1.1., 1.2. und 1.4. Pr55<sup>Gag</sup> in Zellen stärker exprimiert wird als PolNef, würde dies wieder für die Affinitäts- und Prozessierungshypothese

sprechen. Zudem könnte der Effekt der *cross-presentation* bei der Induktion der Gag spezifischen Antworten eine nicht unbedeutende Rolle spielen.

Dennoch müssen die berechneten Gag Prozessierungs- und Präsentationswahrscheinlichkeiten noch experimentell nachgewiesen werden, um eine eindeutige Aussage treffen zu können.

### **2.1.2. Verbesserte immunologische Eigenschaften der myristylierten GagPolNef Konstrukte**

Bei den Immunisierungsstudien war zu beobachten, dass eine Myristylierung des Pr55<sup>gag</sup> die Gag- wie auch die Pol-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell Antworten um den Faktor 1,8 – 3,5 verstärkte. In Kapitel 1.2 des Ergebnisteils konnte gezeigt werden, dass sowohl das myristylierte *frame shift* Konstrukt als auch das Durchlesekonstrukt, wenn auch in geringerem Umfang, von den Zellen als VLP abgegeben werden. Diese Partikel können dann von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APZ) aufgenommen und das Polyprotein über den MHC-I Weg prozessiert und präsentiert werden. Dieser Vorgang wird als sogenannte *cross-presentation* bezeichnet, da hier exogene Proteine in den MHC-I und nicht nur in den MHC-II Weg eingeschleust werden <sup>288</sup>. Im Falle von Membranvesikeln sogenannten Exosomen, die Tumorzellen abgegeben wurden, konnte gezeigt werden, dass durch diese Tumorantigene an dendritische Zellen (DC) für die *cross-presentation* transferiert wurden <sup>289</sup>. Für professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APZ), zu denen die DC gehören, konnte zudem gezeigt werden, dass eine große Anzahl an exogenen Antigenen unterschiedlicher Herkunft (Apoptotische Zellen, Bakterien, inaktivierte Viren, Antigene, die assoziiert mit bzw. inkorporiert in Virosomen, Liposomen, VLP, etc.) über *cross-presentation* durch alternative Antigenprozessierungswege auf MHC-I Komplexen präsentieren können <sup>290, 291, 292</sup>.

Demnach können Partikel von den, durch die i.m. Immunisierung transfizierten, Muskelzellen abgegeben und von APZ aufgenommen werden. Dadurch können mehr Zellen mit den Immunogenen erreicht werden und die zelluläre Immunantwort wird signifikant verstärkt.

### **2.1.3. Verbesserte Eigenschaften hinsichtlich der Gag- und PolNef-spezifischen Immunantworten durch Entkopplung des Gag vom PolNef Leserahmens**

In den vorherigen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass im Kontext des GagPolNef Konstrukts sich die Gag-spezifischen Antworten verbessern, je besser die Gag Expression war. Die Antworten wurden zusätzlich noch verstärkt, wenn das Pr55<sup>gag</sup> myristyliert war und somit die *cross-presentation* ermöglichte. In der Immunisierungsstudie IS2B (Kapitel 2.1.3.) konnte gezeigt werden, dass durch Entkopplung der Gag und PolNef Expression, d.h. Gag und PolNef sind auf unterschiedlichen Plasmiden kodiert sind, die stärksten spezifischen Antworten induziert wurden. Dies gilt insbesondere wenn beide Plasmide äquimolar verabreicht wurden. Auffallend war zudem, dass die Pol-spezifischen Antworten bei der 1:1 Mischung der Konstrukte etwas stärker waren als bei einer Einzelimmunisierung mit PolNef und die Gag spezifischen Antworten etwas schwächer ausfielen als bei der Einzelimmunisierung mit Pr55<sup>gag</sup>. Auch in Immunisierungsstudie 3 (IS3) fielen die Antworten bei den Koimmunisierung etwas stärker aus, als bei den Einzelimmunisierungen. Ein applikationsbedingter Effekt konnte somit ausgeschlossen werden. Bei einem äquimolaren Mischungsverhältnis begünstigt Pr55<sup>gag</sup> begünstigt anscheinend die Pol spezifischen Antworten. Ein Ratio von 95:5 hingegen hat keinen positiven Einfluss. Eventuell wird PolNef, wenn es in ausreichender Menge im Zytoplasma vorliegt, mit in die Partikel verpackt. Denn die darin enthaltene inaktive Protease kann noch an Pr55<sup>gag</sup>, ihrem Substrat, binden und eventuell reicht diese Bindung aus, um PolNef zu inkorporieren. Möglich wäre auch, dass durch die Partikelbildung vermehrt T-Zellen in das betreffende Gewebe rekrutiert werden, dadurch dass APZ stärker durch die VLP aktiviert werden und in diesem Milieu die PolNef präsentierenden Zellen verstärkt mit angeregt werden. Damit steigt die Wahrscheinlichkeit, dass mehr Pol spezifische T-Zellen in das Gewebe einwandern und diese auch effizient aktiviert werden.

### **2.2. Immunologische Eigenschaften einer multivalenten Gag, PolNef und Env gp120 DNA Vakzine**

#### **2.2.1. Einfluss von Env gp120 bei Koimmunisierung mit Gag und PolNef oder mit GagPolNef auf die Gag- und Pol-spezifischen Immunantworten**

Wie in den klinischen Studien<sup>121, 248, 249</sup> zeigten in dieser Immunisierungsstudie die Mäuse starke Env spezifische T-Zell Antworten, die aber die Gag- und Pol-spezifischen bei der Koimmunisierung negativ beeinflussen. Inwiefern die Env spezifischen Antworten die Pol und Gag spezifischen beeinflussen, darüber lässt sich keine definitive Aussage treffen. Der größte Unterschied zwischen den Proteinen dürfte in der Glykosylierung liegen, so sind Gag und PolNef nicht glykosyliert, Env gp120 hingegen stark. Zudem wird ist gp120 von den Zellen sezerniert<sup>293</sup> und muss nicht wie Pr55<sup>gag</sup> zuerst oligomerisieren, um von den Zellen freigesetzt werden zu können bzw. PolNef wird nur im GagPolNef Kontext von den Zellen abgegeben. Demnach müsste mehr gp120 als Pr55<sup>gag</sup> extrazellulär vorliegen. Die Glykosylierung könnte auch die Immunogenität des gp120 steigern, indem es eine Aufnahme durch APZ über den Makrophagen Mannoserezeptor oder das *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin* (DC-SIGN) ermöglicht<sup>294, 295</sup>. Über diese Art der Aufnahme kann dann das gp120 in den *cross-presentation* Weg eingeschleust werden<sup>296</sup> und somit eine CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort induzieren. Die größere Verfügbarkeit und die bessere Aufnahme des gp120 gegenüber den beiden anderen Immunogenen würde eine stärkere spezifische Immunantwort erklären. Durch die schnellere Rekrutierung und Aktivierung von gp120 spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen würden dann durch diese die transfizierten, also die Antigen produzierenden, Zellen lysiert werden. Bei der Applikation der Immunogene als Gemisch, würden somit auch die Gag und PolNef produzierenden Zellen vernichtet werden. Wären Gag und PolNef aus den oben genannten Argumenten im Vergleich zu gp120 immunologisch schwächere Immunogene, würde mit fortschreitender Vernichtung dieser Zellen immer weniger von diesen Immunogenen produziert. Damit würde zu wenig Antigen für die Ausbildung einer starken spezifischen Antwort zur Verfügung stehen, es bliebe bei einer schwachen Immunreaktion.

## Diskussion

Eine andere These wäre wie die in Kapitel 2.1.1. diskutierte Hypothese, dass in diesem Falle des verwendeten Env Peptids eine höhere Wahrscheinlichkeit besteht, dass dieses von der Protease heraus prozessiert wird und zudem eventuell eine höhere Affinität zum MHC-I Komplex als die anderen Peptide hat.

Aus diesem Grunde wurden die in Kapitel 2.1.1. durchgeführten mathematischen Analysen wiederholt. Für die Analyse wurde nur das Gag Epitop miteinbezogen, das den höchsten *score* erzielte.

Position	Aminosäure	Wahrscheinlichkeit der Prozessierung an der jeweiligen Position	Entstehendes Epitop	Epitop
193 202	A I	0.169187 0.132748	A AMQILKDTI	Gag
627 637	V I	0.654614 0.751185	V LVGPTPVNI	Pol 1
1139 1147	V I	0.974759 0.620243	V YYDPSKDLI	Pol 2
66 74	P M	0.970392 0.890108	V PADPNPQEM	Env

**Tabelle 4:** Kurzfassung der NetChop 3.0 Analyse der Prozessierung von GagPolNef und Env gp140 durch das Proteasom. Das Programm berechnete die Wahrscheinlichkeiten, dass die in den Immunisierungsstudien IS3 – IS6 verwendeten Gag-, Pol- und Env-Peptide herausprozessiert werden. (Einstellungen: C-term 3.0, Threshold 0.5; Prozessierung durch die Protease ist durch „|“ gekennzeichnet)

Von allen analysierten Peptiden schnitt hier das Env am besten ab, d.h. es besitzt die größte Wahrscheinlichkeit aus dem Proteinkontext herausprozessiert zu werden (siehe Tabelle 4). Demnach müsste in der Zelle mehr von dem Env Peptiden als von den anderen vorliegen.

Daraufhin wurden noch Analysen mit dem HLA *Peptide Binding Predictions* und dem SYFPEITHI Programm durchgeführt, um die Dissoziationshalbwertszeit und die Affinität des Env Epitops zu berechnen.

## Diskussion

H2 <sup>d</sup> Klasse I	Epitop	Sequenz	Position im Protein	score	Rang
H2-K <sup>d</sup>	Pol 2	YYDPSKDLI	1139	3456,00	2
	Gag	AMQILKDTI	194	69,12	58
	Pol 1	LVGPTPVNI	628	57,60	86
	Env	PADPNPQEM	66	<1	>621
H2-D <sup>d</sup>	Pol 2	YYDPSKDLI	1139	<1	>207
	Gag	AMQILKDTI	194	<1	>207
	Pol 1	LVGPTPVNI	628	<1	>207
	Env	PADPNPQEM	66	<1	>69
H2-L <sup>d</sup>	Gag	AMQILKDTI	194	1,5	335
	Pol 1	LVGPTPVNI	628	1,2	379
	Pol 2	YYDPSKDLI	1139	<1	>537
	Env	PADPNPQEM	66	<1	>233

**Tabelle 5:** Ergebnis der HLA Peptide Binding Predictions Analyse für H2<sup>d</sup> Moleküle ( $T(1/2) \geq 1$  (Kurzfassung)) für die Halbwertszeit der MHC-I Dissoziation der in den IS3 – IS6 verwendeten Env-, Pol- und Gag-Peptide. Die Peptide sind entsprechend ihres *score*, also entsprechend ihrer Affinität zum MHC-I Komplex geordnet.

Entsprechend diesen Berechnungen (siehe Tabelle 5) dissoziiert das Env Peptid sehr schnell wieder von allen getesteten MHC-I Komplexen ab. Demnach wäre es für eine Induzierung einer spezifischen Immunantwort ungeeignet.

H2 <sup>d</sup> Klasse I	Epitop	Sequenz	Position im Protein	score
H2-K <sup>d</sup>	Pol2	YYDPSKDLI	1139	28
	Pol1	LVGPTPVNI	628	14
	Gag	AMQILKDTI	194	14
	Env	PADPNPQEM	66	5
H2-L <sup>d</sup>	Pol2	YYDPSKDLI	1139	10
	Pol1	LVGPTPVNI	628	13
	Gag	AMQILKDTI	194	8
	Env	PADPNPQEM	66	9

**Tabelle 6:** Kurzfassung der SYFPEITHI Analyse (Berechnung für H2<sup>d</sup> Moleküle, Nonamere) für die in den IS3 – IS6 eingesetzten Env-, Gag- und Pol-Peptide. Je besser die Eignung der Aminosäure (fett gekennzeichnet) für die MHC-I Verankerung desto höher ist der berechnete *score*. Die Peptide sind entsprechend ihres *score* geordnet. Eine Berechnung für H2-D<sup>d</sup> war laut Programm nicht möglich.

Auch in dieser Analyse erhielt das Env Peptid für H2-K<sup>d</sup> nur einen geringen *score* (siehe Tabelle 6), d.h. die Verankerung des Epitop auf diesem MHC-I Komplex ist laut Programm relativ schwach ausgeprägt. Für H2-L<sup>d</sup> hingegen war der *score*

vergleichbar mit den anderen Peptiden, demnach müssten alle getesteten Peptide in etwa die gleiche Affinität zum H2-L<sup>d</sup> Molekül besitzen.

Die Analysen ergaben, dass das Env Peptid mit hoher Wahrscheinlichkeit aus dem Proteinkontext prozessiert wird und zudem, laut SYFPEITHI Programm, eine vergleichbare Affinität zum H2-L<sup>d</sup> MHC-I Komplex besitzt. Ob dies nun ausreicht um die Präsentation der anderen Peptide zu behindern, muss experimentell geklärt werden.

Literaturrecherchen sprechen mehr für die Hypothese der immunologischen Konkurrenz, denn dieses Phänomen wurde bereits von einer anderen Gruppe beschrieben<sup>297</sup>, die diesen Effekt nicht nur bei den zellulären Immunantworten sondern auch auf humoraler Ebene messen konnten. Toapanta *et al.* konnten eine Plasmidinterferenz, die während Kotransfektionen auftreten kann<sup>298</sup>, und eine verstärkte Apoptose der Produzentenzellen, ausgelöst durch Env gp120 ausschließen<sup>297</sup>. Sie führten die beobachtete Suppression der Gag Antworten auf einen noch unbekanntem immunologischen Mechanismus zurück. Zudem scheint dieses Phänomen auf HIV-1 Pr55<sup>gag</sup>/Env gp120 Koimmunisierungen beschränkt zu sein. Demzufolge könnte schon bei der ersten Immunisierung ein Ungleichgewicht der spezifischen Lymphozyten entstehen, d.h. weniger Gag- als Env-spezifische. Durch diese geringere Ausgangspopulation an Lymphozyten sinkt auch die Effizienz diese mit jeder weiteren Immunisierung zu expandieren, was letztendlich zu einer verringerten Immunantwort führt. Dies ist gut vereinbar mit der oben angeführten Hypothese, in der die schneller ausgebildete Env Antwort die anderen Antworten unterdrückt, indem diese die Env, Gag und Pol exprimierenden Zellen vernichtet, bevor genügend Gag bzw. Pol spezifische T-Zellen aktiviert würden. Somit käme es zu dem bei Toapanta *et al.* ausgeführten Ungleichgewicht in der spezifischen T-Zell Ausgangspopulation<sup>297</sup>.

### **2.2.2. Einfluss verschiedener Mengen an Env gp120 bei Koimmunisierung mit Gag und PolNef (IS4A) auf die Gag- und Pol-spezifischen Immunantworten**

Durch die Änderung des Mischungsverhältnisses zugunsten Gag und PolNef konnte in der Tat die Gag bzw. PolNef spezifischen Antworten verbessert werden. Insbesondere die Pol spezifischen Antworten scheinen von dem veränderten Ratio zu profitieren. So konnten die Pol spezifischen Antworten bei einem Ratio 1:1:0,25 im

Vergleich zu 1:1:1 wieder um 50% gesteigert werden. Da hier weniger Env Plasmid für die Immunisierung eingesetzt wurde, sank auch die Wahrscheinlichkeit, dass Zellen alle drei Plasmide gleichzeitig aufnehmen. Damit würden, wie oben postuliert, auch weniger Zellen, die Pol und/oder Gag Epitope präsentieren, vorzeitig durch das Immunsystem vernichtet werden. Zudem würde durch die geringere Env Expression die Ausbildung der Immunantwort verzögert, d.h. es könnte in der Zeit auch genügend Gag und Pol für eine starke Immunantwort exprimiert werden. Das Ungleichgewicht in der Ausgangspopulation der spezifischen Lymphozyten wäre weniger stark ausgeprägt und die Effizienz nachfolgender Immunisierungen zur Expansion dieser Lymphozyten wäre weniger oder nicht eingeschränkt.

### **2.2.3. Einfluss von Env gp120 bei räumlich getrennter Koimmunisierung mit Gag und PolNef (IS4B) auf die Gag- und Pol-spezifischen Immunantworten**

Die Ergebnisse dieses Versuchs (IS4B) sprechen für die These, dass eine zu frühe und zu starke Env-spezifische Immunantwort Env, Gag und Pol exprimierende Zellen vernichtet, bevor diese genügend Gag und Pol Antigen für die Induktion einer starken Immunantwort produzieren. Die räumlich getrennt immunisierten Mäuse zeigten auch bei einem 1:1:1 Ratio keine negative Beeinflussung der Gag und Pol Antworten seitens Env. So konnte ungehindert eine jeweils ausreichend große Population an spezifischen T-Zellen rekrutiert werden, um eine starke Immunantwort auszubilden. Dass eine räumliche Trennung der Immunogene die Immunantworten gegen Gag bzw. Pol wieder verbesserte, konnten bereits Toapanta *et al.* im Falle der Gag-spezifischen Antworten zeigen<sup>297</sup>. Demnach ist für weitere Immunisierungen mit Env also festzuhalten, entweder weniger Env einzusetzen oder besser noch Env räumlich getrennt von den anderen Immunogenen zu applizieren.

## **3. CD40L als molekulares Adjuvans**

### **3.1. Charakterisierung der generierten CD40L Varianten**

Die Expression aller generierter MegaCD40L Varianten sowie der wildtyp CD40L konnte erfolgreich in einem spezifischen *Sandwich*ELISA nachgewiesen werden. MegaCD40L wurde wie erwartet auch von den Zellen in den Überstand abgegeben. Trotz des murinen Ursprungs des wtCD40L, wurde dieses von den humanen 293T

## Diskussion

---

Zellen abgespalten. Wie in der Literatur <sup>272</sup> beschrieben, beruht dies auf einer Prozessierung durch eine ADAM Protease. Die wtCD40L $\Delta$ CL Variante, die auf der Publikation von Pietravalle <sup>273</sup> beruht, war weder im ELISA noch in der Durchflusszytometrie detektierbar. Ob durch die Deletion der Proteaseschnittstelle ein Epitop der verwendeten Antikörper oder die Struktur des Proteins zerstört wurde, konnte nicht analysiert werden, da die genauen Epitope der Antikörper nicht in Erfahrung zu bringen waren. Die Antikörper scheinen aber ein konformationelles Epitop zu erkennen, denn sie funktionieren nur mit dem nativen Protein und nicht im Westernblot. Wahrscheinlich ist die murine wtCD40L $\Delta$ CL Variante missgefaltet und lässt sich daher nicht detektieren. Zudem ergaben Recherchen, dass eine Deletion in diesem Bereich den murinen CD40L in seiner Funktion inhibierte <sup>299</sup>. Somit schied diese Variante für die weiteren Analysen aus.

Interessant war auch, dass durch das Anfügen des wtCD40L Signalpeptids die membranständige Variante des MegaCD40L auf der Oberfläche der transfizierten Zellen präsent ist, hingegen mit dem ursprünglichen Hämagglutinsignalpeptid konnte kein CD40L auf der Oberfläche der Zellen nachgewiesen werden, obwohl beide Varianten in den Zelllysaten detektiert werden konnten. Anscheinend wird die MegaCD40L-MB1 Variante durch das HA Signal in der Zelle so fehlgeleitet, dass sie nicht mehr die Oberfläche erreicht. Somit wurde auch diese Variante von weiteren Versuchen ausgeschlossen.

Dies konnte dann auch bei der Analyse des Saccharosegradienten gezeigt werden, hier waren nur die Varianten wtCD40L und MegaCD40L-MB2 detektierbar. Auffallend war, dass von MegaCD40L-MB2 sehr viel weniger auf der Oberfläche der VLP nachweisbar war, dies konnte zudem in späteren *Sandwich*ELISAs bestätigt werden. So war in etwa 7-10 Mal mehr wtCD40L auf den VLP als MegaCD40L-MB2. Interessanterweise war ca. 2-3 Mal mehr MegaCD40L-MB2 auf den Partikeln, wenn diese zugleich 97CN54 gp145 auf ihrer Oberfläche trugen. Dieser Effekt war überraschend, da die CD40L Verpackung auf die Virionen Env unabhängig ist <sup>300</sup>. Da MegaCD40L-MB2 aufgrund der ACRP-30 Domäne <sup>229</sup> fähig ist sich zu Di-Trimeren zu organisieren, besitzt diese Variante wahrscheinlich einen höheren räumlichen Anspruch als die wtCD40L Variante, die nur Trimere ausbildet. Dennoch waren die Mengen ausreichend für die Aktivierung von B-Zellen, wie im nächsten Kapitel ausgeführt wird.

### **3.2. Molekulare Eigenschaften der CD40L pseudotypisierten virus-ähnlicher Partikel**

Nachdem die mit CD40L Varianten pseudotypisierten VLP biochemisch charakterisiert wurden, sollte nun die biologische Aktivität analysiert werden. Das B-Zell Aktivierungsexperiment wurde anhand mehrerer Publikationen<sup>276, 277, 278, 279</sup> erstellt, um ein möglichst breites Spektrum an Methoden anzuwenden und somit sicher die Funktionalität der Varianten bestimmen zu können. In der Tat waren beide CD40L Varianten in der Lage die B-Zellen zu Aktivieren, zur Proliferation und zur Immunglobulinsekretion anzuregen. Trotz der geringen Mengen an CD40L in den VLP Präparationen waren diese ausreichend um die B-Lymphozyten zu aktivieren und zur Proliferation zu stimulieren. Die MegaCD40L-MB2 Variante schnitt zwar bei einigen Parametern (Hochregulation von CD86 und CD69, Immunglobulinsekretion) etwas schlechter ab als die wtCD40L Version, war aber bei Verdopplung der VLP Menge und damit der CD40L Menge in etwa genauso stimulatorisch (Daten nicht aufgeführt).

### **3.3. Adjuvanseigenschaften der membrangebundenen CD40L Varianten bei VLP basierter Vakzine**

Nachdem erfolgreich die Funktionalität des MegaCD40L-MB2 gezeigt werden konnte, sollten die Adjuvanseigenschaften im Vergleich zu wtCD40L untersucht werden. Leider ließen sich keine signifikant gesteigerten Immunantworten weder durch Pseudotypisierung mit wtCD40L noch durch MegaCD40L-MB2 messen. Allein bei der FACS Analyse der Env spezifischen CD8<sup>+</sup> Zellen ließ sich eine leicht gesteigerte Immunantwort bei der MegaCD40L-MB2/gp145/97CN001 Gag Gruppe messen. Auch eine Beimischung des rekombinant hergestellten MegaCD40L zeigte nur leicht verbesserte Antworten. Auffallend war, dass eine Pseudotypisierung mit Env gp145 vor allem die zellulären Immunantworten bei den einzelpseudotypisierten VLP am besten verstärkte. Dies könnte, wie in Kapitel 2.2.1. der Diskussion erörtert, an einer verbesserten Aufnahme der Partikel über den Mannoserezeptor liegen. Wahrscheinlich war die Menge an CD40L auf den VLP zu gering ( $\leq 0,1\%$  der Gesamtmenge, demnach etwa 1-2 CD40L Moleküle pro VLP) um noch kostimulatorisch zu wirken. Im Falle der Analyse der Zytokinsekretion waren die teils starken unspezifischen Reaktionen der mit Medium restimulierten Kontrollgruppen auffallend. Dies könnte darin begründet sein, dass die VLP Präparationen bis zu 20%

FKS enthielten, die Menge an Env gp145 lag hingegen in einem Bereich von 0,1%. Da aber das Medium bei der Restimulation ebenfalls zu 5% FKS enthielt könnten durch die Immunisierung induzierte FKS spezifische Immunantworten bei der Restimulation reagieren. Für weitere Immunisierungsstudien wären dann FKS frei produzierte VLP von Relevanz, um diesen Effekt ausschließen zu können. Dennoch sollte es möglich sein VLP mit CD40L zu adjuvieren, da Lin *et al.*<sup>301</sup> dies mit SI Virionen erfolgreich zeigen konnten. Ob sich nun die Adjuvaneigenschaften des CD40L durch die membrangebundene Version des MegaCD40L noch weiter steigern lassen, muss in weiteren Experimenten mit unterschiedlichen Immunisierungsansätzen und -strategien geklärt werden. Vor allem wäre interessant, wie stark adjuvierend MegaCD40L-MB2 wirkt, wenn dieser als DNA-Vektor im Rahmen einer DNA Immunisierungsstudie verabreicht wird.

### **3.4. Adjuvaneigenschaften von MegaCD40L bei Koapplikation mit Gag und Env gp145 als DNA Vakzine**

In der DNA basierten Impfstudie IS6 konnte gezeigt werden, dass die Stärke Env-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell- und humoralen Immunantworten mit der Menge an koverabreichtem MegaCD40L korrelierte. Was im Einklang mit der Publikation von Stone *et al.*<sup>229</sup> steht. Interessanterweise verschlechterten sich parallel dazu die Gag-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten, die humoralen, Gag-spezifischen Antworten hingegen blieben unbeeinflusst. Dieses Phänomen könnte durch die unterschiedlich starke und schnelle Induktion von T-Zellen erklärt werden (siehe Kapitel 2.2.3.)<sup>297</sup>. Demnach wirkt sich eine Koapplikation von Gag- und Env-Plasmid DNA in hohen Mengen negativ auf die Induktion von Gag-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten aus. Bei niedrigen Mengen an verabreichter Plasmid DNA scheint dieser Effekt nicht aufzutreten. Koverabreicht man nun eine große Menge an Adjuvansvektor tritt dieser wieder auf. Für Env scheinen spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen schneller rekrutiert und induziert zu werden als für Gag. Bei geringen Mengen an Env kann offensichtlich kein so hohes Ungleichgewicht in den Ausgangspopulationen der spezifischen Lymphozyten entstehen, so dass die Expansion der Gag-spezifischen T-Zellen nicht beeinträchtigt ist. Dies kann durch die Zugabe des Adjuvans MegaCD40L überwunden werden und für das immunologisch stärkere Immunogen, also Env, entsteht nun eine größere Ausgangspopulation an T-Lymphozyten und es kommt wieder zu dem oben beschriebenen Ungleichgewicht. Dies scheint aber nur bei der

Gabe von hohen Mengen des Adjuvans aufzutreten. Durch die Titration des MegaCD40L konnte zudem festgestellt werden, dass bei einem Verhältnis von Adjuvans zu Immunogemisch von 1:5 die Gag-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten nicht so stark wegbrechen wie bei den anderen Mischratios und dennoch die Env-spezifischen Antworten verstärkt werden. Auch auf humoraler Ebene war diese Menge noch ausreichend, um die Env-spezifische Antwort zu verstärken.

### **4. Ausblick**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das ursprüngliche 97CN54 GagPolNef Konstrukt hinsichtlich der Pr55<sup>gag</sup> Expression, Partikelfreisetzung und immunologischer Eigenschaften verbessert werden konnte. Zudem konnten Impfstrategien entwickelt werden, wenn dieses GagPolNef Konstrukt und dessen Derivate in Kombination mit Env gp120 verabreicht wird.

Desweiteren wurde im Rahmen der Arbeit auch eine neue Variante des MegaCD40L, die auf VLP verpackt werden kann und B-Lymphozyten aktiviert und deren Proliferation induziert.

#### **4.1. Einfluss der aktiven Protease des 97CN001 GagPolNef (Myr+, FS, P+) Konstrukts auf die immunologischen Eigenschaften**

Das ebenfalls neu generierte 97CN001 GagPolNef (Myr+, FS, P+) Konstrukt konnte bis jetzt noch nicht auf seine immunologischen Eigenschaften getestet werden. So muss noch abgeklärt werden, inwiefern die Prozessierung des Polyproteins durch die virale Protease die Gag- und Pol-spezifischen CD8<sup>+</sup> Antworten beeinflusst.

#### **4.2. Immunogenität der generierten GagPolNef Konstrukte im Kontext einer auf rekombinanten Vaccinaviren basierenden Vakzine**

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten GagPolNef Konstrukte wurden bereits in Transfervektoren kloniert, um rekombinante Vaccinaviren herzustellen. Zum Teil konnten diese schon hergestellt werden und sollen im Rahmen des *Pox Virus T-Cell Vaccine Discovery Consortium* (PTVDC) Projekts der Gates Stiftung zuerst im Tiermodell und die erfolgreichsten Konstrukte in klinischen Studien auf ihre immunologischen Eigenschaften untersucht werden.

### **4.3. Immunologische Eigenschaften von 97CN001 GagPolNef VLP**

Bis jetzt konnten auch noch nicht 97CN001 GagPolNef basierte VLP immunologisch analysiert werden. Die Herstellung solcher Partikel konnte im ersten Kapitel des Ergebnisteils gezeigt werden. Wie sich diese Partikel immunologisch im Vergleich zu den Konstrukten in den DNA Immunisierungsstudien verhalten, wurde noch nicht genauer untersucht. Eventuell kann man durch solche VLP oder durch die Kombination der VLP mit DNA basierten Impfstoffen noch eine weitere Verbesserung der Gag- und Pol-spezifischen Immunantworten erreichen. Interessant wäre auch eine Immunisierung einer Kombination der VLP mit Env gp120 Plasmid-DNA, vielleicht könnte dadurch die immunologische Konkurrenz von Gag und Env umgangen werden.

### **4.4. Eignung des membrangebundenen MegaCD40L als molekulares Adjuvans**

Die stimulatorischen Eigenschaften des MegaCD40L-MB auf B-Lymphozyten konnten im Verlauf dieser Arbeit gezeigt werden. In der Immunisierungsstudie mit VLP konnte jedoch kein Adjuvanseffekt gemessen werden. Daher wäre in einer auf Plasmid-DNA bestehenden Studie interessant wie sich der membranständige MegaCD40L zu der sezernierten Variante verhält und ob auch hier Adjuvanseigenschaften gemessen werden können. Auch eine Wiederholung der VLP basierenden Studie wäre interessant, da nun ein neues Expressionssystem zur Verfügung steht, mit dem man VLP FKS frei in einer humanen Zelllinie produzieren kann. FKS in den VLP Präparationen der Immunisierungsstudie 5 könnte einen negativen Einfluss auf die Induktion der spezifischen Immunantworten ausgeübt haben. Hier besteht noch Bedarf für weitere Experimente. Zudem wurden im Verlauf der Arbeit die humanen Pendanten zu den murinen CD40L Varianten generiert, auf Grund der artspezifischen Unterschiede, könnten eventuell ein oder zwei Konstrukte besser als die jeweilige murine Variante funktionieren.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass sowohl die generierten GagPolNef Konstrukte als auch die CD40L Varianten noch großes Potential bergen, die Immunogenität von möglichen HIV-1 Impfstoffen noch weiter zu verbessern und daher weiter Gegenstand intensiver Forschung sein sollte.

### Zusammenfassung

Als Ausgangspunkt dieser Arbeit dienten die klinischen Studien EuroVacc01 und 02<sup>121, 248, 249</sup>, bei denen gezeigt werden konnte, dass das getestete 97CN54 GagPolNef Konstrukt in Kombination mit 97CN54 Env gp120 zwar gute Env-spezifische, aber nur in geringerem Umfang Gag-, Pol- und Nef-spezifische polyfunktionelle Antworten auf T-Zellebene induzierte. So waren die Studien hinsichtlich der Induktion Env-spezifischer Immunantworten ein Erfolg, hinsichtlich Gag-Pol-Nef wäre ein balancierteres Verhältnis der T-Zellantworten wünschenswerter gewesen. Für eine HIV-1 Vakzine sind gerade starke Gag-spezifische T-Zellantworten von Interesse, da diese wichtig für die Kontrolle der HI-viralen Virämie sind.

In dieser Arbeit sollte das GagPolNef Konstrukt weiterentwickelt werden, um vor allem die in den Studien beobachteten schwachen Gag-spezifischen T-Zellantworten zu verstärken, ohne dadurch die Env-spezifischen Immunantworten zu beeinträchtigen. Die Modifikationen des Ausgangskonstrukts sollten i) die Wiederherstellung des Myristylierungssignals, ii) des viralen, ribosomalen Leserastersprungs und iii) der Aktivität der viralen Protease umfassen, um eine Partikelfreisetzung und eine Prozessierung des GagPolNef-Polyproteins zu ermöglichen. Durch die verstärkte Freisetzung von virus-ähnlichen GagPolNef Partikeln sollte vor allem über *cross-presentation* die Immunogenität des Konstrukts gesteigert werden.

Während der Herstellung des modifizierten Konstrukts wurde festgestellt, dass das 97CN54 Pr55<sup>gag</sup> nicht in der Lage war, virus-ähnliche Partikel zu bilden. Nach einem Aminosäuresequenzabgleich mit dem Pr55<sup>gag</sup> des HIV-1 Stamms C 97CN001 Virus, welches derselben Patientenprobe entstammt wie 97CN54, wurden sieben Aminosäuresubstitutionen identifiziert, welche die Partikelbildung beeinträchtigen könnten. Aus diesem Grunde wurde das 97CN54 Gag im GagPolNef Konstrukt durch 97CN001 Gag ersetzt. Im Anschluss konnten die geplanten GagPolNef Konstrukte generiert werden, welche die gewünschten Eigenschaften einer verbesserten Partikelfreisetzung, eines Leserastersprungs und einer funktionellen viralen Protease aufwiesen.

In Immunisierungsstudien mit Balb/C Mäusen wurde dann gezeigt, dass durch die Resubstitution des Myristylierungssignals am N-Terminus des Polyproteins und das

## Zusammenfassung

---

Einfügen eines ribosomalen Leserastersprungs das GagPolNef Konstrukt in seinen immunologischen Eigenschaften deutlich verbessert ist. Aufgrund einer nichtbeschriebene Punktmutation in der viralen Protease, welche deren Funktion inhibierte, verzögerte sich die Herstellung des GagPolNef Konstrukts mit aktiver viraler Protease und konnte nicht mehr in Immunisierungsstudien getestet werden. Ein weiterer wesentlicher Aspekt dieser Arbeit war die Generierung eines kodonoptimiertes 97CN001 Gag und eines 97CN54 PolNef Konstrukts, mit denen sich bei Immunisierungen verschiedenste Kombinationen, wie unterschiedliche Mischungsverhältnisse oder räumlich bzw. zeitlich getrennte Vakzinierungen, analysieren ließen. Zudem konnten im Anschluss 97CN001 Gag basierte VLP zu produziert werden, was mit dem ursprünglichen 97CN54 Gag aufgrund der ungenügenden Partikelbildung nicht möglich war. Dies eröffnet neue Optionen für künftige Immunisierungsstudien.

Desweiteren konnten neue Impfstrategien für eine Koimmunisierung von 97CN001 Gag bzw. GagPolNef DNA mit 97CN54 Env gp120 DNA getestet werden, um eine beobachtete immunologische Konkurrenz von Gag- und Env-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten zu vermeiden. So ließen sich bei einer räumlichen Trennung der Env gp120 von der Gag/Pol Vakzinierung bzw. einer Reduktion der applizierten Menge an Env gp120 DNA deutlich bessere Gag-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten als bei einer äquimolaren Koapplikation induzieren.

Hinsichtlich der Entwicklung einer CD40L Variante als molekulares Adjuvans wurde erfolgreich eine membranständige Version des oligomeren MegaCD40L generiert. Diese Variante (MegaCD40L-MB) konnte auf der Oberfläche von VLP verankert werden und erwies sich in Aktivierungs- und Proliferationsexperimenten mit murinen B-Lymphozyten als fast ebenso so stimulatorisch wie wildtyp CD40L bzw. teilweise stimulatorischer als der lösliche, rekombinant hergestellte MegaCD40L. In einer ersten Immunisierungsstudie mit 97CN54 Env gp145 pseudotypisierten 97CN001Gag VLP wurden multivalente Immunantworten gegen Gag und Env untersucht. Jedoch konnten hier weder seitens wtCD40L noch seitens des MegaCD40L-MB deutliche Adjuvanseigenschaften bezüglich der Induktion spezifischer zellulärer und humoraler Immunantworten gemessen werden. Dies konnte auf die zu geringen Mengen an CD40L in den VLP Präparationen zurückgeführt werden.

## Zusammenfassung

---

In einer auf 97CN001Gag/CN54 Env gp145 Plasmid-DNA basierten Immunisierungstudie konnte ein positiver Einfluss des MegaCD40L auf die Induktion von Env-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell und humoralen Immunantworten gezeigt werden. So ließ sich beobachten, dass eine Adjuvierung mit MegaCD40L zwar die Env-spezifischen Antworten verstärkt, die Gag-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell Antworten hingegen abgeschwächt wurden. Dennoch konnten Strategien über die Dosierung des MegaCD40L erschlossen werden, um optimale Gag- und Env-spezifische Immunantworten induzieren zu können, ohne dass die oben erwähnte immunologische Konkurrenz in CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten auftritt.

In dieser Arbeit konnten also nicht nur verbesserte Immunogene und mögliche Kandidaten für molekulare Adjuvantien entwickelt werden, sondern auch verbesserte Strategien, diese im Rahmen von Immunisierungen applizieren zu können.

## Anhang

### Weitere verwendete Antikörper und Konjugate

Antikörper	Spezies	Spezifität	Konjugat	Firma
Goat Anti-IgG (H+L chain specific)	Ziege	Murine IgG (H+L Kette)	-	Southern-Biotech
Biotinylated Anti-mouse CD40 Ligand Antibody	Ziege	muriner CD40 Ligand (aa 61 – 260)	Biotin	R&D Systems
FITC anti-mouse CD69 (Klon H.2F3)	Armenian Hamster	CD69	FITC	eBioscience
Biotin-conjugated Hamster anti-mouse CD154 (CD40 Ligand) (Klon MR1)	Armenian Hamster	muriner CD40 Ligand	Biotin	BD Pharmingen™
Purified Hamster anti-mouse CD154 (CD40 Ligand) (Klon MR1)	Armenian Hamster	muriner CD40 Ligand	-	BD Pharmingen™
anti-HIV-1 Env	Maus	CN54/96ZM651 rgp140	-	Mark Hassal, NIBSC
anti-HIV-1 Reverse Transkriptase	Maus	CN54 Pol	-	Dr. D. Helland
anti-HIV-1 Gag (Klon CB-4/1)	Maus	HIV-1 Stamm C	-	Charité
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins HRP	Kaninchen	Murine Immunglobuline	HRP	Dako
Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-AP Conjugate	Ziege	Murine IgG (H+L Kette)	AP	Bio-Rad
Streptavidin-PE	-	Biotin	PE	BD Pharmingen™
anti-Maus CD45R/B220	Ratte	muriner CD45R/B220	PE	BD Pharmingen™
anti-Maus CD80-PE (Klon 16-10A1)	Armenian Hamster	muriner CD80	PE	BD Pharmingen™
anti-Maus CD86-PE (Klon GL1)	Ratte	muriner CD86	PE	BD Pharmingen™
anti-Maus I-Ad-PE (Klon AMS-32.1)	Maus	muriner MHC-II I-A <sup>d</sup> (Balb/C)	PE	BD Pharmingen™
Affinity Purified Mouse IgG2b Isotype Control	Maus	-	-	eBioscience

### Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz
97CN001Gag-SQP_402 fw	CCTGCAGGGCCAGATGGTGC
97CN001Gag-SQP_510 rv	GCTGAACATGGGGATCACCTC
97CN001Gag-SQP_901 fw	CTGCGGGCCGAGCAGGCCAC
97CN001Gag-SQP_1152 rv	GATCCTCTTGCTGCCCTTGAAG
97CN001Gag-SQP_926 fw	CGTGAAGAAGTGGATGACCGAC
GPN-SPQ_1481 fw	GCCAGGAATTCTTCAGGGAG
GPN-SPQ_1550 rv	GTCTGCTCGCTGCTGAACTC
GPN-SPQ_1861 fw	CACAAGGCCATCGGCACCG
GPN-SPQ_1940 rv	CAGCCCAGCTGGGTCAGCAG
GPN-SPQ_2381 fw	CAACGAGACCCCCGGCATCA
GPN-SPQ_2421 rv	CTGCCCTTCCAGCCCTGGGG
GPN-SPQ_2851 fw	CCCGCCGCCGACGGCGTGGG
GPN-SPQ_2900 rv	CCGTGCTTCTCCAGGTCCCT
GPN-SPQ_3281 fw	GCATCAAGGTGAGGCAGCTG
GPN-SPQ_3340 rv	CGATGTCGGTCAGGGCCTTG
GPN-SPQ_3840 rv	GGTCACGTAGCCGGCCTTGC

# Anhang

97CN001Gag-1-KpnI fw	GGTACCGCCACCATGGGCGCCAGGGCCAG
97CN001GagΔStop rv	GAATTCCTGGCTGCTGGGGTCGTTGCCGAAC
Protease Quickchange fw	GGTACCACCGGTTCTTCAAGACCC
Protease Quickchange rv	GAGTCCTCGAGGATGGGGATCTGCTCG
CN54 PolNef Primer fw	GGGGTACCGCCACCATGGAATTCTTACGGGAGAACCTGGCCCTGCCC
CN54 PolNef Primer rv	GGCTCGAGTCATTACTTGGTCTGTGCTGGC
Linker-muACRP 154-211 fw	GGTCTGGGGGGGAGGCAGCGAAGATGACGTTACTACAACTGAAGAGTAGCTCTGCG
mCD40L_TM-Li 114-173 fw	GGATCTGTGCTTTTTTGTGTGTATGGAAGCGCGGAGGGGGTCTGGGGGGGAGGCAGC
mCD40L_TM-Li 77-134 fw	GTATTTACTTACTGTTTTTCCTTATCACCCAAATGATTGGATCTGTGCTTTTTTGTGTG
HA-mCD40L_TM-Li 38-96 fw	CCTCCTGTTACACAGCTGTGCGGGGCATGAAGATTTTTATGTATTTACTTACTGTTTTCC
HA-mCD40L_TM-Li 1-60 fw	GGGGTACCACCGCCACCATGGCTATCATCTACCTCATCTCTGTTCACAGCTGTGCGGG
wtSig-mCD40L_TM-Li 44-108 fw	CAGAAGCGTGGCCACCGGCTGCCCGCTCTATGAAGATTTTTATGTATTTACTTACTGTTTTCC
wtSig-mCD40L_TM-Li 1-63 fw	GGGGTACCACCGCCACCATGATCGAGACCTACAGCCAGCCCAGCCCCAGAAGCGTGGCCACCGGCC
mACRP-SQP fw	GAAGATGACGTTACTACAAC
mACRP-SQP rv	AGCGGCTTCTCCAGGCTCTC
mCD40L-SQP fw	GGTGATGAGGATCTCAAATTG
mCD40L-SQP rv	GAGTTTGAGTAAGCCAAAAG

## Gensequenzen

### 97CN54 Gag (Myr+)

atggcgccaggccagcatcctgagggggcggcaagctggacaagtgggagaagatcaggetgagggccggcggcaagaagcactacatgctga  
agcacctggtgtgggcccagcaggagctggagaggttcgcccgaacccggcctgctggagaccagcgagggtgcaagcagatcatgaagca  
gctgcagagcgccctgcagaccggcaccgagggagctgaggagctgttcaacaccgtggccaccctactgctgcacaccgagatcgacgtg  
agggacaccaggaggccctggacaagatcgaggaggagcagaacaagatccagcagaagaccagcaggccaaggaggccgacggcaaggtga  
gccagaactaccctcgtgcagaacctgcagggccagatggtgcaccagccatcagccccaggaccctgaatgcatgggtgaaggtggtgga  
ggagaaggccttcagccccgaggtgatccccatgttcagcgccctgagcgaggggccaccctcaggacctgaaccacctgctgaaccctg  
ggcgccaccagggcccatgcagatcctgaaggacacctcaacgaggaggccgagctgggacaggtgcacccctgcacggcgcccca  
tcgccccggccagatgagggagcccaggggcagcagatcgccggcaccaccagcaacctgcaggagcagatcgccctggatgaccagcaacc  
accctgcccgtggcgacatctacaagaggtggatcatcctgggtttaaacaagatcgtgaggatgtacagccccaccagcatcctggacatc  
aagcaggggcccaaggagcccttcagggaactcgtggacaggttcttcaagaccctgagggccgagcaggccaccaggcgctgaagaactgga  
tgaccgacacctgctggtgcagaacgccaaccccagctgcaagacctcctgagggccctggccccggcgccagatcgaggagatgatgac  
cgctgcagggcgtggcgccggcagccagccacaaggccaaaggtgctggccgaggccatgagccagaccaacagcgccatcctgatgcagggagc  
aacttcaagggcagcaagaggatcgtgaagtgttcaactgcggcaaggaggccacatcgccaggaaactgcaggggccccagggaagaagggt  
gctggaagtgcggcaaggaggccaccagatgaaggatgcaccagagaggcaggccaaactcctgggcaagatctggcccagccacaaggcg  
ccccgcaactcctgcagaacaggcccgagccaccgccccggcggagagctcagggttcgaggaggagaccaccaccagccagaag  
caggagcccatcgacaaggagctgtaccctgaccagcctgaagagcctgttcggcaacgaccccagcagccagta

### 97CN001 Gag (Myr+)

atggcgccaggccagcatcctgagggggcggcaagctggacaagtgggagaagatccggctgcgccctggcggaagaacactacatgctga  
agcacctggtgtgggcccagcaggagctggagaggttcgcccgaacccggcctgctggagaccagcgagggtgcaagcagatcatgaagca  
gctgcagcctgcccgcagaccggcaccgaggaactgcggagcctgttcaacaccgtggccaccctactgctgcacaccgagatcgacgtg  
cgggacacaaaaggccctggacaagatcgaggaagagcagaacaagatccagcagaacaccagcaggccaagaagccgacggcaaggtct  
cccagactaccctcgtgcagaacctgcagggccagatggtgcaccagccatcagccccggaccctgagccccgggtggggaaggtggtgga  
ggaaaaggccttcagccccgaggtgatccccatgttcagcgccctgagcgaggggccaccaccaggacctgaaccacctgctgaaccctg  
ggcgccaccagggctgctatgcagatcctgaaggacacctcaacgaggaaagccgagctgggacggctgcacccctgacggcgccacca  
tcgccccggccagatggggagccccaggggcagcagatcgccggcaccacctccaacctgcaagaacagatcgccctggatgaccagcaacc  
ccccgtgcccgtggcgacatctacaagcgggtggatcatcctggcctgaacaagatcgtgaggatgtacagccccaccctcctcctggacatc  
aagcaggggcccaaggagcccttcgggactcgtggaccggttcttcaagaccctgcccggcagcaggccaccaggagcgtgaagaactgga  
tgaccgacacctgctggtgcagaacgccaaccccagctgcaagacctcctgagagcactcgcccagggcgaagcatcgaggaaatgatgac  
cgctgcaggggcgtggcgccagccagccacaaggccaaaggtgctggccgaggccatgagccagaccaacagcgccatcctgatgcagggagc  
aacttcaagggcagcaagaggatcgtgaagtgttcaactgcggcaaggaggccacatcgcccaggaaactgcaggggccccagggaagaagggt  
gctggaagtgcggcaaggaggccaccagatgaaggatgcaccagagaggcaggccaaactcctgggcaagatctggcccagccacaaggcg  
gcccggcaactcctgcagaacggccctgagccaccgcccctcccaggaaagcttcgggttcggcgaggaaacaccaccagccagcagaag  
caggaaccatcgacaaggagctgtaccctgaccagcctgaagagcctgttcggcaacgaccccagcagccagtgatga

### 97CN54 GagPolNef (Myr-/FS-/P-)

atggcgccaggccagcatcctgagggggcggcaagctggacaagtgggagaagatcaggetgagggccggcggcaagaagcactacatgctga  
agcacctggtgtgggcccagcaggagctggagaggttcgcccgaacccggcctgctggagaccagcgagggtgcaagcagatcatgaagca  
gctgcagagcgccctgcagaccggcaccgagggagctgaggagctgttcaacaccgtggccaccctactgctgcacaccgagatcgacgtg  
agggacaccaggaggccctggacaagatcgaggaggagcagaacaagatccagcagaagaccagcaggccaaggaggccgacggcaaggtga  
gccagaactaccctcgtgcagaacctgcagggccagatggtgcaccagccatcagccccaggaccctgaatgcatgggtgaaggtggtgga  
ggagaaggccttcagccccgaggtgatccccatgttcagcgccctgagcgaggggccaccctcaggacctgaaccacctgctgaaccctg  
ggcgccaccagggcccatgcagatcctgaaggacacctcaacgaggaggccgagctgggacaggtgcacccctgacccccggcggcggc

# Anhang

tgcgcccgccagatgaggggagccaggggagcgcacatcgccggcaccaccagcaacctgacaggagacagatcgcctggatgaccagcaacc  
accggtgccctggggacatctacaagaggtggatcatcctgggtttaaacaagatcgtgaggatgtacagcccccaccagcatcctggacatc  
aagcagggcccaggagcccttcagggactacgtggacaggtcttcaagacctgagggccgagcagggccaccagggcgtgaaagactgga  
tgaccgacaccctgctggtgcagaacgcacaaccocgactgcaagaccatcctgagggccctggcggcggccagcatcgaggagatgatgac  
cgctgcccagggcgtggcgcccccagccacaagggcaaggtgctggccgagggccatgagccagaccaacagcgccatcctgatgcagaggac  
aactcaagggcagcaagagatcgtgaaggtcttcaactgcggcaagggccacatcgccaggaactgcagggcccaccaggaaggcgt  
gctggaagtgcggcaagggagggccaccagatgaaggactgcaaccagagggcaggccaacttctgggcaagatctggcccagccaaggggcgg  
ccccggcaactcctgcagaacagggccagccaccggcccccccggaggagagcttcagggtcgaggagagaccaccaccagccagccagaag  
caggagcccatgcagaaggagctgacccctgaccagcctgaagagcctgctggtgacatccccctgacgaggaacttctcaggggaacc  
tggcctgccccagggcagggccagggagttagcagcagcagcagaccagggccacagccccaccagggggcagctgaggtgtggggcaggga  
caacaacagcatcagcaggcggcggcacaacagggcagggcaccatcagcttcaacttccccagatcacctgtggcagaggccctggtgacc  
atcaagatcggcgccagctgaaggagccctgctgaacaccggcgccggcgaacagctgctgagggagcctgaacctgcccggcaggtggaagc  
ccaagatgatcggcgccatcggcggtctcatcaaggtgagggcagcagagcagatccccatcgagatctgcggccacaaggccatcgccaccgt  
gctggtggcccaccaccctggaacatcatcgcgaggaacctgctgaccagcctgggctgacctgaacttccccatcagcccatcgagacc  
gtcccctgaaagtgaagcggccatgagcggcccaagtggaagcctgagcagctgcccctgacggagagaagatcaagccctgaccgcatctg  
acgagatggagaaggagggcaagatcacaagatcgggccccaggaacctacaacccccctctcgccatcaagaagaaggacagcaccaa  
gtggaggagctggtgacttcaggagctgaacaagaggaccaggacttctgggagtgagctgggcatccccaccggcggcctgag  
aagaagaaggagctgacgctgtggaagtgggcagcctctcagcactccccctgacggaggaactcaggagctacaccgcttaccatcc  
ccagcaggaacaacagacccccggcctcagctaccagtacaagcgtgctgcccagggcctggaagggcagcctcgccatctccagagcagcat  
gacctcgaggagctgatctacagcaagaaggcaggagatcctggactgtgggtgtaccaccccagggctacttccccgactggcacaac  
tacccccggcggcggcgtgaggttccccctgacttccccctggtgtctcaagctggtgcccctggaaccccagggaggtggaggagccaaagc  
agggcagggacaactgctgctgcaaccccgtgctgcccagcagcagcagggagctgagggagctgctgaggtggaagtgcagcagcagct  
ggcccacaggcagggccagggagctgcaaccccagcttcaaaagactgcatggggcgaagtgaggaacagagcagcatcgtggctggccc  
gctcaggggagagctgagggagaccagggccggcgctgctggggcctgacggagcctggagaagccaggcggcctcaccagca  
gcaacaccggcccccacaacagagactgcccctggctgagggccagggagggcaggtggccttccccctgaggcccagctgccccctgag  
gccccctgactcaagggcggcctggcctgactcttctgagggagaagggcggcctggaggcctgaggcagcactgctgaggtggggc  
ttcaccaccggcgaagaagccaggaaggagcccccttccccctgactcagagctgcaaccccaggaactggaagcggcagcccacc  
agctgcccggagaagatgctggaccctgaacagcatcagaagcgtggtggggcaagctgaaactggggcagccagatctccccggcctcaggt  
gagggcctgtgcaagctgtgagggcgccaaagccctcagacatcctgcccctgaccgaggaggccagctggagctggccgagaacagg  
gagatctgaaggagccctgcaagggctgactcagcagcccagcaagagcctgacgagatccagaagcagggcagggagggagcct  
accagatctaccagggaccccttcaagaacctgaagaccggcaagtacgcaagatgaggaccggcaccacaacacagcagctgaagcagctgaccga  
ggcctgcaagaactcggcagggcctgctgactggggcaagcggcctgactgagctgcccctcagggcctccatccagaagagcctgggagcctgg  
tggaccgacttggcagggcctggatccccaggtggagtctgtaaacaccctccccctgagactgtggatcagctgtggtatcagctggaagagacc  
ccatcgtggggcgtggagactctcctgaggcggcgccgcaacagggagacaagatcggcaagggccggctacgtgaccgacagggggcaggaa  
aaagtctgagcctgaccagaccacaacaggaagccagctcagggcctcagctgcctcagggcagcggcagcggcagctgaacatc  
gtgaccgacagcagctacggcctgggcatcatccaggcccagcccagcagcagagcgagcagctgggtaacagatcatcgagcagctgatga  
agaaggagaggtgtacctgagctgggtgcccccccccaagggcctcggcgcccaacagcagcagctggacaagctggtgagcagcggcctcaggaa  
ggtgctgaagaccctggaccctcagaagcagaacctggcctgctgatctaccagtacatggagcagcctgtacgtggcagcggcctggag  
atcgccagcacagggcaagtaaa

## 97CN001 GagPolNef (Myr-/FS-/P-)

atggcccaggggccagcatcctgagggggcggcaagctggacaagtggagaagatccggctgcccctggcggcaagaacactacatgctga  
gcaacctggctggccagcgggagcctggaacggttcccctgaaccccggcctgctggaaccagcaggggtgtaagcagatgatgaaagca  
gctgacagcctgcccagcagaccgaggaactgcggagcctgctcaacacccgtggcccacccctgactgctgcaacccgagatcgacgtg  
cgggacaacaaagcctgctgcaagaatcgaggaagagcagacaagatccagcagaacaaaccagcagcccaagaagcgcagcaggaaggtct  
cccagaactaccctcctggacaactcgcagggccagatggtgcaaccagcctcagcccggagccctgaaacctgggtgaaggtgctgga  
ggaaaaggccttcagcccggaggtgatccccatggtcagcggcctgagcagggggcggccacaccagggactgaaccactgctgaagaccgtg  
ggcggccaccagctgctatgagatcctgaaaggacaccatcaacaggaagcggcgagctgggaccggctgcaaccctgcaacggccagcca  
tggccctggcccagatcgggggaccagggcagcagatcggcggcacaacctccaactgcagaacagatcctggatgaccagcaacca  
ccccctgcccgtggcgacatctacaagggtggtacatcctggcctgaacaagatcgtgggtagtgcagccccactccatcctggacatc  
aagcaggcccccaagaggcccttcccggactcagcagcgttcttcaagacctcggggcagcagcagcccagggactgaagaactgga  
tgaccgacaacctgctggtgcaagaacgccaaccccagctgcaagcactcctgagagcactcggcccagggcagcctcgaggaatgatgac  
cgctgcccaggggcgtggggcagaccagccaaggcctgctggcggagcctgagccagacaaacagcggcctcctgatgcagcggagc  
aacttcaagggcagcaagagagatcgtgaagctctcaactcgccgcaagagggccacatcgcccggaaactgcagggcccaccaggaaggtg  
gctggaagtgcggcaaggaaggcaacccagatgaaagctgcaacggcagggcagggcacaacttctgggcaagatctggccctcccacaagggag  
ggcccggcaactcctgcagaacggcctgagcccaccgcccctcccgggaaagcttcccggctcggggagaaaccaccaccagccagccaaag  
caggaaccctgcagaagagctgacccctgaccagcctgaagagcctgctgggcaaccccagcagccaggaatcttcaggggaagca  
tggccctgcccagggcagggccagggagttagcagcagcagggccaagggcccaacagcccaacagggcagcctcaggtgtggggcagga  
caacaacagcatcagcggcggcgcccaacagggcagggcaccatcagcttcaacttccccagatcacctgtggcagaggccttggtagc  
atcaagatcggcgccagctgaaggaggccctgctgaacaccggcgccggcgaacagctgctggaggactgacctgcccggcaagtggaaagc  
ccaagtgatcggcgccatcggcgctctcaaggtgagggcagcagcagcagatccccatcgagatctgcggccacaaggccatcgccaccgt  
gctggtggccccaccaccctggaacatcatcgcgaggaacctgctgaccagcctgggctgacctgaacttccccatcagcccatcgagacc  
gtggcctgaaagcgaagcggcctggaacggccccaaagtggaagcagctggcccctgaccggaggaagatcaaggccctgaccgcatctgg  
acgagatggagaaggaggcaagatcaccagatccccagatcaacagctgctgcccagggtggaaggccagcctcgccatctccagagcagcat  
gtggaggagctggtgacttcagggagctgaacaagagggaccaggttctgggagtgagctgggcatccccaccggcggcctgag  
aagaagaagagcgtgaccctgtggaagctggcgagcctactcagactccccctgacgagactcaggaagtacaccgcttaccatcc  
ccagcaggaacaacagacccccggcctcagctaccagtacaagcgtgctgcccagggctggaagggcagcctcgccatctccagagcagcat  
gacctcagggagctgatctacagcaagaaggcaggagatcctggactgtgggtgtaccaccccagggctacttccccgactggcacaac  
tacccccggcggcggcgtgaggttccccctgacttccccctggtgctcaagctggtgcccgtggaaccccagggaggtggaggagccaaagc  
agggcagggacaactcctgctgcaaccctgctgcccagcagcagcagggcgaagggcggcagcagcagcccacagggaggtgctgaaagtc  
ggcccacaggcagggccaggggagctgcaaccccagcttcaaaagactgcatggggcgaagtggaagcaagagcagcatcgtggctggccc  
gctcagggagagatgagggagaccagggcggcggcagggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc  
gaacaccggcggcccccaacagggactgcccctggctgagggccaggaagtgaggacagcacaagggaggtgctgaaagtcgaaagtc  
ggcccagcctacaagggcggcgtggaacctgagcttcttctgagggagaagggcggcctggagggctgagggcagcactgctgaggtggggc  
ttcaccaccggcgaagaagcaccagaaggagcccccttccccctggtgactgagcagcctcagagctgcaaccccagcaagtggacgctgaccccac  
agctgcccgagaagatgactggaccctggaacagcactcagaagctggggcaagctgaaactggggcagcagctgaactggggcagcagcatc  
accggcagctgcaagctgctgagggggcggcagggcctgaccagatcctgcccctgaccgaggagggccagctggagctggccgagaacagg  
gagatcctgaaggagcccgtgcaagggctgactcagcagcccagcagagcctgacgagatccagaagcagggcagggcagcagctggagcct  
accagatctaccagggccttcaagaacctgaagaccggcagcagctgcaacagatgaggaaccgccccacaacacagcagcctgaccga  
ggcctgcaagaagatcgccatggagggctcgtgatctggggcaagcaccacaagttcaggctgccatccagaagggagaccctgggagacctgg  
tgaccgactctggcagggcctggtacccgagtgaggtctgctgaaacccctccccctggtagactgtggtatcagctggagaagggc  
cctcgtgggctggagacttctacgtggacggcgccggccaacagggagcaagatcggcaagggcggcctgactgaccagcggcagcggaa  
gaagatcgtgagcctgaccgagaccacaaccagaagaccagctgagggcctctgcatcgccctgcaggaagggcagggcagggatgaacatc  
gtgaccgacagcagctacggcctgggcatcatccaggcccagcccagcaagagcagcagggagcagctgggtaacagatcatcgagcagctgatga  
agaaggagaggtgtacctgagctgggtgcccccccccaagggcctcggcgcccaacagcagcaggtggacaagctggtgagcagcggcctcaggaa

# Anhang

ggtgctgaagacctggagccttcaggaagcagaaccccgatcgtgatctaccagtacatggacgacctgtactgtggcagcgacctggag  
atcggccagcacaggaccaagtaa

## 97CN001 GagPolNef (Myr+/FS-/P-)

atggcgccaggccagcatcctgagggcggaagctggacaagtgggagaagatccggtcggcctggcggaagaacactacatgctga  
agcactggtctggccagccgggagctggaacggttcgcccgaaccccgctgctgaaaccagcaggggctgtaagcagatgatgaaagca  
gctgcagcctgcctgcagaccggcaccggaggaactgaggagctgctcaacaccgtggccaccctgtactgctgcacaccgagatcgactg  
cgggacacaaaaggccctggacaagatcgaggaagagcagaacaagatccagcagaaaaccagcagggccaagaagccgacggcaaggtct  
ccagaactaccocatcgtgcagaacctgcaggggccagatggtgcaccagcccatcagccccggaccctgaacgctgggtgaaggtggtgga  
gaaaaggccttcagccccgaggtgatccccatgctcagcgcctgagcagggggccacaccccaggacctgaaccatgctgaacaccgtg  
ggcgccaccaggtgctatgcagatcctgaaggacacctcaacgaggaagcccgagctgggaccgctgacacctgacacggcggaccca  
tcgccccggccagatcggggagccccaggggcagcagatcgccggcaccacctcaacctgcaagaacagatcgctggatgaccagcaacc  
ccccgtgccctggcgacatctacaagcggtggatcatcctggcctgaacaagatcgtgctggatgtacagccccacctccatcctggacatc  
aagcagggcccaaaagagccttcgggactcgtggaacacctcaacgaggaagcccgagctgggaccgctgacacctgacacggcggaccca  
tcgccccggccagatcggggagccccaggggcagcagatcgccggcaccacctcaacctgcaagaacagatcgctggatgaccagcaacc  
ccccgtgccctggcgacatctacaagcggtggatcatcctggcctgaacaagatcgtgctggatgtacagccccacctccatcctggacatc  
aagcagggcccaaaagagccttcgggactcgtggaacacctcaacgaggaagcccgagctgggaccgctgacacctgacacggcggaccca  
tgaccgacacctgctggtgcagaacgccaaccccgactgcaagacctcctgagagcactcgccagggcgcaagctcgaggaaatgatgac  
cgctgccagggcgtggcggaaccagccacaagggcaggtgctggccgaggccatgagccagaccaacagcgccatcctgatgcagcggagc  
aactcaagggcgacaaagagctcgtgaagtctcaactcgggcaaaagggccacatcgccggaaactgcaggcccccaagaagggctgct  
ggaaagtgcggcaaaagagaccagatgaggaactgacacggcgccagggccaacttcctgggcaagatctggccctcccacaggcgag  
gccccgaactcctgcagaacggcctgagccccacggcctcccgaggaagcttcgggtcggcgaggaacaccacccccagcagaag  
caggaacccatcgacaagagctgtacccccgaccagcctgaagagctgctggcaaccgaccccagcagcaggaattcttcagggagaacc  
tggccctgccccagggcagggcagggagttcagcagcgagcagcagggccaaacagccccacagggcgagctgcaaggtgctgggcaagga  
caacaacagatcagcagggcggcggccacagggcaccatcagctcaactccccagatcacctgctggcagggccctggtgac  
atcaagatcggcgccagctgaagggcctgctgaaccacggcgccggcgagcaccctgctggaggacctgaacctgccccggcaagtggaaagc  
caagatgatcggcgccatcggcgctcatcaaggtgagggcagcagcagatccccatcgagatcctgccccacaagggcctcggcagctg  
gctggtggcccccaccctgacatcagcaggaactgctgaccagctggcctgacacctgaaactccccatcagccccatcgagcctcgaagc  
gtggcgctgaagctgaagcggcagatggaagcccccaaggtgaagcagtgccccctgacagggagaagatcaagggcctgaccccatctg  
cagagatggagaagggcaagatcaccaagatcgcccccgagaacccccatacaccccccctctcgccatcaagaagaagcagcagcaca  
atggaggagctggtgactcagggagctgaacaagagaccagactctgggagtgagctgggctccccagggctgggcaagcagcagcagc  
aagaagaagagctgacctgctggagctggcgagcctactcagcactccccgtgacagggactcaggaagtaacccgctccaccctcc  
ccagcaggaacacagcagccccggctcagctaccagtcaacagctgccccagggctggaagggcagcctcgccatctccagagcagct  
gacctcgaggagctgatctacagcaagaagagcagggatcctggactcctccccagcaccacagggctactcccccgctggcaac  
taccccccggccccggcgtgaggttccccctgacctgctgctcaagctggctgccccgggagggaggggaggggagggggaagc  
agggcgaggaactgctgctgccccggctggccagcagcagctgagggagcagcagggaggggaggtgctgaggtggaagtgcagagcagct  
ggccccagggcagggcagggagctgccccggctctcaagaagctgctggcgcaagctggcgccagctggagcaagcagcagcagctggtg  
gcccacagggagaggtgagggagcagcagccccggcgagcggcgctggcgccgctgagcagggactggagaagcagcagcagcagcagc  
gcccacagggcagggcagggagcagccccggcggcagcggcggcgctggcgccgctgagcagggactggagaagcagcagcagcagcagc  
gcaacacggccggcccccaacagagagctgcgctggctggagggagggaggggaggggagggggagggggagggggagggggaggggg  
gagctcctgaagggccctgcaagctgctgagggggcggcagcggcctgaccagatcgtgccccgacagcagggagggcagcagcagcagc  
gagatcctgaagggccctgcaagcggctgctactcagcagccccagcaagacctgactcgccgagatccagaagcaggggccagggcagct  
accagatctaacaggagccctcaagaacctgaagaccggcaagctacgccaagatgagggcagccccaccaaagcagctgagcagctgaccga  
ggcgtgcaagctcagctgaggggctgctgctggcgcaagcccaagctcagggctgcccacagaagggagcagctggagagctggagagctgg  
tgagccgactactggcagggcaccctggatccccgagtgaggttctggaacccccctccccggtagagctggtgtagctgtagctggagaaggacc  
ccatcgtggggcgtggagactctactgagcggcggccgcaacagggagaccagatcgggcaagggcggtcagctgacccagcagggggagaa  
aaagatcgtgagctgacggagaccacaacagaaagcagcagctgagggcctctgcatcgccctcagggagcagggcagcaggtgaaactc  
gtgaccgacagcagctgccccctggcatcatcaagggccagccggcagcagagcgagcagcagctggtgaaccagatctcgagcagctgatga  
aagggagaggggtgactcgtgagctgggtggcccccaaggggctcggcggaacagcagcaggtggacaagctggtgagcagcggcatcaggaa  
ggtgctgaagacctggagccttcaggaagcagaacccccgatcgtgatctaccagtacatggacgacctgtactgtggcagcggacctggag  
atcggccagcacaggaccaagtaa

## 97CN001 GagPolNef (Myr+/FS+/P-)

atggcgccaggccagcatcctgagggcggaagctggacaagtgggagaagatccggtcggcctggcggaagaacactacatgctga  
agcactggtctggccagccgggagctggaacggttcgcccgaaccccgctgctgaaaccagcaggggctgtaagcagatgatgaaagca  
gctgcagcctgcctgcagaccggcaccggaggaactgaggagctgctcaacaccgtggccaccctgtactgctgcacaccgagatcgactg  
cgggacacaaaaggccctggacaagatcgaggaagagcagaacaagatccagcagaaaaccagcagggccaagaagccgacggcaaggtct  
ccagaactaccocatcgtgcagaacctgcaggggccagatggtgcaccagcccatcagccccggaccctgaacgctgggtgaaggtggtgga  
gaaaaggccttcagccccgaggtgatccccatgctcagcgcctgagcagggggccacaccccaggacctgaaccatgctgaacaccgtg  
ggcgccaccaggtgctatgcagatcctgaaggacacctcaacgaggaagcccgagctgggaccgctgacacctgacacggcggaccca  
tcgccccggccagatcggggagccccaggggcagcagatcgccggcaccacctcaacctgcaagaacagatcgctggatgaccagcaacc  
ccccgtgccctggcgacatctacaagcggtggatcatcctggcctgaacaagatcgtgctggatgtacagccccacctccatcctggacatc  
aagcagggcccaaaagagccttcgggactcgtggaacacctcaacgaggaagcccgagctgggaccgctgacacctgacacggcggaccca  
tgaccgacacctgctggtgcagaacgccaaccccgactgcaagacctcctgagagcactcgccagggcgcaagctcgaggaaatgatgac  
cgctgccagggcgtggcggaaccagccacaagggcaggtgctggccgaggccatgagccagaccaacagcgccatcctgatgcagcggagc  
aactcaagggcgacaaagagctcgtgaagtctcaactcgggcaaaagggccacatcgccggaaactgcaggcccccaagaagggctgct  
ggaaagtgcggcaaaagagaccacagatgaaggactgacagggcggcagggccaaacttttttagggaaaactgccccctcccacagggaag  
gcccagggaattttcttcagaacggaccagagcccaacagccccacagaggagagctcagggtttggggaagagacaacaactccatctcagaag  
caggagccaatagacaaggaactatctcttaactctccctcaactctttggcaacgacccctgctcacaataaagatagcggcgagct  
gaagggagccctgctgaacaccggcgccggcagcagctgctgaggaactgactgccccggcagctggaagccaagatgatcggcgctc  
ggcggctcatcaaggtgagggcagcagcagcagctccccatcgagatcctgggccacaagggcctcggcaccgctgctggtggcccccccccg  
tgaacatcatcggcaggaacctgctgacagcagctgggctgacacctgactccccatcagccccatcgagacagctgccccgtagagctgaagc  
cggcatggaagggcccaaggtgagcagctggccccagcaggaagaagtaacaagggcctgcagcagatctgcaagcagatggagaaggagggc  
aagatcaccaagatcggccccgagaacctcaacaacccccctctcgccatcaagaagaagcagcagcacaagtgaggaagctggtgact  
cagggagctgaacaagaggaccagggacttctgggaggtgagctggcctccccccccggcgccctgaagagaagaagagcgtgacgct  
gctggagctggcgagcagcactctcagcactccccctgtcagggactcaggaagctcaggaagtaacacggccttcaccatcccagcaggaacacagagcc  
ccccggatcagctaccagtacaactgctgccccagggctggaagggcagcctcgccatctccagagcagctgaccatcgaggagctgatct  
cagcaagaagagggcagagatcctggacctggtgttcaacacccagggctactccccgactggcacaactacacccccggccccggcgt  
gaggttccccctgactcctggctggcttcaagctgctgccccggcagccccagggaggtggaggaagcccaacagggcagggcagcactgctg  
ctgacccccgtgctgcccagcagggatggaggcagcaccagggaggtgctgaagtggaagttcgacagcagctggccccagggcagggcca  
gggagctgacccccggctctcaagagctgactggcgggcaagtggaagaagagcagcagctggtggctggccccgcaactcagggagggatgag  
gagggcagccccggcgccagggctggggcggctgagcagggcctggagaagcagcagggcctcaccagcagcaaacccggcccccaccaa  
gaggactgcccctggctggaggccagggagggggaggggtggcctccccctgagggccccaggtgccccgagggccatgacctacaagggc

# Anhang

ccgtggacctgagcttcttctcctgaaggagaaggcggcctggaggcctgagcagcacctgctgaggtgggcttaccacccccgacaagaa  
gcaccagaaggaccctctctgtgtagggctacgagctgcaccccgacaagtgaccgtgcagcccaccagctgccggagaaggatagc  
tggacctggaacagatccagaagctggggaagctgaactggccagccagatctaccggcatcaaggtgaggtcagctggaagctgc  
tgagggcgcgaaggcctgaccgacatcgtgccctgaccgagggcggcagctggagctggccgagaaacaggagatcctgaaggagcctg  
gcagggcgtgactacgaccccagcaaggacctgatcgccgagatccagaagcaggcggcaggagcagtgaccctaccagatctaccaggagcc  
ttcaagaacctgaagaccggcaagtacgccaagatgaggaccgccccaccaaagcagctggaagcagctgaccgagggcctgcagaagatcgcca  
tgaggggcatcgtgatctggggcaagacccccaggctcaggctgccatccagaaggagacctgggagacctggtggaccgactactggcaggc  
cacctggtccccgagtgggagtctgtgaacccccctccctggtgaagctgctggtatcagctggagaaggaccctcgtgggctggagacc  
ttctacgtggacggcgccccaacaggagaccaaagatcggcaaggcggctacgtgaccgacaggggacggaagaagatcgtgagcctgaccg  
agaccaccaaccagaagaccgagctgcaggccatctgatcgcctgacggacagcggcagcaggtgaacatcgtgaccgacagccagtagc  
cctgggcatcatccaggcccagcccacaagagcagagcagctggtgaaccagatcatcgagcagctgatgaagaaggaggggtgacctg  
agctgggtccccgcccaagggcatcggcggaacagcaggtggacaagctggtgacgagcggcatcaggaaggtgctgaagaccctggagc  
ccttcaggaagcagaaccggcctcgtgatctaccagtagtggacgacctgtagctgggagcagcctggagatcggccagcagagccaa  
gtaa

## 97CN001 GagPolNef (Myr+ FS+ P+)

atgggcccaggccagcatcctgagggcggcaagctggacaagtgaggagaagatccggctcgccctggcggcaagaaactacatgctga  
agcactggtctggccagcgggagctggaacggttcgcctgaaccccgccctgctggaaccagcagggctgtaagcagatgatgaagca  
gctgcagctgctgacagcggcagcaggacctgcggagctgctcaacacgtggccacctgtactgctgcacaccgagatcgaagctg  
cgggacacaaaaggcctggacaagatcgaggaaagcagacaagatccagcagaaaaccagcagggccaaaagaagccgacggcaaggtct  
ccagaactaccctcgtgcagaacctgcaggccagatggtgcaccagcccagcagcccggaccctgaacgctgggtgagctggtggg  
ggaaaaggcctcagcccaggtgatccccatgttcagcggctgagcggggcggcaccacccaggaactgacaccatgactgaacacctg  
ggcggcaaccaggtctgatgcagatcctgaagacacctcaacaggaagcgcggagtgggaccggctgcacctgtagcagccggaccca  
tcgcccctggccagatcggggagccaggggacagcagatcgccggcaccactccaacctgcaagaacagatcgctgagaccagcc  
ccccctgcccgtggcagcactcaaacgggtgatcctggcctgaacaagatcgtgggagtagcagcccacactcctggactc  
aagcagggcccaaaagacccttcgggactacgtggaccggttctcaagacctgcccggcagcagggccaccaggagcagtagaagaactgga  
tgaccgacacctgctggtgcagaacggccaaccggcactggaagacctcctgagagcagctcggcccagggcagcagatcgaggaatgatgac  
cgctgcccaggcgtggcgggaccagcccaaggccaaaggtgctggcggcagctgagccagacacaaacggcctcctgatgcagggagc  
aactcaaggcagcaagaggtcgtgagactcctgaagacacctcaacaggaagcgcggagtgggaccggctgcacctgtagcagccggacca  
tcgcccctggccagatcggggagccaggggacagcagatcgccggcaccactccaacctgcaagaacagatcgctgagaccagcc  
ccccctgcccgtggcagcactcaaacgggtgatcctggcctgaacaagatcgtgggagtagcagcccacactcctggactc  
aagcagggcccaaaagacccttcgggactacgtggaccggttctcaagacctgcccggcagcagggccaccaggagcagtagaagaactgga  
tgaccgacacctgctggtgcagaacggccaaccggcactggaagacctcctgagagcagctcggcccagggcagcagatcgaggaatgatgac  
cgctgcccaggcgtggcgggaccagcccaaggccaaaggtgctggcggcagctgagccagacacaaacggcctcctgatgcagggagc  
aactcaaggcagcaagaggtcgtgagactcctgaagacacctcaacaggaagcgcggagtgggaccggctgcacctgtagcagccggacca  
tcgcccctggccagatcggggagccaggggacacagcggcagcagggagctcaggttggggaaagagacaaactcctcagaag  
caggagccaatagacaaggactatctcttaacttcctcaaatcactcttggcaacgacacctcgtcacataaagataggcggcagct  
gaaggagcccctgctggacaccggcggcgagcagcactgctggaggaactgacctgcccggcaagtggaagcccaagatgatcggcgctc  
ggcgctcatcaaggtgagcagtagcagcagatccccagatctgcccggcacaagggcctcggcaccctgctggtggcccccacccc  
tgaaatcatcggcaggaacctgtagcagcagctgggtgacctgaaacttccccatcagccccatcagagaccgtagagcctgtagagct  
cggcatgagcggccccaaagtgagcagtgcccctgaccgaggaagaatcaaggccctgaccggcctctgagcagatggagaaggagggc  
aagatcaacaagatcgcccccaggaacccctcaaacaccctccttcccctcaagaagaagagcagcacaagtgaggaagctggtggact  
tcagggagctgaacaaggagaccaggacttctgggaggtgagcagctgggcatccccaccggcggcctgaagaagaagaagagcagctg  
gctggagctggcggagcagcctactcagcatccccctgtaggactcaggaagctacaccggcctcaccatccccagcaggaacacagcagc  
ccccctcagctcagctacaactgctgcccaggctggaagggcagctgcctctccagagcagctgacctcagagcagctgatcct  
acagcaagaagagcagagatcctggacctggtgtagtaccacacccagggtacttccccgactggcaactacacccccggcccccggcgt  
gaggttccccctgacctcggctggctctcaagctggtgcccgtggaaccccaggaggtggagggagcccaagggcagggacaactcctg  
ctgacccctgctggccagcagctgagggacagccacaggaggtgctgagtggaagtgcagaccagctggcccacagggcagggcca  
gggagctgaccccgagttctcaagagtagctggcgggcagctgggcaagagcagcagctcgtgggctggcccggcctcaggggagaggtgag  
gaggaccgagccccggccgagcggcgtggcgccgtgagcagggacctggagaagcagcggcctcaccagcagcaaccggcccccacac  
gaggtcggcctggtggggcagcagggagggcaggtggctccccctgagggcagggctggcccagggcctgacctcaaggggc  
ccgtggacctgagcttctcctgaaggagaaggccggcctggaggcctgagggcagcctgctgaggtgggcttaccacccccgacaagaa  
gcaccagaaggacccccctctctgtagtggtgctacgagctgcaccccagcaagtgagccctgagcccccagcctgcccgagaagtagt  
tgagcgtgaaagcagatccagaagctggtgggcaagctgactggccagcagatctaccggcagatcaaggtgagggcagctgcaagctgc  
tgaggggcgccaaggcctgaccgacatcgtgcccctgaccgagggagggcagctggagctggccgagaaacaggagatcctgagggagccctg  
gcagccgctgtagctacgaccccagcaaggacctgatcggcagatccagaagcaggggcagggcagctgacctaccagatctaccagggccc  
ttcaagaacctgaagaccggcaagtagcagcagatgaggagcggcaccaccaaagcagctgaaagcagctgaccagggcctgaggaagctgc  
tgaggggcatcgtgatctggggcaagacccccaggctcaggctgccatccagaaggagacctgggagacctggtggaccgactactggcaggc  
cacctggtaccggagtgaggtctgtagaacccccctccccggtgaagctgctggtatcagctggagaaggaccctcctggtggctggagacc  
ttcaagaacctgaagaccggcaagtagcagcagatgaggagcggcaccaccaaagcagctgaccgacaggggacggaagaagatcgtgagctgacc  
agaccaccaaccagaagcagcagctgcaggccatctgatcgcctgacggacagcggcagggaggtgaacatcgtgaccgacagccagtagc  
cctgggcatcatccaggcccagcccagacaagagcagagcagctggtgaaccagatcatcgagcagctgatgaagaaggaggggtgacctg  
agctgggtgcccggcccaagggcctcggcggaacagcagctggacaagctggtgagcagcggcctcaggaaggtgctgaagaccctggagc  
ccttcaggaagcagaaccggcctcgtgatctaccagtagtagcagacctgtagctgggagcagcctggagatcggccagcagcagggaccaa  
gtaa

## 97CN54 PolNef (P-)

atggaatctctcagggagaacctggcctgcccaggcagggccaggaggtcagcagcagcagacagggcccaacagccccaccaggggc  
agctgcaggtgtggggcagggacaacaacagcagcagcagggcggcgaacaggcagggcaccatcagcttcaacttccccagatcaccct  
gtggcagagggcccctggtgacctcaagatcggcgccagctgaaggagggcctgctgaacaccggcggcggcagaccctgctggaggacctg  
aacctgcccggcaagtggaaagcccaagatgatcggcgccatcggcgctctcatcaaggtgagggcagtagcagcagatccccatcgagatcgtgcg  
gccacaaggcctcggcaccgctgctggtgggccccaccctggtaacatcatcggcaggaacctgtagcaccagctgggctgacctgaactt  
ccccatcagccccatcgagaccgctgcccgtgaagctgaagccggcctgagcggccccaggtgaaagcagtgcccctgaccgaggaagagatc  
aaggcccctgaccgcatctgagcagatggagaaggagggcagatcacaagatcggcccagagaacccctcaaacaccctccttcgcca  
tcaagaagaaggacagcacaagtgaggaagctggtggactcagggagctgaacaaggagaccaggacttctgggaggtgagctgggcat  
ccccaccggcggcctgaagaagaagaagagcagctgacctggagcgtggcgagccctacttagcagccccctgtagagagctcagg  
aagtagccgcttaccatccccagcagggacaacagcagggccccggcctcagctacagtagaaccctgctgcccagggcctggaaggagcc  
tcgcccctcctccagagcagctgacctcagggagctgatctacagcaagaagaggcagggagatcctggacctggtgtagtaccacaccagg  
ctacttccccagctggcacaactacaccggcggcccggcgctgaggttccccctgaccttggcctggtgctcaagctggtgcccgtggacccc  
agggagtgaggagggccaaacaggggagggcaactcctgctgaccctggtgcccagcagggcagggagcagcagggagctgtagtga  
agtggaagtgcagaccagctggcccacagggcagggccagggagctgacctccagctgctcaaggactgcatggcgggcaagtgagca  
gagcagatcgtggctggcccggcctcaggagaggtgagggagccagggccggcggcagcggcgtggggcggcgtgagcagggacctggag  
aagcagggcggcctcaccagcagcaacaccggcccccaccaaagcaggtcggcctggtggagggcagggagggcaggtggctcccc  
tgagggcccaggtgcccctgagggccatgacctacaagggcgccgtggacctgagcttctcctgaaggagaaggggcggcctggaggcctgag  
gcagcagctgctgaggtggggttaccacccccgacaagaagcagcaagaaggaccctcctgtagtggctgagcagctgacccccagc  
aagtggcctgcaagcccagctgcccagagatgagtgagcctggaacagctcaagaagctggtggcagcagctggtggcagcagctgggagcagc  
agatctaccggcagcaaggtgagggagctgtagagctgtagggggcggcgaagggcctgaccgacatcgtgcccctgaccgaggggcccga

# Anhang

gctggagctggccgagaacagggagatcctgaaggagcccgtgacggcgtgtactacgaccccagcaaggacctgatcgccgagatccagaag  
cagggccaggagcagtgaccctaccagatctaccaggagcccttcaagaacctgaagaccggcaagtacgccaagatgaggaccgcccacacca  
acgacgtgaagcagctgaccgagcctgacagagatcgccctggaggcatcgtgatctggggcaagaccccaggctcagggtgcccattcca  
gaaggagacctgggagacctggtggaccgactactggcaggccacctggatccccgagtgggagtctcgtgaacaccccctcccctggtgaagctg  
tggatcagctggagaaggaccctcgtggcgtggagaccttctacgtggacggcgccgcaacagggagaccaagatcggcaaggccggt  
acgtgaccgacagggggcaggaagaagatcgtgagcctgaccgagaccacaaccagaagaccgagctgacggccatctgatcgccctgagga  
cagcggcagcaggtgaacatcgtgaccgacagccagtagccctgggcatcatccagcccagcccacaagagcagagcagcgtggtgaac  
cagatcatcgagcagctgatgaagaaggaggggtgtacctgagctgggtgcccggcccacaagggcatcggcggcaacgagcaggtggacaagc  
tggtagcagcggcatcaggaaggtgtgaagaccctggagccttcaggaagcagaaccccggcatcgtgatctaccagtagctggagcagcct  
gtacctggcagcagcctggagatcggccagcagcaggaaccaagtaata

## Murin wtCD40 Ligand

atgatcgagacctacagccagcccagcccagaagcgtggccaccggcctgcccgcctctatgaaaatttttatgtacctgctgaccgtgttcc  
tgatcaccagatgatcgccagcgtgctgttcccgctgtacctgcaccggcggctggacaaggtggaggaagaggtgaacctgacagaggactt  
cgtgttcatcaagaagctgaagcgtgcaacaagggcgaggggcagcctgagcctgctgaactgagaggaatcgccggcagttcgaggacctg  
tgaaggacatcaccctgaacaagaggaagaaagaaagaaacagctctcagatgcagcggggcagcagggacctcagatcgcccaccctgg  
tgtccgagggcaacagcagccgcccagcgtgctgagtgaggccaagaaaggtactacacctgaagagcaacctggtgatgtggaacacgg  
caagcagctgaccgtgaagcgggagggcctgtactacctgtacacccaggtgaccttttgcagcaaccgggagcccagcagcagcggcccttc  
atcgtggcctgtggctgaagcccagctcggcagcagcggatcctgctgaagggcagcacaaccacagcagctcccagctgtgagcagcagc  
agagcgtgacacctggggcgtgtcagagctgacggccggagccagcgtgtcgtgaaactgacccgagggcagcaggtgatccacagagtggtg  
ctcagcagcttcggcctgctgaagctgtgatga

## Murin wtCD40 Ligand ΔCL

atgatcgagacctacagccagcccagcccagaagcgtggccaccggcctgcccgcctctatgaaaatttttatgtacctgctgaccgtgttcc  
tgatcaccagatgatcgccagcgtgctgttcccgctgtacctgcaccggcggctggacaaggtggaggaagaggtgaacctgacagaggactt  
cgtgttcatcaagaagctgaagcgtgcaacaagggcgaggggcagcctgagcctgctgaactgagaggaatcgccggcagttcgaggacctg  
tgaaggacatcaccctgaacaagaggaagaaagaaagaaacagcctcagatgcagcggggcagcagggacctcagatcgcccaccctgg  
ggccaagaaaggtactacacctgaagagcaacctggtgatgctggaacacggcaagcagctgacctgaagcgggagggcctgtactacct  
gtacacccaggtgaccttttgcagcaaccgggagcccagcagcagcggcccttcacgtgggctgtggtgaagcccagctcggcagcagcag  
cgatcctgctgaagggcagcacaaccacagcagctcccagctgtgagcagcagagcgtgacacctggcgcgctgttcagagctgagcggc  
gagccagcgtgtcgtgaaactgacccagggcagcaggtgatccacagagtggtcctcagcagcttcggcctgctgaagctgtgatga

## Murin MegaCD40L

atggctatcatctacctcatcctcctgttaccgctgtgcccggcgaagatgacgttactacaactgaagagctagctcctgctttggctccctc  
caccacaagggaaacttgtcaggttggatggcagcagcctcccagacatcctggccacaatggcaccagccgctgatggcagagatggcactcc  
tggagagaagggagagaagggagatgacaggtctcttggctcctaaaggtgagacaggagatgttgaatgacagggagctgaagggccacggggc  
tccccggaaaccctggcaggaagggagcctggagaagcggcctggtgatgaggtcctcaaatggcagcacagcttgaagcgaagccaaca  
gtaatgcagcagcctcctacagctggcgaagaaaggtatattaccatgaaaagcaacttggtaatgcttgaatgggaaacagctgacggt  
taaaagagaaggactctattatgtctacactcaagtcaccttctgcttaactcgggagccttcagagcaccgcccattcatcgtcggcctctgg  
ctgaagcccagcagtgatctgagagaatcttactcaagggcggcaaataccacaggtcctcccagcttggcagcagcagctgttctacttgg  
cggaggtgttgaattacaagctggtgcttctgcttctgctcaactgactgaagcaagccaagtgatccacagagttggcttctcatctttgg  
cttactcaactctga

## Murin MegaCD40L-MB1

Atggctatcatctacctcatcctcctgttaccagctgtgcccggcgaagatgacgttactacaactgaagagctagctcctgctttggctccctc  
caccacaagggaaacttgtcaggttggatggcagcagcctcccagacatcctggccacaatggcaccagccgctgatggcagagatggcactcc  
tccctgctttggctccctccaccaagggaaacttgtgaggttggatggcagcagcctcccagacatcctggccacaatggcaccagcggcctgat  
ggcagagatggcactcctggagagaagggagagaagggagatgacaggtctcttggctcctaaaggtgagacaggagatgttgaatgacagggag  
ctgaagggccacggggcttccccggaaaccctggcaggaagggagagcctggagaagccgctggtgatgaggtcctcaaatggcagcacagct  
tgaagcgaagccaacagtaatgcagcagccttctacagctggcgaagaaaggtatattaccatgaaaagcaacttggtaatgcttgaat  
gggaaacagctgacggttaaaagagaaggactctattatgtctacactcaagtcaccttctgcttaactcgggagccttcagagcaccgcccatt  
tcatcgtcggcctctgctgaagcccagcagtgatctgagagaatcttactcaagggcggcaaataccacagctcctcccagcttggcagcagca  
gcagctgttctacttggcggaggtgttgaattacaagctggtgcttctgcttctgctcaactgactgaagcaagccaagtgatccacagagtt  
ggcttctcatctttggcttactcaactctga

## Murin MegaCD40L-MB2

atgatcgagacctacagccagcccagcccagaagcgtggccaccggcctgcccgcctctatgaaagatttttatgtatcttactgcttttcc  
ttatcaccacaatgatggatctgtgcttttctgctgtatggaagcggcggaggggggtctgggggggaggcagcgaagatgacgttactac  
aactgaagagctagctcctgctttggctccctccaccaagggaaacttgtcaggttggatggcagcagcctcccagacatcctggccacaatggc  
acaccagccgctgagcagagatggcactcctggagagaagggagagagcctggagaagccgctggtgatgaggtcctccttggctcctaaaggtgagcagagagatg  
tggatgacagggagctgaagggccacggggcttccccggaaaccctggcaggaagggagagcctggagaagccgctggtgatgaggtcctca  
aatggcagcacagcttgaagcgaagccaacagtaatgcagcagccttctacagctggcgaagaaaggtatattaccatgaaaagcaacttgg  
tgaatgcttgaatgggaaacagctgacggttaaaagagaaggactctattatgtctacactcaagtcaccttctgcttaactcgggagcctt  
cgagcaccgcccattcatcgtcggcctctggctgaagcccagcagtgatctgagagaatcttactcaagggcggcaaataccacagctcctc  
ccagcttggcagcagcagctgttctacttggcggaggtgttgaattacaagctggtgcttctgcttctgctcaactgactgaagcaagcca  
gtgatccacagagttggcttctcatctttggcttactcaactctga

### Literaturverzeichnis

- (1) Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983;220:868-871.
- (2) Nahmias AJ, Weiss J, Yao X et al. Evidence for human infection with an HTLV III/LAV-like virus in Central Africa, 1959. *Lancet*. 1986;1:1279-1280.
- (3) Zhu T, Korber BT, Nahmias AJ et al. An african HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* 1998 Feb; 391(5): 594-597. 1998;391:594-597.
- (4) Martinson JJ, Chapman NH, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nat Genet*. 1997;16:100-103.
- (5) Doranz BJ, Rucker J, Yi Y et al. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta- chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell*. 1996;85:1149-1158.
- (6) Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC et al. CC CKR5: A Rantes, MIP-1alpha, MIP-1beta Receptor as a Fusin Cofactor for Macrophage-Tropic HIV-1. *Nature*. 1996;272:1955-1958.
- (7) Moore J, Trkola A. HIV type 1 coreceptors, neutralization serotypes, and vaccine development. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1997;13:733-736.
- (8) Prasad VR, Myrick K, Haseltine W, Goff SP. Expression of enzymatically active reverse transcriptase of simian immunodeficiency virus in bacteria: sensitivity to nucleotide analogue inhibitors. *Virology*. 1990;179:896-900.
- (9) Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, O'Malley PM, Holmberg SD. Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *AIDS*. 1994;8:1123-1128.
- (10) Goff SJ, Skalka AM. Reverse transcriptase. Cold Spring Harbor ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1993.
- (11) Kulpa D, Topping R, Telesnitsky A. Determination of the site of first strand transfer during Moloney murine leukemia virus reverse transcription and identification of strand transfer-associated reverse transcriptase errors. *EMBO J*. 1997;16:856-865.
- (12) Whitcomb JM, Hughes SH. Retroviral reverse transcription and integration: progress and problems. *Annu Rev Cell Biol*. 1992;8:275-306.
- (13) Miller RH, Sarver N. HIV accessory proteins as therapeutic targets. *Nat Med*. 1997;3:389-394.
- (14) Bowerman B, Brown PO, Bishop JM, Varmus HE. A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA. *Genes Dev*. 1989;3:469-478.

## Literaturverzeichnis

---

- (15) Fouchier RA, Meyer BE, Simon JH, Fischer U, Malim MH. HIV-1 infection of non-dividing cells: evidence that the amino-terminal basic region of the viral matrix protein is important for Gag processing but not for post-entry nuclear import. *EMBO J.* 1997;16:4531-4539.
- (16) Nie Z, Bergeron D, Subramanian RA et al. The putative alpha helix 2 of human immunodeficiency virus type 1 Vpr contains a determinant which is responsible for the nuclear translocation of proviral DNA in growth-arrested cells. *J Virol.* 1998;72:4104-4115.
- (17) Fouchier RA, Meyer BE, Simon JH et al. Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein with the nuclear pore complex. *J Virol.* 1998;72:6004-6013.
- (18) Weber J, Cheinsong Popov R, Callow D et al. Immunogenicity of the yeast recombinant p17/p24:Ty virus-like particles (p24-VLP) in healthy volunteers. *Vaccine.* 1995;13:831-834.
- (19) Vodicka MA, Koepp DM, Silver PA, Emerman M. HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection. *Genes Dev.* 1998;12:175-185.
- (20) Rogel ME, Wu LI, Emerman M. The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene prevents cell proliferation during chronic infection. *J Virol.* 1995;69:882-888.
- (21) Wei P, Garber ME, Fang SM, Fischer WH, Jones KA. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell.* 1998;92:451-462.
- (22) Herrmann CH, Rice AP. Lentivirus Tat proteins specifically associate with a cellular protein kinase, TAK, that hyperphosphorylates the carboxyl-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II: candidate for a Tat cofactor. *J Virol.* 1995;69:1612-1620.
- (23) Ohno M. [Importins and exportins: receptors involved in nucleocytoplasmic transport of proteins and RNAs]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* 1998;43:1255-1264.
- (24) Pollard VW, Malim MH. The HIV-1 Rev protein [In Process Citation]. *Annu Rev Microbiol.* 1998;52:491-532:491-532.
- (25) Goh WC, Rogel ME, Kinsey CM et al. HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. *Nat Med.* 1998;4:65-71.
- (26) Earl PL, Koenig S, Moss B. Biological and immunological properties of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein: analysis of proteins with truncations and deletions expressed by recombinant vaccinia viruses. *J Virol.* 1991;65:31-41.

## Literaturverzeichnis

---

- (27) Lu S, Santoro JC, Fuller DH, Haynes JR, Robinson HL. Use of DNAs expressing HIV-1 Env and noninfectious HIV-1 particles to raise antibody responses in mice. *Virology*. 1995;209:147-154.
- (28) Wyatt R, Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science*. 1998;280:1884-1888.
- (29) Hoxie JA, Alpers JD, Rackowski JL et al. Alterations in T4 (CD4) protein and mRNA synthesis in cells infected with HIV. *Science*. 1986;234:1123-1127.
- (30) Crise B, Buonocore L, Rose JK. CD4 is retained in the endoplasmic reticulum by the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein precursor. *J Virol*. 1990;64:5585-5593.
- (31) Margottin F, Bour SP, Durand H et al. A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol Cell*. 1998;1:565-574.
- (32) Schubert U, Anton LC, Bacik I et al. CD4 glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway. *J Virol*. 1998;72:2280-2288.
- (33) Foti M, Mangasarian A, Piguet V et al. Nef-mediated clathrin-coated pit formation. *J Cell Biol*. 1997;139:37-47.
- (34) Le Gall S, Erdtmann L, Benichou S et al. Nef interacts with the mu subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC I molecules. *Immunity*. 1998;8:483-495.
- (35) Greenberg ME, Bronson S, Lock M et al. Co-localization of HIV-1 Nef with the AP-2 adaptor protein complex correlates with Nef-induced CD4 down-regulation. *EMBO J*. 1997;16:6964-6976.
- (36) Piguet V, Chen YL, Mangasarian A et al. Mechanism of Nef-induced CD4 endocytosis: Nef connects CD4 with the mu chain of adaptor complexes. *EMBO J*. 1998;17:2472-2481.
- (37) Bryant M, Ratner L. Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:523-527.
- (38) Chazal N, Carriere C, Gay B, Boulanger P. Phenotypic characterization of insertion mutants of the human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor expressed in recombinant baculovirus-infected cells. *J Virol*. 1994;68:111-122.
- (39) Facke M, Janetzko A, Shoeman RL, Krausslich HG. A large deletion in the matrix domain of the human immunodeficiency virus gag gene redirects virus particle assembly from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum. *J Virol*. 1993;67:4972-4980.

## Literaturverzeichnis

---

- (40) Freed EO, Myers DJ, Risser R. Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:4650-4654.
- (41) Freed EO, Orenstein JM, Buckler White AJ, Martin MA. Single amino acid changes in the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block virus particle production. *J Virol.* 1994;68:5311-5320.
- (42) Freed EO, Englund G, Martin MA. Role of the basic domain of human immunodeficiency virus type 1 matrix in macrophage infection. *J Virol.* 1995;69:3949-3954.
- (43) Freed EO, Martin MA. Virion incorporation of envelope glycoproteins with long but not short cytoplasmic tails is blocked by specific, single amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 matrix. *J Virol.* 1995;69:1984-1989.
- (44) Gheysen D, Jacobs E, de Foresta F et al. Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell.* 1989;59:103-112.
- (45) Gottlinger HG, Sodroski JG, Haseltine WA. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:5781-5785.
- (46) Shoji S, Tashiro A, Kubota Y. Antimyristoylation of GAG proteins in human T-cell lymphotropic and human immunodeficiency viruses by N-myristoyl glycinyl diethylacetal. *Ann N Y Acad Sci.* 1990;616:97-115.
- (47) Spearman P, Wang JJ, Vander Heyden N, Ratner L. Identification of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein domains essential to membrane binding and particle assembly. *J Virol.* 1994;68:3232-3242.
- (48) Wang CT, Barklis E. Assembly, processing, and infectivity of human immunodeficiency virus type 1 gag mutants. *J Virol.* 1993;67:4264-4273.
- (49) Wang CT, Zhang Y, McDermott J, Barklis E. Conditional infectivity of a human immunodeficiency virus matrix domain deletion mutant. *J Virol.* 1993;67:7067-7076.
- (50) Wills JW, Craven RC, Weldon RA, Jr., Nelle TD, Erdie CR. Suppression of retroviral MA deletions by the amino-terminal membrane-binding domain of p60src. *J Virol.* 1991;65:3804-3812.
- (51) Yuan X, Yu X, Lee TH, Essex M. Mutations in the N-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block intracellular transport of the Gag precursor. *J Virol.* 1993;67:6387-6394.
- (52) Zhou W, Parent LJ, Wills JW, Resh MD. Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids. *J Virol.* 1994;68:2556-2569.

## Literaturverzeichnis

---

- (53) Dorfman T, Mammano F, Haseltine WA, Gottlinger HG. Role of the matrix protein in the virion association of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J Virol.* 1994;68:1689-1696.
- (54) Freed EO, Martin MA. Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions. *J Virol.* 1996;70:341-351.
- (55) Mammano F, Kondo E, Sodroski J, Bukovsky A, Gottlinger HG. Rescue of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein mutants by envelope glycoproteins with short cytoplasmic domains. *J Virol.* 1995;69:3824-3830.
- (56) Yu X, Yuan X, Matsuda Z, Lee TH, Essex M. The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions. *J Virol.* 1992;66:4966-4971.
- (57) Barouch DH. Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. *Nature.* 2008;455:613-619.
- (58) Gaschen B. Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. *Science.* 2002;296:2354-2360.
- (59) Walker BD, Korber BT. Immune control of HIV: the obstacles of HLA and viral diversity. *Nature Immunol.* 2001;2:473-475.
- (60) Barouch DH. Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. *Nature.* 2008;455:613-619.
- (61) Montefiori D, Sattentau Q, Flores J, Esparza J, Mascola J. Antibody-based HIV-1 vaccines: recent developments and future directions. *PLoS Med.* 2007;4:e348.
- (62) Kwong PD, Wyatt R, Robinson J et al. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature.* 1998;393:648-659.
- (63) Wyatt R. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature.* 1998;393:705-711.
- (64) Barouch DH. Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. *Nature.* 2008;455:613-619.
- (65) Chen B. Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core. *Nature.* 2005;433:834-841.
- (66) Wei X. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature.* 2003;422:307-312.
- (67) Richman DD, Wrin T, Little SJ, Petropoulos CJ. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:4144-4149.

## Literaturverzeichnis

---

- (68) Li Y. Broad HIV-1 neutralization mediated by CD4-binding site antibodies. *Nature Med.* 2007;13:1032-1034.
- (69) Zhou T. Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120. *Nature.* 2007;445:732-737.
- (70) Sun ZY. HIV-1 broadly neutralizing antibody extracts its epitope from a kinked gp41 ectodomain region on the viral membrane. *Immunity.* 2008;28:52-63.
- (71) Haynes BF. Cardiolipin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *Science.* 2005;308:1906-1908.
- (72) Frey G. A fusion-intermediate state of HIV-1 gp41 targeted by broadly neutralizing antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:3739-3744.
- (73) Baba TW. Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype protect against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection. *Nature Med.* 2000;6:200-206.
- (74) Mascola JR. Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nature Med.* 2000;6:207-210.
- (75) Barouch DH. Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. *Nature.* 2008;455:613-619.
- (76) Barouch DH. Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. *Nature.* 2008;455:613-619.
- (77) Pantaleo G, Demarest JF, Soudeyns H et al. Major expansion of CD8+ T cells with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV. *Nature.* 1994;370:463-467.
- (78) Koup RA. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol.* 1994;68:4650-4655.
- (79) Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 1994;68:6103-6110.
- (80) Musey L, Hughes J, Schacker T et al. Cytotoxic-T-cell responses, viral load, and disease progression in early human immunodeficiency virus type 1 infection [see comments]. *N Engl J Med.* 1997;337:1267-1274.
- (81) Kiepiela P. Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature.* 2004;432:769-775.
- (82) Kiepiela P, Ngumbela K, Thobakgale C et al. CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat Med.* 2007;13:46-53.

## Literaturverzeichnis

---

- (83) Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S et al. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science*. 1999;283:857-860.
- (84) Jin X, Bauer DE, Tuttleton SE et al. Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Exp Med*. 1999;189:991-998.
- (85) Phillips RE, Rowland Jones S, Nixon DF et al. Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature*. 1991;354:453-459.
- (86) Allen TM, O'Connor DH, Jing P et al. Tat-specific cytotoxic T lymphocytes select for SIV escape variants during resolution of primary viraemia. *Nature*. 2000;407:386-390.
- (87) Barouch DH. Eventual AIDS vaccine failure in a rhesus monkey by viral escape from cytotoxic T lymphocytes. *Nature*. 2002;415:335-339.
- (88) Barouch DH. Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. *Nature*. 2008;455:613-619.
- (89) Betts MR, Nason MC, West SM et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood*. 2006;107:4781-4789.
- (90) Precopio ML. Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8+ T cell responses. *J Exp Med*. 2007;204:1405-1416.
- (91) Darrah PA. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nature Med*. 2007;13:843-850.
- (92) Watkins DI, Burton DR, Kallas EG, Moore JP, Koff WC. Nonhuman primate models and the failure of the Merck HIV-1 vaccine in humans. *Nature Med*. 2008;14:617-621.
- (93) Seder RA, Darrah PA, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nature Rev Immunol*. 2008;8:247-258.
- (94) Chun TW. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature*. 1997;387:183-188.
- (95) Chun TW. Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4+ T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:8869-8873.
- (96) Douek DC. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature*. 2002;417:95-98.
- (97) Veazey RS. Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science*. 1998;280:427-431.

## Literaturverzeichnis

---

- (98) Mattapallil JJ. Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature*. 2005;434:1093-1097.
- (99) Li Q. Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature*. 2005;434:1148-1152.
- (100) Brenchley JM. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nature Med*. 2006;12:1365-1371.
- (101) Daniel MD, Kirchhoff F, Czajak SC, Sehgal PK, Desrosiers RC. Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene. *Science*. 1992;258:1938-1941.
- (102) Wyand MS, Manson KH, Garciamoll M, Montefiori D, Desrosiers RC. Vaccine protection by a triple deletion mutant of simian immunodeficiency virus. *Journal of Virology*. 1996;70:3724-3733.
- (103) Learmont JC, Geczy AF, Mills J et al. Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sydney Blood Bank Cohort. *N Engl J Med*. 1999;340:1715-1722.
- (104) Baba TW, Jeong YS, Pennick D et al. Pathogenicity of live, attenuated SIV after mucosal infection of neonatal macaques. *Science*. 1995;267:1820-1825.
- (105) Baba TW, Liska V, Khimani AH et al. Live attenuated, multiply deleted simian immunodeficiency virus causes AIDS in infant and adult macaques [see comments]. *Nat Med*. 1999;5:194-203.
- (106) Murphey-Corb M. A formalin-inactivated whole SIV vaccine confers protection in macaques. *Science*. 1989;246:1293-1297.
- (107) Flynn NM. Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *J Infect Dis*. 2005;191:654-665.
- (108) Pitisuttithum P. Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand. *J Infect Dis*. 2006;194:1661-1671.
- (109) Wille-Reece U. HIV Gag protein conjugated to a Toll-like receptor 7/8 agonist improves the magnitude and quality of Th1 and CD8+ T cell responses in nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:15190-15194.
- (110) Wille-Reece U. Toll-like receptor agonists influence the magnitude and quality of memory T cell responses after prime-boost immunization in nonhuman primates. *J Exp Med*. 2006;203:1249-1258.
- (111) Casimiro DR. Comparative immunogenicity in rhesus monkeys of DNA plasmid, recombinant vaccinia virus, and replication-defective adenovirus vectors expressing a human immunodeficiency virus type 1 gag gene. *J Virol*. 2003;77:6305-6313.

## Literaturverzeichnis

---

- (112) Graham BS. Phase 1 safety and immunogenicity evaluation of a multiclade HIV-1 DNA candidate vaccine. *J Infect Dis.* 2006;194:1650-1660.
- (113) Barouch DH, Craiu A, Kuroda MJ et al. Augmentation of immune responses to HIV-1 and simian immunodeficiency virus DNA vaccines by IL-2/Ig plasmid administration in rhesus monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:4192-4197.
- (114) Chong SY. Comparative ability of plasmid IL-12 and IL-15 to enhance cellular and humoral immune responses elicited by a SIVgag plasmid DNA vaccine and alter disease progression following SHIV(89.6P) challenge in rhesus macaques. *Vaccine.* 2007;25:4967-4982.
- (115) Luckay A. Effect of plasmid DNA vaccine design and in vivo electroporation on the resulting vaccine-specific immune responses in rhesus macaques. *J Virol.* 2007;81:5257-5269.
- (116) Liu J, Kjekken R, Mathiesen I, Barouch DH. Recruitment of antigen-presenting cells to the site of inoculation and augmentation of human immunodeficiency virus type 1 DNA vaccine immunogenicity by in vivo electroporation. *J Virol.* 2008;82:5643-5649.
- (117) Priddy FH. Safety and immunogenicity of a replication-incompetent adenovirus type 5 HIV-1 clade B gag/pol/nef vaccine in healthy adults. *Clin Infect Dis.* 2008;46:1769-1781.
- (118) Shiver JW. Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature.* 2002;415:331-335.
- (119) Catanzaro AT. Phase 1 safety and immunogenicity evaluation of a multiclade HIV-1 candidate vaccine delivered by a replication-defective recombinant adenovirus vector. *J Infect Dis.* 2006;194:1638-1649.
- (120) Amara RR, Villinger F, Altman JD et al. Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science.* 2001;292:69-74.
- (121) 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.
- (122) Barouch DH. Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. *Nature.* 2008;455:613-619.
- (123) Young KR, McBurney SP, Karkhanis LU, Ross TM. Virus-like particles: designing an effective AIDS vaccine. *Methods.* 2006;40:98-117.
- (124) Gay B, Tournier J, Chazal N, Carriere C, Boulanger P. Morphopoietic determinants of HIV-1 Gag particles assembled in baculovirus-infected cells. *Virology.* 1998;247:160-169.

## Literaturverzeichnis

---

- (125) Buonaguro L, Buonaguro FM, Tornesello ML et al. High efficient production of Pr55(gag) virus-like particles expressing multiple HIV-1 epitopes, including a gp120 protein derived from an Ugandan HIV-1 isolate of subtype A. *Antiviral Res.* 2001;49:35-47.
- (126) Haffar O, Garrigues J, Travis B et al. Human immunodeficiency virus-like, nonreplicating, gag-env particles assemble in a recombinant vaccinia virus expression system. *J Virol.* 1990;64:2653-2659.
- (127) Wagner R, Fliessbach H, Wanner G et al. Studies on processing, particle formation, and immunogenicity of the HIV-1 gag gene product: a possible component of a HIV vaccine. *Arch Virol.* 1992;127:117-137.
- (128) Yao Q, Kuhlmann FM, Eller R, Compans RW, Chen C. Production and characterization of simian--human immunodeficiency virus-like particles. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2000;16:227-236.
- (129) Sakuragi S, Goto T, Sano K, Morikawa Y. HIV type 1 Gag virus-like particle budding from spheroplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:7956-7961.
- (130) Tsunetsugu-Yokota Y, Morikawa Y, Isogai M et al. Yeast-derived human immunodeficiency virus type 1 p55(gag) virus-like particles activate dendritic cells (DCs) and induce perforin expression in Gag-specific CD8(+) T cells by cross-presentation of DCs. *J Virol.* 2003;77:10250-10259.
- (131) Young KR, Smith JM, Ross TM. Characterization of a DNA vaccine expressing a human immunodeficiency virus-like particle. *Virology.* 2004;327:262-272.
- (132) Qiu JT, Song R, Dettenhofer M et al. Evaluation of novel human immunodeficiency virus type 1 Gag DNA vaccines for protein expression in mammalian cells and induction of immune responses. *J Virol.* 1999;73:9145-9152.
- (133) Wagner R, Deml L, Wolf H. Polyvalent, recombinant HIV-1 virus-like particles: novel HIV-1 vaccine strategies. *Antibiot Chemother.* 1994;46:48-61.
- (134) Lu S, Santoro JC, Fuller DH, Haynes JR, Robinson HL. Use of DNAs expressing HIV-1 env and noninfectious HIV-1 particles to raise antibody responses in mice. *Virology.* 1995;209:147-154.
- (135) Osterrieder N, Wagner R, Brandmuller C et al. Protection against EHV-1 challenge infection in the murine model after vaccination with various formulations of recombinant glycoprotein gp14 (gB). *Virology.* 1995;208:500-510.
- (136) Lu S, Arthos J, Montefiori DC et al. Simian immunodeficiency virus DNA vaccine trial in macaques. *J Virol.* 1996;70:3978-3991.
- (137) Wagner R, Deml L, Notka F et al. Safety and immunogenicity of recombinant human immunodeficiency virus-like particles in rodents and rhesus macaques. *Intervirology.* 1996;39:93-103.

## Literaturverzeichnis

---

- (138) Wagner R, Teeuwesen VJ, Deml L et al. Cytotoxic T cells and neutralizing antibodies induced in rhesus monkeys by virus-like particle HIV vaccines in the absence of protection from SHIV infection. *Virology*. 1998;245:65-74.
- (139) Notka F, Stahl-Hennig C, Dittmer U, Wolf H, Wagner R. Accelerated clearance of SHIV in rhesus monkeys by virus-like particle vaccines is dependent on induction of neutralizing antibodies. *Vaccine*. 1999;18:291-301.
- (140) Paliard X, Liu Y, Wagner R et al. Priming of strong, broad, and long-lived HIV type 1 p55gag-specific CD8+ cytotoxic T cells after administration of a virus-like particle vaccine in rhesus macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2000;16:273-282.
- (141) Amara RR, Robinson HL. A new generation of HIV vaccines. *Trends Mol Med*. 2002;8:489-495.
- (142) Lundholm P, Leandersson AC, Christensson B et al. DNA mucosal HIV vaccine in humans. *Virus Res*. 2002;82:141-145.
- (143) Yao Q, Vuong V, Li M, Compans RW. Intranasal immunization with SIV virus-like particles (VLPs) elicits systemic and mucosal immunity. *Vaccine*. 2002;20:2537-2545.
- (144) van Harmelen JH, Shephard E, Thomas R et al. Construction and characterisation of a candidate HIV-1 subtype C DNA vaccine for South Africa. *Vaccine*. 2003;21:4380-4389.
- (145) Marques ET, Jr., Chikhlikar P, de Arruda LB et al. HIV-1 p55Gag encoded in the lysosome-associated membrane protein-1 as a DNA plasmid vaccine chimera is highly expressed, traffics to the major histocompatibility class II compartment, and elicits enhanced immune responses. *J Biol Chem*. 2003;278:37926-37936.
- (146) Yao Q, Bu Z, Vzorov A, Yang C, Compans RW. Virus-like particle and DNA-based candidate AIDS vaccines. *Vaccine*. 2003;21:638-643.
- (147) Radaelli A, Zanotto C, Perletti G et al. Comparative analysis of immune responses and cytokine profiles elicited in rabbits by the combined use of recombinant fowlpox viruses, plasmids and virus-like particles in prime-boost vaccination protocols against SHIV. *Vaccine*. 2003;21:2052-2064.
- (148) Bazhan SI, Belavin PA, Seregin SV et al. Designing and engineering of DNA-vaccine construction encoding multiple CTL-epitopes of major HIV-1 antigens. *Vaccine*. 2004;22:1672-1682.
- (149) Ellenberger D, Li B, Smith J et al. Optimization of a multi-gene HIV-1 recombinant subtype CRF02\_AG DNA vaccine for expression of multiple immunogenic forms. *Virology*. 2004;319:118-130.
- (150) Leung L, Srivastava IK, Kan E et al. Immunogenicity of HIV-1 Env and Gag in baboons using a DNA prime/protein boost regimen. *AIDS*. 2004;18:991-1001.

## Literaturverzeichnis

---

- (151) Mwau M, Cebere I, Sutton J et al. A human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) clade A vaccine in clinical trials: stimulation of HIV-specific T-cell responses by DNA and recombinant modified vaccinia virus Ankara (MVA) vaccines in humans. *J Gen Virol.* 2004;85:911-919.
- (152) Shinoda K, Xin KQ, Jounai N et al. Polygene DNA vaccine induces a high level of protective effect against HIV-vaccinia virus challenge in mice. *Vaccine.* 2004;22:3676-3690.
- (153) Smith JM, Amara RR, McClure HM et al. Multiprotein HIV type 1 clade B DNA/MVA vaccine: construction, safety, and immunogenicity in Macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2004;20:654-665.
- (154) Smith JM, Amara RR, Campbell D et al. DNA/MVA vaccine for HIV type 1: effects of codon-optimization and the expression of aggregates or virus-like particles on the immunogenicity of the DNA prime. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2004;20:1335-1347.
- (155) Yao Q, Zhang R, Guo L, Li M, Chen C. Th cell-independent immune responses to chimeric hemagglutinin/simian human immunodeficiency virus-like particles vaccine. *J Immunol.* 2004;173:1951-1958.
- (156) Amara RR, Sharma S, Patel M et al. Studies on the cross-clade and cross-species conservation of HIV-1 Gag-specific CD8 and CD4 T cell responses elicited by a clade B DNA/MVA vaccine in macaques. *Virology.* 2005;334:124-133.
- (157) Busch M, Abel K, Li J et al. Efficacy of a SHIV 89.6 proviral DNA vaccine against mucosal SIVmac239 challenge. *Vaccine.* 2005;23:4036-4047.
- (158) Deml L, Speth C, Dierich MP, Wolf H, Wagner R. Recombinant HIV-1 Pr55gag virus-like particles: potent stimulators of innate and acquired immune responses. *Mol Immunol.* 2005;42:259-277.
- (159) Ellenberger D, Wyatt L, Li B et al. Comparative immunogenicity in rhesus monkeys of multi-protein HIV-1 (CRF02\_AG) DNA/MVA vaccines expressing mature and immature VLPs. *Virology.* 2005;340:21-32.
- (160) Pal R, Wang S, Kalyanaraman VS et al. Polyvalent DNA prime and envelope protein boost HIV-1 vaccine elicits humoral and cellular responses and controls plasma viremia in rhesus macaques following rectal challenge with an R5 SHIV isolate. *J Med Primatol.* 2005;34:226-236.
- (161) Schilling R, Heil A, Langner K et al. A multivalent HIV-vaccine: development of a plasmid DNA for the expression of HIV envelope glycoproteins with hypervariable V3-loop domains. *Vaccine.* 2006;24:4648-4650.
- (162) Otten GR, Schaefer M, Doe B et al. Potent immunogenicity of an HIV-1 gag-pol fusion DNA vaccine delivered by in vivo electroporation. *Vaccine.* 2006;24:4503-4509.
- (163) Robinson HL, Torres CA. DNA vaccines. *Semin Immunol.* 1997;9:271-283.

## Literaturverzeichnis

---

- (164) Wagner R, Deml L, Schirmbeck R et al. Construction, expression and immunogenicity of chimeric HIV-1 virus-like particles. *Virology*. 1996;220:128-140.
- (165) Deml L, Kratochwil G, Osterrieder N et al. Increased incorporation of chimeric human immunodeficiency virus type 1 gp120 proteins into Pr55gag virus-like particles by an Epstein-Barr virus gp220/350-derived transmembrane domain. *Virology*. 1997;235:10-25.
- (166) Wagner R, Teeuwesen VJ, Deml L et al. Cytotoxic T cells and neutralizing antibodies induced in rhesus monkeys by virus-like particle HIV vaccines in the absence of protection from SHIV infection. *Virology*. 1998;245:65-74.
- (167) Smith JM, Amara RR, Wyatt LS et al. Studies in macaques on cross-clade T cell responses elicited by a DNA/MVA AIDS vaccine, better conservation of CD8 than CD4 T cell responses. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2005;21:140-144.
- (168) Wyatt LS, Earl PL, Liu JY et al. Multiprotein HIV type 1 clade B DNA and MVA vaccines: construction, expression, and immunogenicity in rodents of the MVA component. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2004;20:645-653.
- (169) O'Neill E, Martinez I, Villinger F et al. Protection by SIV VLP DNA prime/protein boost following mucosal SIV challenge is markedly enhanced by IL-12/GM-CSF co-administration. *J Med Primatol*. 2002;31:217-227.
- (170) Buonaguro L, Visciano ML, Tornesello ML et al. Induction of systemic and mucosal cross-clade neutralizing antibodies in BALB/c mice immunized with human immunodeficiency virus type 1 clade A virus-like particles administered by different routes of inoculation. *J Virol*. 2005;79:7059-7067.
- (171) Yamshchikov GV, Ritter GD, Vey M, Compans RW. Assembly of SIV virus-like particles containing envelope proteins using a baculovirus expression system. *Virology*. 1995;214:50-58.
- (172) Rovinski B, Rodrigues L, Cao SX et al. Induction of HIV type 1 neutralizing and env-CD4 blocking antibodies by immunization with genetically engineered HIV type 1-like particles containing unprocessed gp160 glycoproteins. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1995;11:1187-1195.
- (173) Kornbluth RS, Stone GW. Immunostimulatory combinations: designing the next generation of vaccine adjuvants. *J Leukoc Biol*. 2006;80:1084-1102.
- (174) Vogel FR. Improving vaccine performance with adjuvants. *Clin Infect Dis*. 2000;30 Suppl 3:S266-S270.
- (175) Burdin N, Guy B, Moingeon P. Immunological foundations to the quest for new vaccine adjuvants. *BioDrugs*. 2004;18:79-93.
- (176) Ebensen T, Guzman CA. Immune modulators with defined molecular targets: cornerstone to optimize rational vaccine design. *Hum Vaccin*. 2008;4:13-22.

## Literaturverzeichnis

---

- (177) Kandimalla ER, Bhagat L, Li Y et al. Immunomodulatory oligonucleotides containing a cytosine-phosphate-2'-deoxy-7-deazaguanosine motif as potent toll-like receptor 9 agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:6925-6930.
- (178) Schmidt M, Anton K, Nordhaus C et al. Cytokine and Ig-production by CG-containing sequences with phosphodiester backbone and dumbbell-shape. *Allergy*. 2006;61:56-63.
- (179) Barrat FJ, Meeker T, Gregorio J et al. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med*. 2005;202:1131-1139.
- (180) Banchereau J, Briere F, Caux C et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811.
- (181) Steinman RM, Pope M. Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy. *J Clin Invest*. 2002;109:1519-1526.
- (182) McKenna K, Beignon AS, Bhardwaj N. Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity. *J Virol*. 2005;79:17-27.
- (183) Asselin-Paturel C, Trinchieri G. Production of type I interferons: plasmacytoid dendritic cells and beyond. *J Exp Med*. 2005;202:461-465.
- (184) Rossi M, Young JW. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol*. 2005;175:1373-1381.
- (185) Lore K, Betts MR, Brenchley JM et al. Toll-like receptor ligands modulate dendritic cells to augment cytomegalovirus- and HIV-1-specific T cell responses. *J Immunol*. 2003;171:4320-4328.
- (186) Hartmann G, Weiner GJ, Krieg AM. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:9305-9310.
- (187) Kadowaki N, Ho S, Antonenko S et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med*. 2001;194:863-869.
- (188) Heil F, Hemmi H, Hochrein H et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*. 2004;303:1526-1529.
- (189) Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*. 2004;303:1529-1531.
- (190) Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2001;2:675-680.
- (191) Pulendran B. Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors. *Immunol Rev*. 2004;199:227-250.

## Literaturverzeichnis

---

- (192) Pulendran B. Variegation of the immune response with dendritic cells and pathogen recognition receptors. *J Immunol.* 2005;174:2457-2465.
- (193) Kato H, Takeuchi O, Sato S et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature.* 2006;441:101-105.
- (194) Kato H, Sato S, Yoneyama M et al. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity.* 2005;23:19-28.
- (195) Toka FN, Pack CD, Rouse BT. Molecular adjuvants for mucosal immunity. *Immunol Rev.* 2004;199:100-112.
- (196) Napolitani G, Rinaldi A, Bertoni F, Sallusto F, Lanzavecchia A. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol.* 2005;6:769-776.
- (197) Warger T, Osterloh P, Rechtsteiner G et al. Synergistic activation of dendritic cells by combined Toll-like receptor ligation induces superior CTL responses in vivo. *Blood.* 2006;108:544-550.
- (198) Sun S, Zhang X, Tough DF, Sprent J. Type I interferon-mediated stimulation of T cells by CpG DNA. *J Exp Med.* 1998;188:2335-2342.
- (199) Cho HJ, Hayashi T, Datta SK et al. IFN-alpha beta promote priming of antigen-specific CD8+ and CD4+ T lymphocytes by immunostimulatory DNA-based vaccines. *J Immunol.* 2002;168:4907-4913.
- (200) Datta SK, Redecke V, Prilliman KR et al. A subset of Toll-like receptor ligands induces cross-presentation by bone marrow-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2003;170:4102-4110.
- (201) Cho HJ, Takabayashi K, Cheng PM et al. Immunostimulatory DNA-based vaccines induce cytotoxic lymphocyte activity by a T-helper cell-independent mechanism. *Nat Biotechnol.* 2000;18:509-514.
- (202) Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T et al. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature.* 2003;421:852-856.
- (203) Toka FN, Gierynska M, Suvas S, Schoenberger SP, Rouse BT. Rescue of memory CD8+ T cell reactivity in peptide/TLR9 ligand immunization by codelivery of cytokines or CD40 ligation. *Virology.* 2005;331:151-158.
- (204) Hume DA, Underhill DM, Sweet MJ et al. Macrophages exposed continuously to lipopolysaccharide and other agonists that act via toll-like receptors exhibit a sustained and additive activation state. *BMC Immunol.* 2001;2:11.
- (205) Yang Y, Huang CT, Huang X, Pardoll DM. Persistent Toll-like receptor signals are required for reversal of regulatory T cell-mediated CD8 tolerance. *Nat Immunol.* 2004;5:508-515.

## Literaturverzeichnis

---

- (206) Schirmbeck R, Riedl P, Zurbriggen R, Akira S, Reimann J. Antigenic epitopes fused to cationic peptide bound to oligonucleotides facilitate Toll-like receptor 9-dependent, but CD4+ T cell help-independent, priming of CD8+ T cells. *J Immunol.* 2003;171:5198-5207.
- (207) Datta SK, Cho HJ, Takabayashi K, Horner AA, Raz E. Antigen-immunostimulatory oligonucleotide conjugates: mechanisms and applications. *Immunol Rev.* 2004;199:217-226.
- (208) Wille-Reece U, Wu CY, Flynn BJ, Kedl RM, Seder RA. Immunization with HIV-1 Gag protein conjugated to a TLR7/8 agonist results in the generation of HIV-1 Gag-specific Th1 and CD8+ T cell responses. *J Immunol.* 2005;174:7676-7683.
- (209) Arce S, Nawar HF, Russell MW, Connell TD. Differential binding of *Escherichia coli* enterotoxins LT-IIa and LT-IIb and of cholera toxin elicits differences in apoptosis, proliferation, and activation of lymphoid cells. *Infect Immun.* 2005;73:2718-2727.
- (210) Fukuta S, Magnani JL, Twiddy EM, Holmes RK, Ginsburg V. Comparison of the carbohydrate-binding specificities of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins LTh-I, LT-IIa, and LT-IIb. *Infect Immun.* 1988;56:1748-1753.
- (211) Johnson SM, Lerche NW, Pappagianis D et al. Safety, antigenicity, and efficacy of a recombinant coccidioidomycosis vaccine in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1111:290-300.
- (212) Schnitzler AC, Burke JM, Wetzler LM. Induction of cell signaling events by the cholera toxin B subunit in antigen-presenting cells. *Infect Immun.* 2007;75:3150-3159.
- (213) Kawamura YI, Kawashima R, Shirai Y et al. Cholera toxin activates dendritic cells through dependence on GM1-ganglioside which is mediated by NF-kappaB translocation. *Eur J Immunol.* 2003;33:3205-3212.
- (214) Williams NA. Immune modulation by the cholera-like enterotoxin B-subunits: from adjuvant to immunotherapeutic. *Int J Med Microbiol.* 2000;290:447-453.
- (215) Pizza M, Giuliani MM, Fontana MR et al. Mucosal vaccines: non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants. *Vaccine.* 2001;19:2534-2541.
- (216) Plant A, Williams NA. Modulation of the immune response by the cholera-like enterotoxins. *Curr Top Med Chem.* 2004;4:509-519.
- (217) Barr TA, Carlring J, Heath AW. Co-stimulatory agonists as immunological adjuvants. *Vaccine.* 2006;24:3399-3407.
- (218) Dullforce P, Sutton DC, Heath AW. Enhancement of T cell-independent immune responses in vivo by CD40 antibodies. *Nat Med.* 1998;4:88-91.

## Literaturverzeichnis

---

- (219) Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Ofringa R, Melief CJ. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature*. 1998;393:480-483.
- (220) Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature*. 1998;393:474-478.
- (221) Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F et al. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature*. 1998;393:478-480.
- (222) Barr TA, Heath AW. Enhanced in vivo immune responses to bacterial lipopolysaccharide by exogenous CD40 stimulation. *Infect Immun*. 1999;67:3637-3640.
- (223) Barr TA, McCormick AL, Carling J, Heath AW. A potent adjuvant effect of CD40 antibody attached to antigen. *Immunology*. 2003;109:87-92.
- (224) Harcourt JL, Brown MP, Anderson LJ, Tripp RA. CD40 ligand (CD154) improves the durability of respiratory syncytial virus DNA vaccination in BALB/c mice. *Vaccine*. 2003;21:2964-2979.
- (225) Manoj S, Griebel PJ, Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk. Targeting with bovine CD154 enhances humoral immune responses induced by a DNA vaccine in sheep. *J Immunol*. 2003;170:989-996.
- (226) Tripp RA, Jones L, Anderson LJ, Brown MP. CD40 ligand (CD154) enhances the Th1 and antibody responses to respiratory syncytial virus in the BALB/c mouse. *J Immunol*. 2000;164:5913-5921.
- (227) Cusi MG, Del Vecchio MT, Terrosi C et al. Immune-reconstituted influenza virosome containing CD40L gene enhances the immunological and protective activity of a carcinoembryonic antigen anticancer vaccine. *J Immunol*. 2005;174:7210-7216.
- (228) Xiang R, Primus FJ, Ruehlmann JM et al. A dual-function DNA vaccine encoding carcinoembryonic antigen and CD40 ligand trimer induces T cell-mediated protective immunity against colon cancer in carcinoembryonic antigen-transgenic mice. *J Immunol*. 2001;167:4560-4565.
- (229) Stone GW, Barzee S, Snarsky V et al. Multimeric soluble CD40 ligand and GITR ligand as adjuvants for human immunodeficiency virus DNA vaccines. *J Virol*. 2006;80:1762-1772.
- (230) Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 1983;166:557-580.
- (231) Sharp PM, Li WH. The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res*. 1987;15:1281-1295.

## Literaturverzeichnis

---

- (232) Ikemura T. Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. *Mol Biol Evol.* 1985;2:13-34.
- (233) Zhou Z, Schnake P, Xiao L, Lal AA. Enhanced expression of a recombinant malaria candidate vaccine in *Escherichia coli* by codon optimization. *Protein Expr Purif.* 2004;34:87-94.
- (234) Duan J, Antezana MA. Mammalian mutation pressure, synonymous codon choice, and mRNA degradation. *J Mol Evol.* 2003;57:694-701.
- (235) Numa F, Hirabayashi K, Tsunaga N et al. Elevated levels of syndecan-1 expression confer potent serum-dependent growth in human 293T cells. *Cancer Res.* 1995;55:4676-4680.
- (236) Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979;7:1513-1523.
- (237) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988;239:487-491.
- (238) Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:7297-7301.
- (239) Akinc A, Thomas M, Klibanov AM, Langer R. Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *J Gene Med.* 2005;7:657-663.
- (240) Brunner S, Furtbauer E, Sauer T, Kursa M, Wagner E. Overcoming the nuclear barrier: cell cycle independent nonviral gene transfer with linear polyethylenimine or electroporation. *Mol Ther.* 2002;5:80-86.
- (241) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual.* 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.
- (242) Nakamura Y, Kameoka M, Tobiume M et al. A chain section containing epitopes for cytotoxic T, B and helper T cells within a highly conserved region found in the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. *Vaccine.* 1997;15:489-496.
- (243) Takahashi H, Cohen J, Hosmalin A et al. An immunodominant epitope of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp160 recognized by class I major histocompatibility complex molecule-restricted murine cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:3105-3109.
- (244) Hanke T, Schneider J, Gilbert SC, Hill AV, McMichael A. DNA multi-CTL epitope vaccines for HIV and *Plasmodium falciparum*: immunogenicity in mice. *Vaccine.* 1998;16:426-435.
- (245) Slifka MK, Matloubian M, Ahmed R. Bone marrow is a major site of long-term antibody production after acute viral infection. *J Virol.* 1995;69:1895-1902.

## Literaturverzeichnis

---

- (246) Graf M, Shao Y, Zhao Q et al. Cloning and characterization of a virtually full-length HIV type 1 genome from a subtype B'-Thai strain representing the most prevalent B-clade isolate in China. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1998;14:285-288.
- (247) Su L, Graf M, Zhang Y et al. Characterization of a virtually full-length human immunodeficiency virus type 1 genome of a prevalent intersubtype (C/B') recombinant strain in China. *J Virol*. 2000;74:11367-11376.
- (248) Bart PA, Goodall R, Barber T et al. EV01: a phase I trial in healthy HIV negative volunteers to evaluate a clade C HIV vaccine, NYVAC-C undertaken by the EuroVacc Consortium. *Vaccine*. 2008;26:3153-3161.
- (249) McCormack S, Stohr W, Barber T et al. EV02: a Phase I trial to compare the safety and immunogenicity of HIV DNA-C prime-NYVAC-C boost to NYVAC-C alone. *Vaccine*. 2008;26:3162-3174.
- (250) Gomez CE, Najera JL, Jimenez V et al. Generation and immunogenicity of novel HIV/AIDS vaccine candidates targeting HIV-1 Env/Gag-Pol-Nef antigens of clade C. *Vaccine*. 2007;25:1969-1992.
- (251) Rodenburg CM, Li Y, Trask SA et al. Near full-length clones and reference sequences for subtype C isolates of HIV type 1 from three different continents. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2001;17:161-168.
- (252) von Poblitzki A, Wagner R, Niedrig M et al. Identification of a region in the Pr55gag-polyprotein essential for HIV-1 particle formation. *Virology*. 1993;193:981-985.
- (253) Zhang Y, Barklis E. Effects of nucleocapsid mutations on human immunodeficiency virus assembly and RNA encapsidation. *J Virol*. 1997;71:6765-6776.
- (254) Gottwein E, Krausslich HG. Analysis of human immunodeficiency virus type 1 Gag ubiquitination. *J Virol*. 2005;79:9134-9144.
- (255) Kelly BN, Howard BR, Wang H et al. Implications for viral capsid assembly from crystal structures of HIV-1 Gag(1-278) and CA(N)(133-278). *Biochemistry*. 2006;45:11257-11266.
- (256) Gottwein E, Jager S, Habermann A, Krausslich HG. Cumulative mutations of ubiquitin acceptor sites in human immunodeficiency virus type 1 gag cause a late budding defect. *J Virol*. 2006;80:6267-6275.
- (257) Ganser-Pornillos BK, Yeager M, Sundquist WI. The structural biology of HIV assembly. *Curr Opin Struct Biol*. 2008;18:203-217.
- (258) Schneider R, Campbell M, Nasioulas G, Felber BK, Pavlakis GN. Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation. *J Virol*. 1997;71:4892-4903.

## Literaturverzeichnis

---

- (259) Graf M, Bojak A, Dem L et al. Concerted Action of Multiple cis- Acting Sequences Is Required for Rev Dependence of Late Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gene Expression. *Journal of Virology*. 2000;74.
- (260) Bojak A, Wild J, Deml L, Wagner R. Impact of codon usage modification on T cell immunogenicity and longevity of HIV-1 gag-specific DNA vaccines. *Intervirology*. 2002;45:275-286.
- (261) Wagner R, Graf M, Bieler K et al. Rev-independent expression of synthetic gag-pol genes of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus: implications for the safety of lentiviral vectors [In Process Citation]. *Hum Gene Ther*. 2000;11:2403-2413.
- (262) Hatfield D, Oroszlan S. The where, what and how of ribosomal frameshifting in retroviral protein synthesis. *Trends Biochem Sci*. 1990;15:186-190.
- (263) Parkin NT, Chamorro M, Varmus HE. Human immunodeficiency virus type 1 gag-pol frameshifting is dependent on downstream mRNA secondary structure: demonstration by expression in vivo. *J Virol*. 1992;66:5147-5151.
- (264) Marcheschi RJ, Staple DW, Butcher SE. Programmed ribosomal frameshifting in SIV is induced by a highly structured RNA stem-loop. *J Mol Biol*. 2007;373:652-663.
- (265) Schmidt CS, Morrow WJ, Sheikh NA. Smart adjuvants. *Expert Rev Vaccines*. 2007;6:391-400.
- (266) Petrovsky N. Novel human polysaccharide adjuvants with dual Th1 and Th2 potentiating activity. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 2:S2-S9.
- (267) Ott G, Barchfeld GL, Van Nest G. Enhancement of humoral response against human influenza vaccine with the simple submicron oil/water emulsion adjuvant MF59. *Vaccine*. 1995;13:1557-1562.
- (268) Podda A, Del Giudice G. MF59-adjuvanted vaccines: increased immunogenicity with an optimal safety profile. *Expert Rev Vaccines*. 2003;2:197-203.
- (269) Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L et al. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature*. 1992;357:80-82.
- (270) Graf D, Muller S, Korthauer U et al. A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. *Eur J Immunol*. 1995;25:1749-1754.
- (271) Anand SX, Viles-Gonzalez JF, Badimon JJ, Cavusoglu E, Marmur JD. Membrane-associated CD40L and sCD40L in atherothrombotic disease. *Thromb Haemost*. 2003;90:377-384.
- (272) Matthies KM, Newman JL, Hodzic A, Wingett DG. Differential regulation of soluble and membrane CD40L proteins in T cells. *Cell Immunol*. 2006;241:47-58.

## Literaturverzeichnis

---

- (273) Pietravalle F, Lecoanet-Henchoz S, Aubry JP et al. Cleavage of membrane-bound CD40 ligand is not required for inducing B cell proliferation and differentiation. *Eur J Immunol.* 1996;26:725-728.
- (274) Karpusas M, Hsu YM, Wang JH et al. 2 A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand. *Structure.* 1995;3:1426.
- (275) Kornbluth RS. An expanding role for CD40L and other tumor necrosis factor superfamily ligands in HIV infection. *J Hematother Stem Cell Res.* 2002;11:787-801.
- (276) Skountzou I, Quan FS, Gangadhara S et al. Incorporation of glycosylphosphatidylinositol-anchored granulocyte- macrophage colony-stimulating factor or CD40 ligand enhances immunogenicity of chimeric simian immunodeficiency virus-like particles. *J Virol.* 2007;81:1083-1094.
- (277) Holler N, Tardivel A, Kovacsovics-Bankowski M et al. Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol Cell Biol.* 2003;23:1428-1440.
- (278) Suvas S, Singh V, Sahdev S, Vohra H, Agrewala JN. Distinct role of CD80 and CD86 in the regulation of the activation of B cell and B cell lymphoma. *J Biol Chem.* 2002;277:7766-7775.
- (279) Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:111-35.:111-135.
- (280) Zingler K, Littman DR. Truncation of the cytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein increases env incorporation into particles and fusogenicity and infectivity. *J Virol.* 1993;67:2824-2831.
- (281) Owens RJ, Rose JK. Cytoplasmic domain requirement for incorporation of a foreign envelope protein into vesicular stomatitis virus. *J Virol.* 1993;67:360-365.
- (282) Freed EO. Viral late domains. *J Virol.* 2002;76:4679-4687.
- (283) Prabu-Jeyabalan M, Nalivaika EA, King NM, Schiffer CA. Viability of a drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 protease variant: structural insights for better antiviral therapy. *J Virol.* 2003;77:1306-1315.
- (284) Blum A, Bottcher J, Heine A, Klebe G, Diederich WE. Structure-guided design of C2-symmetric HIV-1 protease inhibitors based on a pyrrolidine scaffold. *J Med Chem.* 2008;51:2078-2087.
- (285) Parker KC, Bednarek MA, Coligan JE. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J Immunol.* 1994;152:163-175.
- (286) Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics.* 1999;50:213-219.

## Literaturverzeichnis

---

- (287) Nielsen M, Lundegaard C, Lund O, Kesmir C. The role of the proteasome in generating cytotoxic T-cell epitopes: insights obtained from improved predictions of proteasomal cleavage. *Immunogenetics*. 2005;57:33-41.
- (288) Bevan MJ. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med*. 1976;143:1283-1288.
- (289) Wolfers J, Lozier A, Raposo G et al. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med*. 2001;7:297-303.
- (290) Yewdell JW, Norbury CC, Bennink JR. Mechanisms of exogenous antigen presentation by MHC class I molecules in vitro and in vivo: implications for generating CD8+ T cell responses to infectious agents, tumors, transplants, and vaccines. *Adv Immunol*. 1999;73:1-77.:1-77.
- (291) Reimann J, Schirmbeck R. Alternative pathways for processing exogenous and endogenous antigens that can generate peptides for MHC class I-restricted presentation. *Immunol Rev*. 1999;172:131-52:131-152.
- (292) Heath WR, Carbone FR. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2001;1:126-134.
- (293) Willey RL, Smith DH, Lasky LA et al. In vitro mutagenesis identifies a region within the envelope gene of the human immunodeficiency virus that is critical for infectivity. *J Virol*. 1988;62:139-147.
- (294) Nguyen DG, Hildreth JE. Involvement of macrophage mannose receptor in the binding and transmission of HIV by macrophages. *Eur J Immunol*. 2003;33:483-493.
- (295) Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*. 2000;100:587-597.
- (296) Burgdorf S, Kautz A, Bohnert V, Knolle PA, Kurts C. Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science*. 2007;316:612-616.
- (297) Toapanta FR, Craigo JK, Montelaro RC, Ross TM. Reduction of anti-HIV-1 Gag immune responses during co-immunization: immune interference by the HIV-1 envelope. *Curr HIV Res*. 2007;5:199-209.
- (298) Hartz PA, McMiller T, Scott-Wright D, Samuel KP. Low level expression of the HIV-1 Nef protein in transiently transfected COS-1 cells in culture. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)*. 2003;49:1101-1107.
- (299) Mazzei GJ, Edgerton MD, Losberger C et al. Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active. *J Biol Chem*. 1995;270:7025-7028.

## Literaturverzeichnis

---

- (300) Martin G, Roy J, Barat C et al. Human immunodeficiency virus type 1-associated CD40 ligand transactivates B lymphocytes and promotes infection of CD4+ T cells. *J Virol.* 2007;81:5872-5881.
- (301) Lin FC, Peng Y, Jones LA, Verardi PH, Yilma TD. Incorporation of CD40 ligand into the envelope of pseudotyped single-cycle Simian immunodeficiency viruses enhances immunogenicity. *J Virol.* 2009;83:1216-1227.

## Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
AIDS	erworbenes Immundefizienz Syndrom ( <i>acquired immunodeficiency syndrome</i> )
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
APZ	Antigen präsentierende Zelle
AS	Aminosäure
BGH	Wachstumshormon des Rindes ( <i>bovine growth hormone</i> )
BCIP	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CA	Kapsid-Protein ( <i>capsid</i> )
ca.	circa
CaP	Calciumphosphat ( $\text{CaHPO}_4^-$ )
cap	5'-Monomethylguanosin-Kappe
CMV	Cytomegalie Virus
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten ( <i>cytotoxic T-lymphocytes</i> )
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Titrplex)
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Env	Hüllprotein ( <i>envelope</i> )
ER	Endoplasmatisches Reticulum
<i>et al.</i>	und andere
EtOH	Ethanol
FKS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
Gag	Gruppenspezifisches Antigen
gp	Glycoprotein
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	Wasser aus einer Milliporeanlage
HIV	Humanes Immunschwäche-Virus
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Merettich-Peroxidase)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobuline
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-D-thiogalactosid
k	kilo (10 <sup>3</sup> )

# Abkürzungsverzeichnis

---

Kana	Kanamycin
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LTR	<i>long terminal repeat</i>
m	Meter oder Milli
M	Molar (Mol pro Liter)
MA	Matrixprotein
mA	Milliampere
MCS	<i>multiple cloning site</i> (Polylinker)
MeOH	Methanol
MHC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex ( <i>major-histocompatibility complex</i> )
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger</i> )
μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )
MW	Molekulargewicht
n	Nano (10 <sup>-9</sup> )
NBT	<i>4-Nitro blue tetrazolium chloride</i>
NC	<i>Nucleocapsid</i>
Nef	<i>negative factor</i>
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
p	pico (10 <sup>-9</sup> )
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
pfu	<i>plaque forming units</i>
pH	Konzentration der H <sup>+</sup> Ionen in einer Lösung
pol	Polymerase
PR	Protease
Rev	<i>regulator of expression of viral proteins</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RRE	<i>rev responsive element</i>
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SA	Spleiß-Akzeptor (3'-Spleißstelle)
SD	Spleiß-Donor (5'-Spleißstelle)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
s	Sekunde
SIV	Affen-Immundefizienz Virus
Strep	Streptomycin

# Abkürzungsverzeichnis

---

SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
Taq	DNA-abhängige DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TAR	<i>tat activating region</i>
Tat	<i>transactivator of transcription</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung ( <i>tris buffered saline</i> )
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TM	Transmembranprotein
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
TTBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20 ( <i>tween-tris buffered saline</i> )
U	Enzymeinheit ( <i>Unit</i> )
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
V3	dritte variable Domäne des äußeren HIV-Hüllproteins gp120
vgl.	Vergleich
Vif	Viraler Infektiositätsfaktor
VLP	Virusähnlicher Partikel ( <i>virus like particle</i> )
Vol.	Volumen
Vpr	Virales Protein R
Vpu	Virales Protein U
Vpx	Virales Protein X
VSV	vesikulärer Stomatitisvirus
W	Watt
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

## Curriculum Vitae

### Persönliche Daten

Name, Vorname: Bredl, Simon  
Straße: Rattenberger Str. 3  
PLZ, Wohnort: 94267 Prackenbach  
E-mail: sibre@gmx.de  
Geburtsdatum: 09.02.1979  
Geburtsort: Deggendorf  
Familienstand: Ledig  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Ausbildung

1985 – 1989                      Grundschule Moosbach/Prackenbach

1989 – 1998                      Dominikus von Linprun Gymnasium, Viechtach  
Abschluß: Abitur; Note: 2,3

09/1998 – 06/1999              Grundwehrdienst als Santitätssoldat, Im Rahmen der  
Ausbildung zum Materialbuchhalter Erwerb der  
Führerscheinklassen CE

11/1999 – 01/2005              Studium der Biologie an der Universität Regensburg

2001                                Vordiplom; Durchschnittsnote: 2,4

05/2003 – 08/2003              Molekularbiologisches Praktikum KardioGenetisches Labor,  
Universitätsklinikum Charitè, Berlin

11/2003 – 12/2003              Diplomprüfungen, Durchschnittsnote: 1,1

01/2004 – 01/2005              Diplomarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und  
Hygiene, Uniklinikum Regensburg, Arbeitsgruppe Ralf Wagner;  
Note: 1,0

## Curriculum Vitae

---

- 03/2005 – 02/2009      Promotion am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Uniklinikum Regensburg, Arbeitsgruppe Ralf Wagner
- 03/2009                      Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Uniklinikum Regensburg, Arbeitsgruppe Susanne Modrow

## Publikationen & Manuskripte

### Publikationen

Immunogenicity and efficacy of immunodeficiency virus-like particles pseudotyped with the G protein of vesicular stomatitis virus.

Kuate S, Stahl-Hennig C, Stoiber H, Nchinda G, Floto A, Franz M, Sauermann U, **Bredl S**, Deml L, Ignatius R, Norley S, Racz P, Tenner-Racz K, Steinman RM, Wagner R, Uberla K.

Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) Pr55<sup>gag</sup> virus-like particles are potent activators of human monocytes

Cornelia Speth, Dr.; **Simon Bredl**; Magdalena Hagleitner; Jens Wild, Dr.; Manfred Dierich, Prof. Dr.; Hans Wolf, Prof. Dr.; Josef Schroeder, Dr.; Ludwig Deml, Dr. Ralf Wagner

### Vorträge

#### **GfV München, 2006; AIDS Vaccine Amsterdam, 2006; Foringen Symposium München, 2006**

Activation of Innate Immune Responses by Human Immunodeficiency Virus Type-1 (HIV-1) Pr55<sup>gag</sup> Virus-Like Particles (VLP)

Melanie Wiesel, **Simon Bredl\***, Jens Wild, Cornelia Speth, Ludwig Deml, and Ralf Wagner

#### **Foringen Symposium München, 2007**

Generation, Production and Immunogenicity of Pseudotyped HIV-1 Virus-like Particles

**Simon Bredl**, Katharina Böckl, Josef Köstler, Jens Wild, Hans Wolf and Ralf Wagner

## Poster

### **GfV Berlin, 2003**

T-Helper 1-Type Adjuvant Properties of HIV-1 Pr55<sup>gag</sup> Virus-Like Particles  
to Increase the Immunogenicity of Soluble Polypeptides

Ludwig Deml, Jens Wild, Volker Hermann, **Simon Bredl**, Hans Wolf und Ralf  
Wagner

### **GfV Tübingen, 2004; ESGT Tampere, 2004; Keystone Symposia on Molecular Mechanisms of HIV Pathogenesis and HIV Vaccine Development, 2004**

Human Immunodeficiency Virus Type-1 (HIV-1) Pr55<sup>gag</sup> Virus-like Particles: A Potent  
Activator of Innate and Acquired Immune Responses

Ludwig Deml, Jens Wild, **Simon Bredl**, Cornelia Speth, Manfred Dierich, Hans Wolf  
und Ralf Wagner

### **DÖAK Wien, 2005; GfV Hannover, 2005**

Activation of Innate and Acquired Immune Responses by Human Immunodeficiency  
Virus Type-1 Pr55<sup>gag</sup> Virus-like Particles

**Simon Bredl**, Ludwig Deml, Jens Wild, Josef Schröder, Cornelia Speth, Manfred  
Dierich, Hans Wolf and Ralf Wagner

### **DÖAK Frankfurt, 2007**

Induction of Immune Responses by Human Immunodeficiency Virus Type-1 (HIV-1)  
Pr55<sup>gag</sup> Virus-like Particles (VLP) and the Impact of the Producer System upon  
Activation of Innate Immune Responses

**Simon Bredl**, Simone Sertl, Melanie Wiesel, Josef Köstler, Jens Wild,  
and Ralf Wagner

**DGGT Heidelberg, 2007**

Design of a Virus-Like Particle Based HIV-1 Vaccine Containing a Fusogenic Surface Protein for Improved Uptake and Co-delivery of CD40 Ligand as an Activator of Dendritic Cells

**Simon Bredl**, Josef Köstler, Jens Wild, Hans Wolf and Ralf Wagner

**Eurovirology Nürnberg, 2007; AIDS Vaccine Seattle, 2007**

Influence of HIV-1 Gag Derived Virus Like Particles on Maturation and Activation on Human Dendritic Cells

Josef Köstler, Simone Sertl, **Simon Bredl**, Jens Wild, Melanie Wiesel and Ralf Wagner

**GfV Heidelberg, 2008**

Generation, Production and Immunogenicity of Pseudotyped HIV-1 Virus-like Particles

**Simon Bredl**, Josef Köstler, Jens Wild, Melanie Wiesel, Hans Wolf and Ralf Wagner

Mammalian versus Baculovirus derived HIV-1 Gag Virus Like Particles impact on Maturation and Activation of Human Dendritic Cells

Josef Köstler, Simone Sertl, **Simon Bredl**, Melanie Wiesel, Jens Wild and Ralf Wagner

**Foringen Symposium Herrsching, 2008**

Design of a Virus-Like Particle Based HIV-1 Vaccine Containing a Fusogenic Surface Protein for Improved Uptake and Co-delivery of CD40 Ligand as an Activator of Dendritic Cells

**Simon Bredl**, Katharina Böckl, Josef Köstler, Jens Wild, Hans Wolf and Ralf Wagner

### Danksagung

Bei Prof. Dr. Ralf Wagner will ich mich für das interessante Thema dieser Arbeit und für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken. Desweiteren für jegliche Unterstützung, sei es die finanzielle oder geistige, und für die Möglichkeit an vielen Kongressen teilzunehmen, um meine Ergebnisse präsentieren zu können. Aber am wichtigsten, für den Freiraum eigene Ideen in die Arbeit einbringen zu können.

Herrn Prof. Dr. Hans Wolf danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Regensburg

Herrn Prof. Dr. Hans Robert Kalbitzer möchte ich für die Übernahme des Erstgutachtens danken.

Herrn Prof. Dr. Richard Warth und Frau Prof. Dr. Charlotte Förster möchte ich für die schnelle Zusage als Drittprüfer und als Vorsitzende für meine Promotionsprüfung danken.

Dr. Josef Köstler möchte ich besonders für die Betreuung dieser Arbeit danken. Schön, dass du mir mit Rat und Tat zur Seite standest. Die Zusammenarbeit mit dir hat mir viel Freude bereitet.

Ein besonderer Dank geht an:

1. Stelle an meine erstklassigen Labormädels Asli, Kristina, Patrizia und Simone für die tolle Arbeitsatmosphäre, auch wenns musikalisch nicht immer gepasst hat, und die vielen vergnüglichen Abende beim Laboessen. Ich vermisse euch. Danke auch fürs Korrekturlesen meiner Arbeit.

Dr. Jens Wild, für dessen geistige und tatkräftige Unterstützung bei vielen der immunologischen Experimente.

## Danksagung

---

Den Rest von Josefs PTVDC Gruppe: Kathi, Kathrin, Nicole und Philip für so manche Ideen und Anregungen für Experimente. Vielen Dank Kathi und Philip fürs Korrekturlesen.

Auch dem Rest der Wagners sei für die vielen außerarbeitlichen Unternehmungen, Anregungen, Ideen und Hilfen für so manches Experiment gedankt.

Meinen Freundeskreis will ich nicht unerwähnt lassen. Meinen langjährigen Viechtacher Freunden Tom, Flo, Hans, Susi und Irene sowie den ganzen Regensburgern Josh, Juha, Uli, Julia und Daniel „Blendi“ will ich für alles was nicht mit der Arbeit zu tun hatte, für das entgegengebrachte Vertrauen in Sachen Hochzeitsvorbereitungen und –begleitungen danken. Insbesondere Tom, der mir in harten Zeiten beistand. Ein dickes Dankeschön geht an Juha für die konstruktiven Korrekturen dieser Arbeit, für das Bekämpfen meiner Satzungenetüme und für die Weitervermittlung an Prof. Dr. Modrow.

Die wichtigsten Personen zum Schluss.

Meiner Freundin Ramona danke ich für ihre Liebe und moralische Unterstützung.

Meinen Eltern und meiner Schwester Katrin möchte ich ganz besonders danken. Ohne den starken Zusammenhalt in schweren Zeiten und ohne eure Unterstützung in allen Lebenslagen wäre diese Arbeit nie zustande gekommen.