

HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN



Immunogene und immunsuppressive Eigenschaften des transmembranen Hüllproteins gp41 von HIV

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Virologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl. Biol. Rayk Behrendt

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter/innen: 1.
 2.
 3.

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Pathogenese der HIV-1 Infektion	3
1.2	Partikel Aufbau und Genomstruktur des HIV-1	5
1.3	Struktur und Funktion der HIV-1 Proteine	
1.3.1	Die gruppenspezifischen Antigene	6
1.3.2	Die viralen Enzyme	6
1.3.3	Die Oberflächenproteine	7
1.3.3.1	Das Oberflächenhüllprotein gp120	8
1.3.3.2	Das transmembrane Hüllprotein gp41	9
1.3.4	Die regulatorischen und akzessorischen Proteine	12
1.4	Der Replikationszyklus von HIV-1	13
1.5	Wechselwirkungen des humanen Immunsystems mit HIV-1	14
1.5.1	HIV-1 und das angeborene Immunsystem	15
1.5.2	Die HIV-1 spezifische T-Zell-vermittelte adaptive Immunantwort	15
1.5.3	Neutralisierende Antikörper gegen die Hüllproteine von HIV-1	16
1.5.3.1	Neutralisierende monoklonale Antikörper gegen gp120	17
1.5.3.2	Neutralisierende monoklonale Antikörper gegen die MPER von gp41	18
1.5.4	HIV-1 vermittelte Immunsuppression	20
1.6	HIV Neutralisationstests	22
1.7	Zielsetzung der Arbeit	22
2	Material und Methoden	
2.1	Material	
2.1.1	Chemikalien	24
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	24
2.1.3	Geräte	24
2.1.4	Antikörper	25
2.1.5	Primer	25
2.1.6	Peptide & Pepsotmembranen	26
2.1.7	Plasmide	26
2.1.8	Zellen	27
2.1.9	Viren	27
2.2	Methoden	
2.2.1	Arbeiten mit Nukleinsäuren	
2.2.1.1	Plasmid-Präparation aus <i>Escherichia coli</i>	27
2.2.1.2	Isolation genomischer DNA	28
2.2.1.3	Isolation von Gesamt-RNA	28
2.2.1.4	Reinigung von DNA-Fragmenten	28
2.2.1.5	Restriktionsverdau	28
2.2.1.6	Ligation	28
2.2.1.7	Transformation	28
2.2.1.8	Agarosegel Elektrophorese	29
2.2.1.9	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	30

2.2.2	PCR-Techniken	30
2.2.2.1	Standard PCR	30
2.2.2.2	real time PCR	31
2.2.2.3	Charakterisierung der real time PCR	32
2.2.2.4	Sequenzierung	33
2.2.2.5	Reverse Transkription	33
2.2.3	Arbeiten mit Proteinen und Peptiden	
2.2.3.1	Expression rekombinanter Proteine in <i>E.coli</i>	33
2.2.3.2	Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA-Agarose	34
2.2.3.3	Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	34
2.2.3.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen und Peptiden	35
2.2.3.5	Acetonfällung von Proteinen	35
2.2.4	Immunologische Techniken	
2.2.4.1	Western-Blot	35
2.2.4.2	Enzym Linked Immunosorbend Assay (ELISA)	36
2.2.4.3	Durchflusscytometrie	36
2.2.4.4	Epitopkartierungen	37
2.2.5	Zellkulturarbeiten	
2.2.5.1	Umgang mit Zelllinien	37
2.2.5.2	Transfektion von Rat1-Zellen	37
2.2.6	Arbeiten mit infektiösem Virus	
2.2.6.1	Herstellung von infektiösen HIV-Stocks	38
2.2.6.2	<i>In vitro</i> Neutralisationstest	38
2.2.7	Tierversuche	
2.2.7.1	Versuchstiere	39
2.2.7.2	Applikation der Antigene	39
2.2.7.3	Beschichtung der Tefzel-Schläuche für die ballistische Immunsierung	40
2.2.7.4	Blutabnahme und Serumgewinnung	40
3.	Ergebnisse	
3.1	Optimierung des real time PCR basierten Neutralisationstests für Retroviren	41
3.1.1	Generierung und Charakterisierung von infektiösen Virusstocks aller Gruppen und Subtypen von HIV-1 sowie drei HIV-2 Isolaten	41
3.1.2	Etablierung eines Taqman PCR-Systems für die HIV-1 Gruppen N und O	42
3.1.3	Etablierung einer Taqman real time PCR für HIV-2 als interne Kontrolle	44
3.1.4	Etablierung der real time PCR-Systeme als Duplex PCR mit simultaner GAPDH Detektion	47
3.2	Generierung rekombinanter Hybridantigene zur Induktion gp41 spezifischer HIV breitneutralisierender Antikörper	48
3.2.1	Rekombinante Proteinantigene	49
3.2.1.1	Herstellung, Charakterisierung und Applikation der E2- substituierten Hybridantigene	50
3.2.1.2	Optimierung der Hybridantigene und Versuch der Induktion HIV- 1 breit neutralisierender Antikörper	52
3.2.1.3	Generierung von Hybridantigenen mit MPER Sequenzen der HIV- 1 Gruppen N und O	58
3.2.1.4	Sequentielle N-terminale Verlängerung von UR004	59

3.2.1.5	Vertauschen der Lokalisation der Epitope E1 und E2 im Hybridantigen UR004	61
3.2.1.6	Erhöhung des Reinheitsgrades von UR004 durch Modifikation mit einem 6xHIS-Tag	62
3.2.2	Test der Hybridantigene als DNA-Vakzine	64
3.2.2.1	Induktion HIV-1 neutralisierender Antikörper durch DNA Immunisierung mit einem PERV-p15E basierten Hybridprotein	65
3.2.2.2	DNA-Immunisierungsstudie mit KoRVp15E basierten Hybridantigenen	68
3.2.3	Reproduktion der Immunisierungsstudien	70
3.2.3.1	Untersuchungen zur Aktivierung des endogenen Rattenleukämievirus (RaLV)	74
3.2.3.2	Immunisierungsstudie bei der Firma Eurogentec	76
3.2.3.3	Immunisierung mit gp36 von HIV-2, einem nicht mit p15E verwandten transmembranen Hüllprotein	76
4.	Diskussion	
4.1	Schutz vor der HIV-Infektion	78
4.2	Neuartige Neutralisationstests zur Evaluierung von retroviralen Vakzinen	78
4.3	Kritische Betrachtung der Definition von Neutralisation	80
4.4	Epitopgerichtete Vakzinierung durch die Verwendung von Hybridantigenen	81
4.5	Der Wirkmechanismus von 2F5 und 4E10 als Schlüssel zur Induktion von HIV-1 bnAK	84
4.6	DNA Impfstoffe zur Induktion einer humoralen Immunantwort	88
4.7	Mögliche Ursache für die Veränderungen der Immunantwort in Wistar Ratten	89
4.8	Die Herausforderung: HIV-Impfstoffentwicklung	91
5.	Zusammenfassung	92
6.	Literaturverzeichnis	VI
7.	Anhang	
	A-I Verwandtschaft der KoRV-p15E basierten Hybridproteine	XXVII
	A-II Vektorkarten der in <i>E.coli</i> BL21 exprimierten Hybridantigene	XXVIII
	A-III Vektorkarten der in <i>E.coli</i> BL21 rekombinanten TM-Proteine	XXXI
	A-IV Vektorkarten der euakryontisch exprimierten Hybridantigene	XXXII
	A-V Aminosäuresequenzen der verwendeten Pepsotmembranen	XXXIV
	A-VI Detaillierte Auswertung der Epitope von Abbildung 3.36	XXXV
	A-VII Darstellung des NI-NTA gereinigten rekombinanten gp41	XXXVI
8.	Publikationsliste	
9.	Danksagung	
10.	Eidesstattliche Erklärung	
11.	Lebenslauf	

ad	addieren auf ein Gesamtvolumen von
AIDS	acquired immune deficiency syndrom
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
bnAK	breit neutralisierender Antikörper
Bp	Basenpaar(e)
CBP	Calmodulin-Bindeprotein
CCR	Chemokinrezeptoren für CC-Chemokine
CD	cluster of differentiation
CHR	C-terminale Helixregion
CTL	Cytotoxische T-Zellen
CXCR	Chemokinrezeptoren für CXC-Chemokine
DZ	Dendritische Zelle
ddH ₂ O	Aqua bidest
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E1	Epitop 1, N-terminal im transmembranen Hüllprotein
E2	Epitop 2, in der MPER von gp41
E.coli	Escherichia coli
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
Env	envelope protein, Hüllprotein
Fab	fragment antigen binding
FeLV	feline leukemia virus, Katzen-Leukämie-Virus
FIV	feline immune deficiency virus, Katzen-Immundefizienz-Virus
FKS	fötales Kälberserum
FP	Fusionspeptid
Gag	group specific antigen, Gruppenspezifisches Antigen
HAART	highly active anti retroviral therapy
HEPS	Hochgradig HIV-exponierte seronegative Personen
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HTLV	human T cell leukemia virus, humane T-Zell-Leukämie-Virus
Ig	Immunglobulin
IN	Integrase
kB	Kilo-Base
kDa	Kilo-Dalton
KoRV	Koala Retrovirus
LTR	long terminal repeat
MCS	multiple cloning site
MHC	major histocompatibility complex
MPER	Membranproximale Externe Region im transmembranen Hüllprotein
MSD	membrane spanning domain, Transmembrandomäne
MVA	modified vaccinia Ankara virus
nAK	neutralisierender Antikörper
Nef	negativer Faktor
NHR	N-terminale Helixregion
NIAID	National Institute of Allergy and Infectious Diseases
NIH	National Institute of Health
p.I.	post Immunisierung
PAA	Polyacryl Amid
PBS	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PDC	plasmacytoide Dendritische Zelle
PERV	porcines endogenes Retrovirus
PHI	primäre HIV-Infektion
PMT	Pasteurella multocida Toxin
Pol	Polymerase
POD	Peroxydase

PVP	Polyvinylpyrrolidon
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SCID	severe combined immune deficiency
SHB	Sechs-Helix-Bündel, six-helix-bundle
SHIV	SIV-HIV-Hybrid-Viren
SIV	simian immune deficiency virus, Affen-Immundefizienz-Virus
Tat	Transaktivator
TM	Transmembranes Hüllprotein
UNAIDS	United Nations Department of AIDS
Vif	virion infectivity factor
WHO	World Health Organisation
wt	Wildtyp

Aminosäuresequenzen sind im Ein-Buchstaben-Code dargestellt:

A:	Alanin
C:	Cystein
D:	Asparaginsäure
E:	Glutaminsäure
F:	Phenylalanin
G:	Glycin
H:	Histidin
I:	Isoleucin
K:	Lysin
L:	Leucin
M:	Methionin
N:	Asparagin
P:	Prolin
Q:	Glutamin
R:	Arginin
S:	Serin
T:	Threonin
V:	Valin
W:	Tryptophan
X:	beliebige Aminosäure
Y:	Tyrosin

Die Basen von Oligonucleotidsequenzen sind in folgendem Code aufgeführt:

A:	Adenin
C:	Cytosin
G:	Guanin
T:	Thymin

1. Einleitung

Seit mehr als 25 Jahren ist die durch das humane Immundefizienzvirus (HIV) ausgelöste fatale Immunschwäche AIDS (*acquired immune deficiency syndrome*) bekannt. In dieser Zeit hat sich HIV zu einer globalen Pandemie entwickelt. Heute sind weltweit mehr als 33 Millionen Menschen mit dem Virus infiziert (Abbildung 1.1). Jeden Tag kommt es zu 6800 Neuinfektionen und 5700 HIV/AIDS bedingten Todesfällen (UNAIDS, Epidemic Update December 2007). Die Eindämmung der globalen Ausbreitung dieses Virus stellt heute eine der größten wissenschaftlichen Herausforderungen dar. Trotzdem konnte bisher kein präventiver Impfstoff oder eine heilende Therapie für Infizierte entwickelt werden.

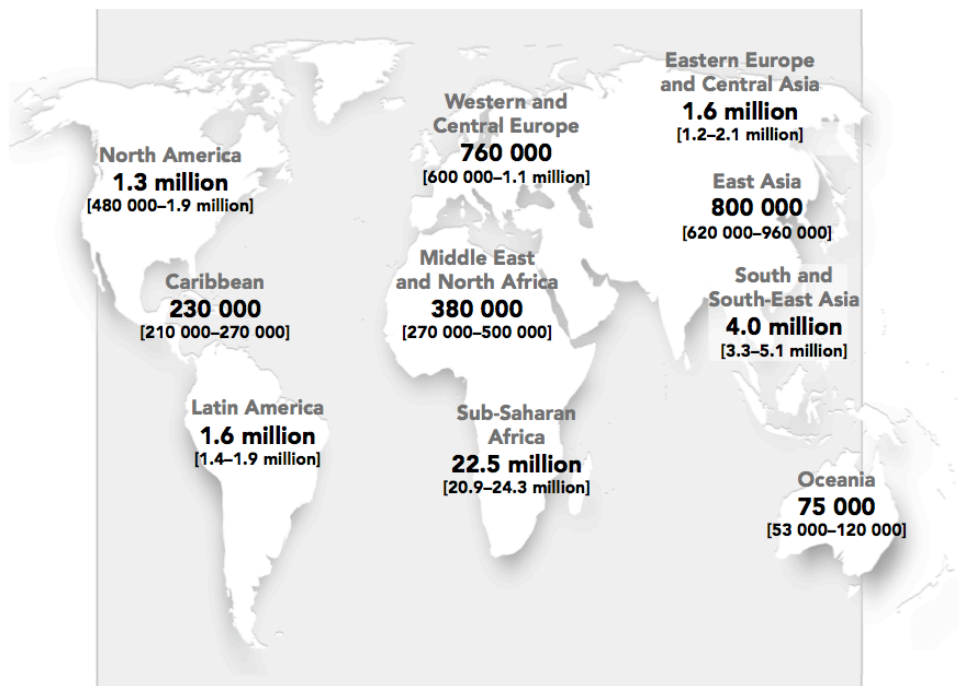


Abbildung 1.1: Übersicht über die weltweite Verbreitung von HIV-1. Die hervorgehobenen Zahlen stellen das Mittel aus den oberen und unteren berechneten Grenzwerte verschiedener epidemiologischer Modelle dar (UNAIDS, Epidemic Update December 2007).

Heute ist HIV/AIDS die vierthäufigste Todesursache weltweit. In afrikanischen Entwicklungsländern sank die mittlere Lebenserwartung in Folge des Auftretens von HIV/AIDS von 62 auf 42 Jahre, wobei sie in Botswana sogar unter 40 Jahren liegt (UNAIDS, Epidemic Update December 2007). Abgesehen von humanistischen Gesichtspunkten, belastet die hohe Sterberate in diesen Ländern das Gesundheitssystem. Die negativen Einflüsse der HIV-Pandemie auf diese sozioökonomischen Systeme haben wiederum eine negative Auswirkung auf die wirtschaftliche Entwicklung dieser Länder. Insofern muss HIV/AIDS in diesen Ländern als eine multiplexe existenzielle Gefährdung verstanden werden.

In den westlichen Industriestaaten können die wirtschaftlichen Auswirkungen der Pandemie von einer funktionierenden sozialen Infrastruktur kompensiert werden. Trotzdem ist HIV/AIDS auch hier immer noch eine Bedrohung. Ab Mitte der 1990er Jahre lies sich die Neuinfektionsrate durch massive mediale und bildungspolitische

Aufklärungskampagnen, sowie der konsequenten Anwendung antiretroviraler Therapien in westlichen Ländern stabilisieren. Allerdings gibt es seit dem Jahr 2000 wieder einen Anstieg der Neuinfektionen (Abbildung 1.2). Für das Jahr 2007 wurden in Deutschland ca. 3000 Neuinfektionen registriert. Das sind 900 Infizierte mehr pro Jahr als noch 1994. Das Robert Koch-Institut schätzte die Zahl der HIV-Infizierten in Deutschland auf 59.000 (Robert Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin 47/2007).

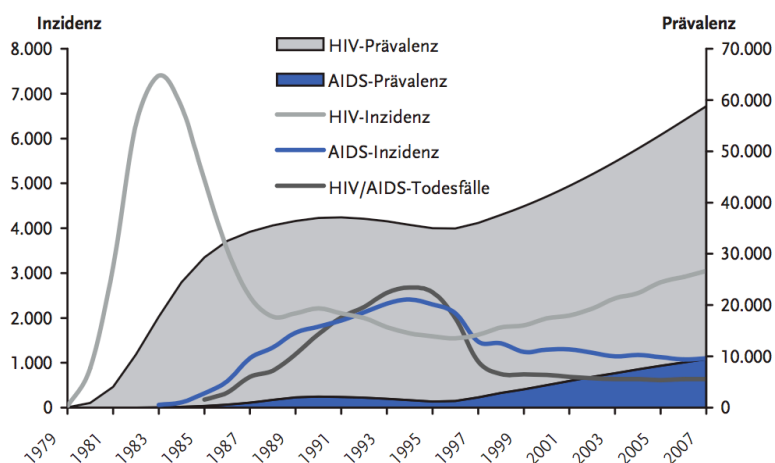


Abbildung 1.2: Entwicklung der HIV-Epidemie in Deutschland seit 1979. Seit 2000 steigt die HIV-Inzidenz in Deutschland wieder an (Epidemiologisches Bulletin Robert Koch-Institut 47/2007).

Die Charakterisierung der Immunschwäche AIDS und die Isolierung von HIV erfolgte in der ersten Hälfte der 1980er Jahre. 1981 berichteten Gottlieb et al. von einer Häufung der seltenen Pilzinfektion *Pneumocystis carinii* bei fünf homosexuellen Männern. Diese Infektion wurde sonst eher mit Immunsuppressionen assoziiert. Neben den *Pneumocystis carinii* Infektionen kam es ebenfalls zu einer Häufung von *Candida albicans* Infektionen, persistierenden Lymphadenopathien sowie dem Kaposi Sarkom, welches durch das Humane Herpesvirus 8 ausgelöst wird (Siegal et al., 1982, Lawrence et al., 1983). Das National Institute of Health (NIH) bezeichnete 1982 dieses Krankheitsbild erstmals als „*acquired immune deficiency syndrom*“ (AIDS).

Der Krankheitsverlauf war in nahezu 100 % der Fälle tödlich, wobei opportunistische Infektionen die Ursache der organischen Fehlfunktionen waren. Obwohl die Übertragungswege beschrieben werden konnten, blieb die Ursache der Immunschwäche ungeklärt. Auch die vermutete Restriktion der Infektion auf homosexuelle Männer wurde 1982 mit der ersten heterosexuellen Infektion einer Frau durch einen AIDS-kranken Mann widerlegt. Im Jahre 1983 isolierte die Arbeitsgruppe von Luc Montagnier am Institut Pasteur in Paris aus Blutproben von AIDS-Patienten den Erreger der Immunschwäche, ein Retrovirus. Aufgrund serologischer und morphologischer Eigenschaften wurde das entdeckte Retrovirus dem Genus der Lentiviren zugeordnet und als LAV (Lymphadenopathie-assoziiertes Virus) (Barre-Sinoussi et al., 1983) oder HTLV-III (Humanes T-Zell-Leukämie-Virus) bezeichnet (Gallo et al., 1984). Diese Befunde wurden durch weitere Arbeitsgruppen bestätigt (Levy et al., 1984, Popovic et al., 1984). Brown et al. benannten das Virus 1986 in *human immune deficiency virus* um (HIV, Brown et al., 1986).

Bis heute wurden zwei HIV-Typen isoliert, HIV-1 und HIV-2. Das für die globale Pandemie verantwortliche HIV-1 ist wahrscheinlich das Resultat mehrerer Transspeziesübertragungen vom Schimpansen auf den Menschen. Für HIV-1 wurden 7 Subtypen (A-G) beschrieben wobei die Verbreitung einzelner Subtypen an bestimmte geographische Gebiete gekoppelt ist. HIV-2 hingegen ist in Zentral- und Westafrika, sowie Indien endemisch. Es ist das Resultat von Transspeziesübertragungen von Raubmangabern auf den Menschen und wird in die Subtypen A-H untergliedert. Für klinisch relevante Infektionen mit HIV-2 zeigen sich nur die Subtypen A und B verantwortlich. Die übrigen Subtypen scheinen epidemiologisch unbedeutend zu sein (Chen et al., 1997). HIV-2 repliziert langsamer als HIV-1, was in einer geringeren Viruslast und damit in einer geringeren Übertragbarkeit resultiert (Popper et al., 1999, Shanmugam et al., 2000). Trotzdem blieben die genauen Ursachen für die territoriale Restriktion von HIV-2 bisher ungeklärt.

1.1 Pathogenese der HIV-1 Infektion

Die Übertragung von HIV kann durch Geschlechtsverkehr, Kontakt mit infiziertem Blut bzw. Blutprodukten oder von der Mutter auf ihr Kind (Mutter-Kind Übertragung) erfolgen. Die häufigste Ursache ist die sexuelle Übertragung des Virus. In einem Milliliter Ejakulat können sich bis zu 50 freie Viruspartikel und 5×10^4 infizierte Lymphocyten befinden (Levy et al., 1989).

Die Pathogenese der HIV-1 Infektion ist in drei Phasen (frühe, chronische und späte Phase) unterteilbar (Abbildung 1.3). Nach aktuellen Modellen geht man davon aus, dass die Übertragung des Virus über die Schleimhäute erfolgt. Dort kommt es direkt mit Zellen in Kontakt, die seinen Hauptrezeptor CD4 und den Corezeptor CCR5 tragen. Alternativ bindet das Virus mit dem Oberflächenmolekül gp120 an membranständigen C-Typ Lektinen (DC-SIGN, *dendritic cell specific intracellular adhesion molecule 3 (ICAM3)-grabbing non integrin*) von mukosalen Langerhans' Zellen (mLc). Die mLc wirken als *Shuttle* für das gebundene Virus in den Wirtsorganismus. Im lymphatischen Gewebe können dann $CD4^+/CCR5^+$ T-Zellen infiziert werden. Dieser Vorgang wird auch als „trans“-Infektion bezeichnet (Mascola et al., 2000). Die infizierten Lymphocyten wandern in die lokalen Lymphknoten und verbleiben dort bei aktiver Virusreplikation bis zu 2-6 Wochen nach Infektion. Dann tritt die erste Plasma Virämie auf. Sie ist durch eine sehr hohe Viruslast von mehr als 5×10^6 Kopien RNA/ml gekennzeichnet und wird als primäre HIV-Infektion bezeichnet (PHI). Das Virus breitet sich im Organismus aus. Im Verlauf der PHI sinkt die $CD4^+$ Zellzahl ab und steigt dann im Verlauf der Serokonversion wieder an. Während dieser Phase leidet der Patient oft an unspezifischen Symptomen wie Fieber, schmerzhaftes Lymphadenopathien oder Arthropathien, welche auch als Serokonversionskrankheiten bezeichnet werden. Nach 2-4 Wochen wird die primäre Virämie, oder auch frühe Phase der HIV-Infektion, durch die primäre Immunantwort beendet. Während dieser Phase kommt es zu einer Hyperaktivierung des Immunsystems, für deren Ausmaß ein direkter Zusammenhang mit der Progressionsgeschwindigkeit des Infizierten zu AIDS beschrieben wurde (Hazenberget al., 2003). Die Infektion kann aber vom Immunsystem nicht geklärt werden und das Virus besetzt Reservoir.

Die chronische Phase ist durch einen stark erhöhten Turnover von $CD4^+$ -T-Zellen gekennzeichnet. Die Lebensdauer einer $CD4^+$ -T-Zelle sinkt auf ca. 24-36 h, während sie im gesunden Organismus ca. 100 Tage zirkuliert. Der Abfall der $CD4^+$ -Zellzahl ist in diesem Zeitraum linear. Sinkt der Wert unter 200 $CD4^+$ -T-Zellen/ μ L beginnt sich die Zahl an $CD4^+$ -T-Zellen exponentiell zu verringern (Abbildung 1.3).

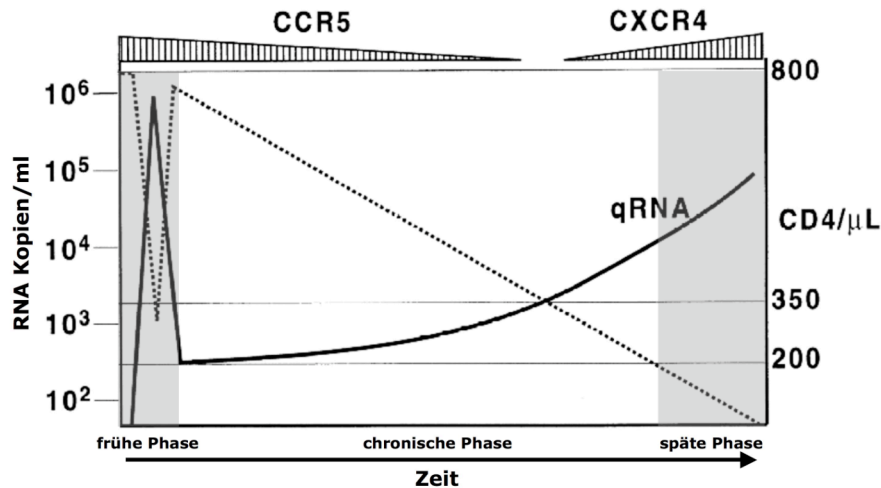


Abbildung 1.3: Typischer Verlauf der HIV-1 Infektion: Die durchgezogene Linie stellt den zeitlichen Verlauf (Abszisse) der Konzentration an HIV-RNA-Kopien/ml Blut (linke Ordinate) dar. Die gepunktete Linie zeigt den charakteristischen Verlauf der Konzentration an $CD4$ -Lymphocyten pro μ L Blut (rechte Ordinate). Zusätzlich sind die drei Phasen der HIV-Infektion an der Abszisse gekennzeichnet. Über den Graphen ist der jeweilig dominierende Corezeptortropismus dargestellt (nach Weber, 2001).

Der Infizierte befindet sich dann in der dritten, der späten Phase der Infektion. Die Ursache für die Beschleunigung des Verlustes an $CD4^+$ T-Zellen liegt im Wechsel des Corezeptortropismus von HIV. Während in der primären und chronischen Phase hauptsächlich Viren dominieren, die den Corezeptor CCR5 benutzen (R5-trope), zirkulieren in der späten Phase überwiegend Viren, die den Corezeptor CXCR4 (X4-trope) bzw. beide Corezeptoren (X4R5-dualtrope) benutzen. Die Ursache für diesen Wechsel ist eine Mutation in der variablen Region V3 der Oberflächenproteins gp120 von HIV-1. Infolge der Mutation kommt es zum Austausch zweier Aminosäuren, was wiederum dazu führt, dass ein N-Glycosylierungsmotiv zerstört wird (Polzer et al., 2002). Die daraus resultierenden X4-tropen Stämme sind infektiöser aber stärker sensitiv für neutralisierende Antikörper. Die erhöhte Sensitivität ermöglicht dem noch funktionierenden Immunsystem die Viruslast durch X4-tropen Stämme bis zur späten Phase zu kontrollieren. Erst dann erhalten die schneller replizierenden X4-tropen Viren einen Selektionsvorteil gegenüber den langsamer replizierenden R5-Stämmen und können sich etablieren. Da der Corezeptor CXCR4 auf ruhenden bzw. inaktiven Immunzellen, der Corezeptor CCR5 hauptsächlich auf aktivierten T-Zellen und Makrophagen exponiert wird, erschließt sich das Virus mit dem Wechsel des Corezeptortropismus ein breiteres Spektrum an infizierbaren Zellen. Eine weitere Eigenschaft der X4-tropen HIV-Stämme ist die Fähigkeit *in vitro* Syncytien (vielkernige Riesenzellen) durch Zellfusion zu induzieren. Sie werden deshalb auch als SI-Stämme (syncytium inducing) und die R5-tropen als NSI-Stämme (non syncytium inducing) bezeichnet.

1.2 Partikelbau und Genomstruktur des HIV-1

HIV gehört in der Familie der Retroviren zum Genus der Lentiviren. Es trägt seine Erbinformation in Form von RNA, welche in zwei identischen Kopien in einem Kapsid vorliegen. Neben der viralen RNA verpackt das Kapsid die viralen Proteine Protease (P), Integrase (IN) und der Virusfamilie den Namen gebende Reverse Transkriptase-Komplex (RT). Das aus dem Kapsidprotein p24 aufgebaute Kapsid wird von einer Lipidmembran umgeben, welche an der im Virus befindlichen Seite mit dem Matrixprotein (p17) ausgekleidet ist. Die Virusmembran trägt die beiden Hüllproteine gp120, das Oberflächenhüllprotein, und gp41, das transmembrane Hüllprotein. Sie leitet sich von der Zellmembran der Wirtszelle ab. Weitere im Virion befindliche Strukturen sind das RNA assoziierte Nukleopkapsidprotein (p7), das zwischen dem Kapsid und Matrixprotein befindliche Link-Protein (p6), sowie die Lateralkörperchen. Infektiöse Partikel haben einen Durchmesser von ca. 100 nm.

Das Genom von HIV-1 umfasst durchschnittlich 9800 Basenpaare (Bp). Es codiert für die gruppenspezifischen Antigene (Gag), die viral codierten Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Polymerase (Pol = Bezeichnung für Multienzymkomplex) sowie für die Oberflächenproteine gp120 und gp41 (Env). Die Genomregionen *gag*, *pol* und *env* sind charakteristisch für alle Retroviren. Eine Besonderheit der Lentiviren z.B. im Vergleich zu den γ -Retroviren ist, dass sie zusätzlich für akzessorische Proteine kodieren. Diese sind Spleißvarianten der charakteristischen Genprodukte und werden von alternativen Leserahmen transkribiert. HIV-1 codiert zusätzlich für die Proteine *Tev*, *Tat*, *Rev*, *Vif*, *Vpr*, *Vpu* und *Nef*. Sie sind z.B. an der Replikation und Proteinexpression sowie dem Unterdrücken der Immunantwort gegen infizierte Zellen beteiligt (Abbildung 1.4).

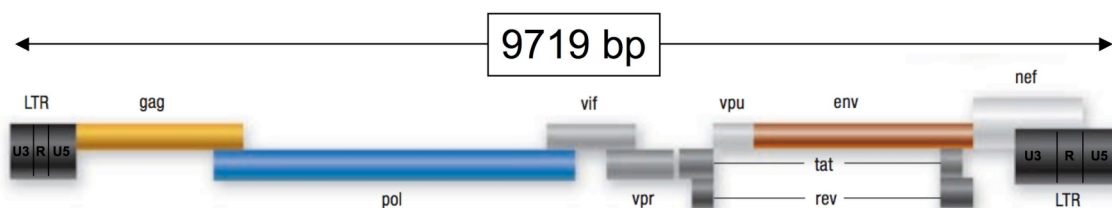


Abbildung 1.4: Darstellung des proviralen Genoms von HIV-1. Die angegebene Größe des Genoms bezieht sich auf das Referenzgenom HIV-1 HXB2 (Gene Bank Accession Number K03455). Die Gene *gag* (gelb), *pol* (blau) und *env* (braun) der Strukturproteine sind farblich gekennzeichnet. Die für die akzessorischen und regulatorischen Proteine codierenden Gene *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev* und *nef* sind hellgrau dargestellt. Das Genom wird von den LTR-Sequenzen (dunkelgrau) am 3'-Ende und am 5'-Ende flankiert („AIDS Vaccine Blueprint 2006“ www.iavi.org).

Im Verlauf der Infektion einer Wirtszelle katalysiert die Reverse Transkriptase die Umschreibung der viralen RNA in DNA, welche in das Wirtszellgenom integriert. Die integrierte virale DNA wird als Provirus bezeichnet. Während der reversen Transkription werden flankierende Bereiche des Genoms (LTR = *long terminal repeats*) generiert. Sie beinhalten Promotoren und Transkriptionsverstärker.

1.3 Struktur und Funktion der HIV-1 Proteine

1.3.1 Die gruppenspezifischen Antigene

Alle im *gag* codierten Proteine entstehen durch Spaltung eines 55 kDa großen Polyproteins. Die Spaltung erfolgt während der Partikelreifung durch die virale Protease in das 17 kDa große Matrixprotein (MA), das 24 kDa große Kapsidprotein (CA), das 6 kDa große Nukleokapsidprotein (NC), das 6 kDa große p6 sowie zwei niedermolekulare Spacerpeptide p1 und p2 (Wieggers et al., 1998). Das Matrixprotein interagiert mit der Lipidmembran über den myrestylierten N-Terminus (Nermut et al., 1994). Es bildet Trimere und ist in der Lage, selbständig virusähnliche Partikel aus 1200-2000 Gag Molekülen zu bilden (Gheysen et al., 1989). Im Kapsid sind das virale Genom und die viralen Enzyme verpackt. Es erscheint im Transmissionselektronenmikroskop als elektronendicht. Im Inneren des Kapsids ist die virale RNA mit dem Nukleokapsidprotein komplexiert. Diese Organisation begünstigt das Verpacken der RNA und eines t-RNALys-Primers, welcher die Initiation der reversen Transkription im Viruspartikel ermöglicht (De Rocquigny et al., 1992). Eine weitere Funktion des Ribnonukleo-Proteinkomplexes liegt in der Stabilisierung der proviralen DNA. Das kleinste funktionelle Genprodukt, Gag P6, ist essentiell für die Partikelfreisetzung. Mutationsstudien in einer Domäne (L-Domäne, L=*late*) des Proteins haben gezeigt, dass Aminosäureaustausche zu einer signifikanten Verringerung der Anzahl an freigesetzten neuen Virionen führen.

1.3.2 Die viralen Enzyme

Die *pol* Genprodukte werden in 5 % aller Translationsereignisse des Gag-Polyproteins an der polycistronischen viralen Volllänge-mRNA durch eine Verschiebung des Leserahmens realisiert. Durch die Leserahmenverschiebung in einer uridinreichen Region entsteht ein 160 kDa großes Gag/Pol-Polyprotein, welches erst nach der Knospung der Partikel (*budding*) autokatalytisch die virale Protease (PR) freisetzt. Anschließend werden die Enzyme Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN) aus dem Vorläuferprotein gespalten. Die Protease ist als Homodimer aktiv. Sie gehört zur zu den Aspartyl-Proteasen, welche wiederum der Pepsin-Familie zugeordnet werden. Die RT ist eine RNA abhängige DNA-Polymerase. Sie ist im Cytosol aktiv und katalysiert die Umschreibung der viralen RNA in DNA mit Hilfe des Matrixproteins, des Nukleokapsidproteins und des Nef-Proteins. Dieser Prozess findet unmittelbar nach dem Eintritt des Virus in die Wirtszelle statt. Im Vergleich zur zellulären DNA-abhängigen DNA-Polymerase hat die RT eine hohe Fehlerrate. Sie liegt bei einem Fehler alle 10^3 - 10^4 Basen, während zelluläre DNA-Polymerasen nur eine Fehlsynthese mit dem Faktor 10^{-7} - 10^{-9} begehen (Preston et al., 1988, Roberts et al., 1988, Levine et al., 1993). Das begünstigt die schnelle Etablierung von Fluchtmutanten im Wirtsorganismus. Aufgrund der Essentialität dieses Schrittes für die Virusreplikation ist die RT ein gutes Ziel für eine antiretrovirale Therapie. Reverse Transkriptase-Hemmer wie AZT, ddI oder ddC bilden in Kombination mit Proteasehemmern die Grundlage der HAART (*highly active retroviral therapy*). Die IN besitzt Endonuclease und Ligasefunktionen. Sie ist Bestandteil des Präintegrationskomplexes und schneidet die LTRs der durch die RT synthetisierten DNA

zwei bis drei Basen vor dem Strangende. Unter Benutzung dieser Enden wird die virale DNA in das Wirtsgenom integriert, wobei eine kovalente Verknüpfung der beiden Doppelstränge durch das Auffüllen der freien 3'-Enden erreicht wird.

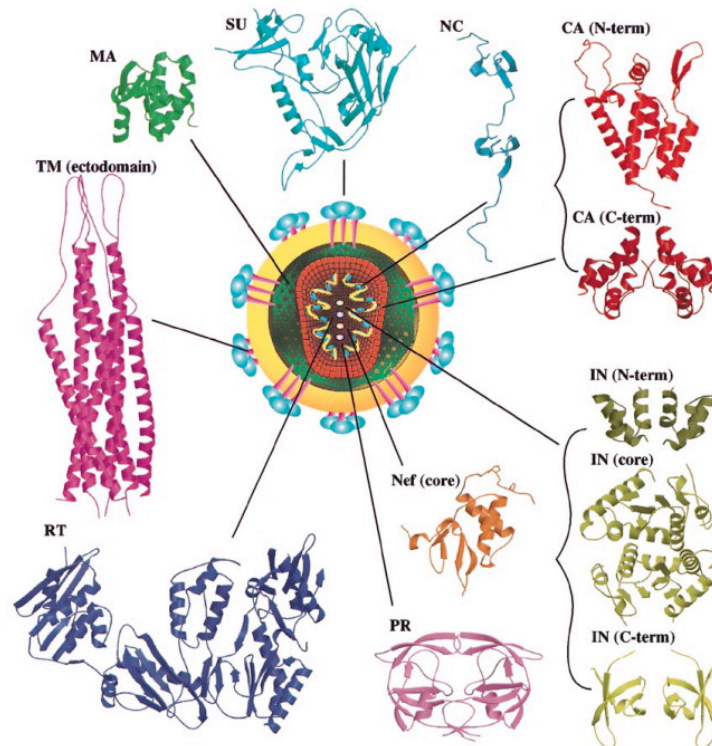


Abbildung 1.5: Maßstabgerechte Darstellung der molekularen Struktur der HIV-Proteine MA (Matrix-Protein, p17), SU (Oberflächenhüllprotein, gp120), NC (Nukleokapsidprotein, p7), CA (Kapsidprotein, p24), IN (Integrase), PR (Protease), Nef (negativer Faktor), RT (Polymerase/Reverse Transkriptase-Komplex), TM (transmembranes Hüllprotein, gp41, hier Ektodomäne des Simianen Immundefizienz Virus (SIV) als Modell) (Turner und Summers, 1999).

1.3.3 Die Oberflächenproteine

Die im *env* codierten Proteine werden als 160 kDa großes Vorläuferprotein (gp160, engl.: *Precursor*) synthetisiert. Die Synthese erfolgt am rauen Endoplasmatischen Reticulum (ER). Der *Precursor* wird mittels Chaperonen gefaltet und aus dem rauen ER in den Golgi-Apparat transportiert. Dort wird das gp160 durch eine zelluläre Furinprotease in das Oberflächenprotein gp120 und das transmembrane Hüllprotein gp41 gespalten. Auf der Zelloberfläche liegen die Proteine als trimerer Komplex aus je drei gp120 und gp41 Molekülen vor, wobei gp120 und gp41 nicht kovalent verbunden sind. Die Verankerung des Komplexes erfolgt über die Transmembrandomäne des gp41.

HIV interagiert über das gp120 spezifisch mit dem CD4 Molekül auf der Zelloberfläche von Monocyten. Eine weitere Bindung des gp120 an einen der Corezeptoren (überwiegend CCR5 oder CXCR4) bewirkt eine strukturelle Veränderung des Oberflächenproteinkomplexes aus gp120 und gp41. Dadurch wird das gp41 in die Lage versetzt, die Fusion von Virusmembran und Zellmembran zu vermitteln (siehe Abschnitt 1.3.3.2). Der Fusionsprozess findet unabhängig von einer Corezeptorbindung

analog auch bei γ -Retroviren wie dem Koala Retrovirus (KoRV) oder dem porcinen endogenem Retrovirus (PERV) statt. Da die Hüllproteine der γ -Retroviren andere Molekulargewichte besitzen, werden sie als Oberflächenhüllprotein gp70 und transmembranes Hüllprotein p15E bezeichnet.

1.3.3.1 Das Oberflächenhüllprotein gp120

Das Oberflächenhüllprotein gp120 wird in eine innere und eine äußere Domäne untergliedert. Beide sind durch ein viersträngiges β -*Bridging-Sheet* miteinander verbunden. Die innere Domäne besteht aus zwei α -Helices, einem β -Faltblatt und mehreren Schleifen. Hier clustern Epitope von nicht neutralisierenden Antikörpern (Moore et al., 1995). Daher wird diese Domäne auch als nicht „nicht-neutralisierende Seite“ des gp120 bezeichnet (Parren et al., 1999). In der äußeren Domäne befinden sich konstante und variable Regionen. Die variablen Schleifen des Proteins V1-V5 unterbrechen die konstanten Regionen C1-C5. Die C3-Region des gp120 stellt die CD4-Rezeptorbindestelle dar (Abbildung 1.6). Die hoch immunogenen und exponierten Regionen dieses Proteins sind die V-Domänen, hierbei insbesondere die V3-Region (Hwang et al., 1991). Sie definiert über die Aminosäuresequenz, welchen Corezeptor das Virus bindet (Hartley et al., 2005). Die V3-Region ist hoch variabel. Diese stark exponierte Region induziert hauptsächlich neutralisierende Antikörper und unterliegt somit dem größten Selektionsdruck (Evans & Desrosiers, 2001).

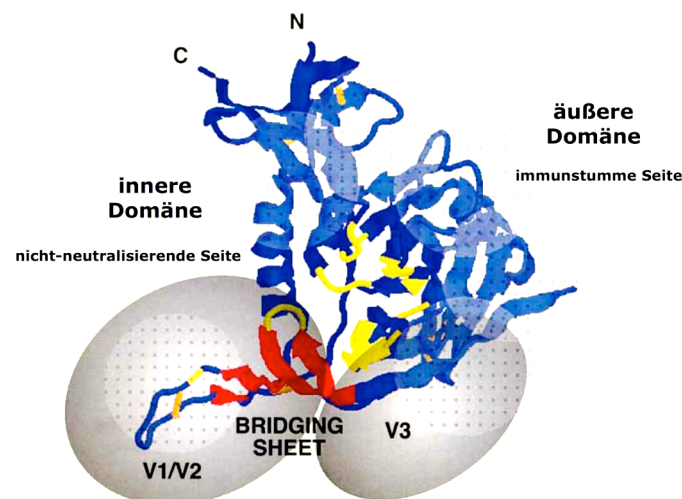


Abbildung 1.6: Darstellung des an den CD4-Rezeptor gebundenen gp120. Bereiche des gp120 mit direktem Kontakt zum CD4-Rezeptor sind gelb dargestellt. Das Verbindungsstück zwischen innerer und äußerer Domäne (*bridging sheet*) ist in rot gehalten, die Loop-bildenden Disulfidbrücken sind in orange abgegrenzt. Die grau gepunkteten Bereiche stellen durch Glycosylierung maskierte Bereiche dar (Evans und Desrosiers, 2001).

Aufgrund der hohen Fehlerrate der RT während der Genomreplikation ist die schnelle Bildung von Fluchtmutanten begünstigt. Antikörper gegen gp120 sind häufig nur in der Lage eine Quasispezies der im Organismus zirkulierenden Viren zu neutralisieren. an den Verzuckerungen 26 identifizierten potentiellen Glycosylierungspositionen (Zhu et al.,

2000) machen ca. fünfzig Prozent des Molekulargewichts des Proteins aus (Leonard et al., 1990). Sie spielen eine Rolle bei der Induktion neutralisierender Antikörper und der Etablierung von Fluchtmutanten. Die Glycosylierungen finden hauptsächlich auf der äußeren Domäne statt und maskieren große Bereiche des Oberflächenhüllproteins (Kwong et al., 1998). Dadurch wird die Induktion neutralisierender Antikörper gegen Peptidpitope des verdeckten gp120 verhindert. Der Bereich wird daher als „immunstille Seite“ bezeichnet (Parren et al., 1999) (Abbildung 1.6).

Der Infektionsvorgang beginnt mit der Bindung an CD4 auf der Zelloberfläche durch eine carbohydratefreie Tasche in der C3 Region einer gp120 Untereinheit des Trimers. Die dadurch initiierten sequentiellen Konformationsänderungen in allen gp120 Untereinheiten (Salzwedel und Beger, 2000) bewirken eine Verschiebung des V2-Loops (Wyatt et al., 1995). Die daraus resultierende Exposition des *Bridging Sheets* stabilisiert die Position des V3-Loops und ermöglicht die Corezeptorbindung (Kwong et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass HIV zwar an murine CD4 exprimierende Zellen binden kann (McDoughal et al., 1986), diese aber erst bei zusätzlicher Expression der Chemokin-Corezeptoren CXCR4 (Feng et al., 1996) oder CCR5 (Alkhatib et al., 1996) infizierbar sind. In der humanen Population wurden Individuen genetisch charakterisiert, die eine 32-Basenpaardeletion im CCR5-Gen (CCR5 Δ 32) aufweisen. Während sich heterozygote Mutanten nur schwer infizieren lassen, sind homozygote sogar weitgehend resistent gegen eine Infektion mit HIV-1 (Liu et al., 1996; Samson et al., 1996). Vorbereitend auf die Freilegung des gp41 bewirkt die CD4 Bindung bereits Verschiebungen in den C1 und C4/5 Regionen, welche mit gp41 interagieren (Moore et al., 1997). Die Interaktion der Corezeptoren mit den variablen Loops V1-3 und Teilen des *Bridging Sheets* von gp120 mit N-Terminus (R5-trope Viren) bzw. der extrazellulären Schleife E2 (R5-trope und X4-trope Viren) des Chemokinrezeptors bewirkt eine Schwächung der nicht-kovalenten Bindungsverhältnisse zwischen gp120 und gp41. Beim fehlerfreien Ablauf dieser Prozesse kommt es zum Ablösen des gp120 (*shedding*) und das gp41 wird freigelegt.

1.3.3.2 Das transmembrane Hüllprotein gp41

Die Funktion des transmembranen Hüllproteins (TM) gp41 während des Infektionsvorganges besteht in der Vermittlung der Fusion von Virusmembran und Wirtszellmembran. Funktionelle Domänen des extraviralen Bereiches des Proteins zeigen strukturelle Gemeinsamkeiten zu transmembranen Hüllproteinen anderer Viren wie dem Hämagglutinin 2 des Influenza Virus, dem Oberflächenprotein des Masern-Virus oder dem Protein G des Vesiculären Stomatitis Virus (Benit et al., 2001). Bei Retroviren ist die Organisation der transmembranen Hüllproteine ebenfalls konserviert. So besitzen z.B. die TM-Proteine gp36 von HIV-2 und SIV sowie die p15E Moleküle der γ -Retroviren PERV, KoRV und FeLV einen homologen Aufbau zum gp41 von HIV-1 (Gallaher et al., 1989).

Das TM kann in drei Hauptbereiche unterteilt werden. N-terminal befindet sich der extravirale Bereich (Ektodomäne) gefolgt von der transmembran Domäne (MSD, engl. *membrane spanning domain*) und der C-terminalen intraviralen (cytoplasmatischen) Domäne. Die Ektodomäne untergliedert sich vom N-Terminus zum C-Terminus in das Fusionspeptid (FP), die N-terminale Helixregion (NHR), welche auch die immunsuppressive Domäne beinhaltet (ISU, Denner et al., 1994), dem Cysteinloop

(immundominante Schleife, IDO), die C-terminale Helixregion (CHR) und dem membranproximalen externen Bereich (MPER, engl: *membrane proximal external region*) (Abbildung 1.7). Die Funktion des Fusionspeptides besteht darin, eine Verbindung zwischen Virus- und Zielzellmembran herzustellen, dazu dringt das hydrophobe FP in die Membran der Zelle ein (Freed et al., 1990, Pereira et al., 1997). Die Konformation des Proteins wird im Hinblick auf die folgenden intramolekularen Umlagerungen als Prä-*Hairpin*-Struktur bezeichnet (Jones et al., 1998; Finnegan et al., 2002).

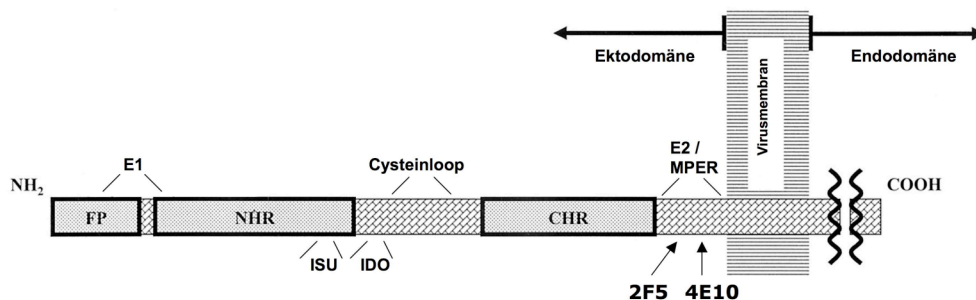


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der gp41 Ektodomäne. Die Hauptstrukturkomponenten sind das Fusionspeptid (FP), die N-terminale Helixregion (NHR), der Cysteinloop und die C-terminale Helixregion (CHR). Außerdem sind funktionsbezogene Bezeichnungen der Subdomänen vermerkt. Der Epitopbereich 1 (E1) (Fiebig et al., 2003), die Immunsuppressive Domäne (ISU) (Denner et al., 1994), die Immundominante Domäne (IDO) (Santos et al., 1998), sowie die membran proximale externe region (MPER) (Zwick et al., 2005) welche mit dem Epitopbereich 2 (E2) (Fiebig et al., 2003) identisch ist. Im E2 befinden sich die Epitope der HIV-1 breit neutralisierenden monoklonalen Antikörper 2F5 (Muster et al., 1993) und 4E10 (Zwick et al., 2001).

Das als Homotrimer vorliegende gp41 bildet eine proteaseunempfindliche, kompakte, entropisch günstige Sechs-Helix Konformation (Sechs-Helix-Bündel, SHB). Dabei lagern sich die drei N-terminalen Helices zu einer *Coiled-Coil*-Struktur zusammen. Diese wird durch hydrophobe Wechselwirkungen verschiedener konservierter Aminosäuren in der Helix stabilisiert (Weissenhorn et al., 1997). An den Kontaktstellen je zweier NHR-Helices bildet sich eine außen verlaufende Furche, in welche sich eine CHR antiparallel einlagern kann. Es entsteht eine Schleife zwischen den beiden Helices, die durch eine Disulfidbrücke stabilisiert wird. Im Membran-Modellsystem interagiert dieser Bereich mit der Lipidphase. HIV-Infizierte bilden im Verlauf der Infektion hohe Titer an bindenden Antikörpern gegen diesen Bereich, deshalb wird er als „immundominante Schleife“ oder „immundominante Domäne“ (IDO) bezeichnet (Santos et al., 1998). Durch die hydrophoben Wechselwirkungen der NHR-Taschen und der CHR-Regionen klappt die lineare Struktur des Proteins entropisch getrieben zusammen. Auf diese Weise verringert sich der Abstand zwischen Virusmembran und Wirtszellmembran. Es kommt zur Bildung einer Fusionspore. Das gp41 liegt nach der Fusion, wie zuvor beschrieben, als SHB auf der Wirtszellmembran vor (Chan et al., 1997; Weissenhorn et al., 1997, Sacket et al., 2003) (Abbildung 1.8). Ähnliche Mechanismen wurden auch für andere umhüllte Viren, wie z.B. Corona-, Influenza- und Ebolaviren beschrieben (Wilson et al., 1981; Kliger et al., 2003). Gallo et al. (2003) postulierten das „*Stalk-Pore*“ Paradigma als Theorie über die Etablierung der Fusionspore nach den Umlagerungen im gp41. Das Modell betrachtet die Monolayer der Lipiddoppelmembran der Zielzellen autonom. Das Fusionspeptid von

HIV durchdringt demzufolge nur den äußeren Monolayer (cis-Monolayer) der Wirtszellmembran. Es folgt während der Ausbildung des *six-helix-bundle* die Fusion beider *cis*-Monolayer, während die *trans*-Monolayer intakt bleiben. Diese Struktur wird als Hemifusions-Diaphragma bezeichnet. Die vollständige Fusionspore bildet sich durch den Bruch der *trans*-Monolayer aus. Die hierfür benötigte Energie zur Öffnung der Membranpore kommt aus den Umlagerungsprozessen des gp120 und wird vorher in der veränderten Struktur des gp41 gespeichert (Gallo et al., 2003). Untersuchungen mit Fusionshemmern haben gezeigt, dass der gesamte Fusionsprozess von SIV gp36 bei 37°C 19 Minuten dauert (Raviv et al., 2002). Bereits vorher konnte der Nachweis erbracht werden, dass eine für Fusionshemmer zugängliche Konformation erst nach der CD4-Bindung entsteht (Furuta et al., 1998).

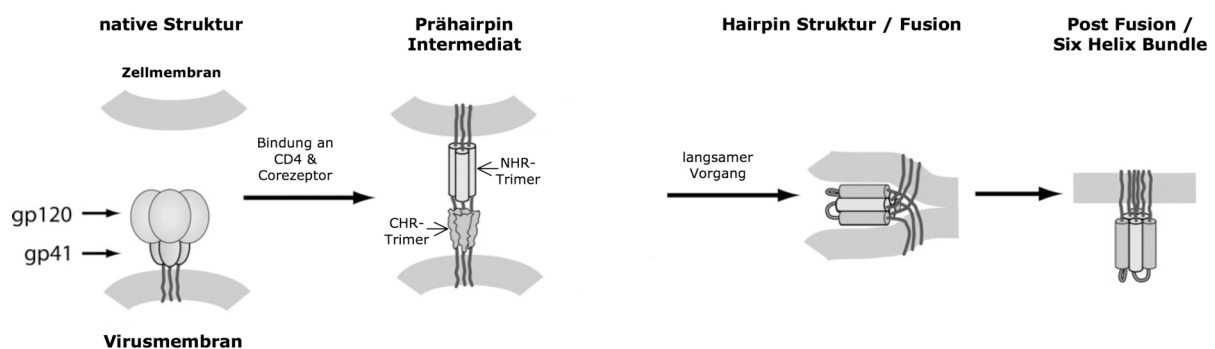


Abbildung 1.8: Das stark vereinfachte Schema der gp41 vermittelten Fusionsreaktion während der Infektion einer Zelle mit HIV. Durch Bindung von gp120 an CD4 und den Corezeptor kommt es zu intramolekularen Umlagerungen im gp120/gp41 Komplex, wobei sich das gp120 aus dem Verband löst (*shedding*). Das darauf hin freigelegte gp41 dringt mit dem N-terminalen, hydrophoben Fusionspeptid in den *cis*-Monolayer der Zellmembran ein. Anschließend beginnen die N- und C-terminalen Helices in die thermodynamisch günstige SHB Struktur zusammenzuklappen. Während der Umlagerungen reißen nacheinander die *cis*- und *trans*-Lipidmonolayer der Zellmembran (Fusionspore) und verschmelzen mit der sich jetzt in räumlicher Nähe befindenden Virusmembran (Gallo et al., 2003).

Die MPER umfasst einen tryptophanreichen Abschnitt, der den Transmembrandurchgang durch Interaktion mit der Lipiddoppelschicht des Virus stabilisiert (Schibli et al., 2001). Dieser Bereich des gp41 spielt ebenfalls eine Rolle in der Vakzinentwicklung. Aufgrund der Essentialität einer korrekten Funktion der Ektodomäne des transmembranen Hüllproteins, ist diese konservierteste Sequenz des gesamten Env (Gaschen et al., 2002). Trotzdem konnten bisher nur wenige gp41 spezifische breit neutralisierende Antikörper (bnAK) beschrieben werden. Aus HIV infizierten Patienten konnten monoklonalen Antikörper 2F5 (Muster et al., 1993) und 4E10 (Zwick et al., 2001) isoliert werden. Sie binden in der MPER von gp41 (Abschnitt 1.5.3.2). Die sich anschließende Transmembrandomäne umfasst ca. 25-30, hauptsächlich hydrophobe, Aminosäuren. Sie ist für die Verankerung von gp41 und das an ihm assoziiertem gp120 in der Virusmembran verantwortlich. Die intravirale Domäne des transmembranen Hüllproteins von HIV-1 besteht aus 150 Aminosäuren. Bei Lentiviren ist der Bereich drei bis viermal so groß wie die homologe Domäne anderer Genera der Retroviren. Versuche haben gezeigt, dass diese Domäne einen Einfluss auf die Fitness von HIV hat. Deletionen von 20 oder weniger Aminosäuren

in diesem Bereich bewirken eine signifikante Herabsetzung der Replikationsfähigkeit (Dubay et al., 1992; Freed und Martin, 1995). Des Weiteren wurde proximal zur Innenseite der Virusmembran ein konserviertes Endocytosesignal lokalisiert (AS 721-724 des HXB2 Referenzgenoms, K03455). Die Endocytose von gp41 kann die Immunogenität infizierter Zellen senken (Hunter, 1997) und somit zur Wahrung von Reservoiren des Virus beitragen.

1.3.4 Die regulatorischen und akzessorischen Proteine

Nef: Die meisten Funktionen aller regulatorischen Proteine konnten dem HIV-1 negativen Faktor (Nef) nachgewiesen werden. Das 27 kDa große Protein wird früh während der Infektion produziert und liegt im Cytoplasma in hohen Mengen vor. Es begünstigt die virale Replikation und verringert die CD4 Präsentation auf den infizierten T-Lymphocyten. Nef verringert ebenfalls die Anzahl an MHC (*major histo-compatibility complex*) Klasse II auf der Zelloberfläche und beeinflusst die Expression von mehr als 30 zellulären Proteinen.

Rev: Die Hauptaufgabe von Rev (*regulator of expression of virion proteins*) ist der Transport der ungespleißten viralen mRNA aus dem Zellkern in das Cytoplasma. Rev bindet das *Rev-responsive element* (RRE) im *env*-Bereich des Genoms. Die anschließende Rekrutierungen des Shuttleproteins Exportin-1, sowie dem Kernexportfaktor Ran-Guanosin-Triphosphatase-GTP sind essentiell für den Transport der Erbinformation. Rev organisiert die Transkription der frühen (mehrfach gespleißte mRNAs von Tat, Rev, Nef) und späten Gene (einfach gespleißte mRNAs von Env, Vpu, Vif und Vpr bzw. ungespleißte mRNA von Gag-Pol).

Tat: Tat (*transactivator of transcription*) bewirkt indirekt die Phosphoryllierung und damit die Stimulierung der RNA-Polymerase II. Während der Transkription bindet Tat an das *tar*-Element (*trans activating responsive element*) auf der neu synthetisierten mRNA. Es entsteht ein TAT-Cyclin-T-Komplex, welcher die Rekrutierung der Cdk9 (cyclin dependent protein kinase 9) bewirkt. Cdk9 phosphoryliert die RNA-Polymerase II und führt so zur Aufhebung der Unterdrückung der Elongationsphase der proviralen Transkription.

Vif: Vif (*viral infectivity factor*) ist an Vorgängen der frühen Phase der Infektion beteiligt. Bis zu 100 Kopien können vom Partikel mit in die Wirtszelle gebracht werden. Dem 23 kDa großen Protein wird eine Beteiligung am *uncoating* und dem Proteasomen-abhängigen Abbau von Deoxycytidin-Deaminasen (APOBEC) zugeordnet. Letzteres ermöglicht die Virusproduktion in nicht-permissiven Zellen (Mehle et al., 2003)

Vpr: Vpr (*virus protein rapid*) bindet an den zellulären Kernimportkomplex (Importin- α und Nukleoporin) und leitet so den Präintegrationskomplex in den Nukleus. Zusätzlich arretiert es die Zelle im G2 Stadium des Zellzyklus.

Vpu: Vpu (*viral protein U*) schützt am ER das neu gebildete Env vor Komplexierung mit CD4, indem es CD4 der Ubiquitin-gesteuerten Degradation zuführt.

1.4 Der Replikationszyklus von HIV-1

Der Replikationszyklus von HIV-1 kann in zwei Phasen unterteilt werden. Der als frühe Phase bezeichnete Zeitabschnitt umfasst die Vorgänge von der Rezeptorbindung bis zur Integration der viralen Erbinformation. Als späte Phase werden die Abläufe der viralen Genexpression bis zur Freisetzung neuer infektiöser Partikel bezeichnet.

Die Bindung des Virus mit dem Oberflächenhüllprotein gp120 an den Hauptrezeptor CD4 und die entsprechenden Corezeptoren auf der Zielzelle stellt den Beginn der frühen Phase dar. Die dadurch induzierten Konformationsänderungen im gp120/gp41 Komplex (Abschnitt 1.3.3.1) führen zur Exposition von gp41. Das Fusionspeptid kann in Wirtszellmembran eindringen und den Fusionsprozess von viraler und zellulärer Membran initiieren (Abschnitt 1.3.3.2). Nach dem vollständigen Verschmelzen beider Membranen liegt das Kapsid von HIV-1 im Cytoplasma vor. Es beginnt die Freisetzung der viralen RNA und der im Kapsid enthaltenen Enzyme. Dieser Prozess wird als „uncoating“ bezeichnet. Die RT synthetisiert die virale DNA an welche sich kotranskriptional die Proteine IN, MA, RT und Vpr (Abschnitt 1.3.2), sowie das zelluläre HMG-I(Y) zum Präintegrationskomplex organisieren. Vpr transportiert den gesamten Komplex in den Zellkern, wo die Integrase die virale DNA kovalent ins Wirtsgenom integriert. Die Integration der viralen Erbinformation findet vornehmlich in transkriptionsaktiven Regionen der DNA statt (Schröder et al., 2002). Nur dort sind die Stränge der sonst kondensierten Struktur des humanen Genoms aus Proteinen und verdrillten Nukleinsäuremolekülen zugänglich. HIV-1 liegt nun als Provirus vor.

Zu Beginn der späten Phase werden die akzessorischen Proteine Tat, Rev und Nef exprimiert. Während Rev essentiell für die Organisation des Transportes viraler mRNAs ist, bewirkt Tat eine Stabilisierung der Transkriptionselongation viraler Gene durch die RNA-Polymerase II (Abschnitt 1.3.4). Es kommt zur Bildung des Env Vorläuferproteins gp160 am rauen ER. Der Precursor wird vom ER zum Golgi Apparat transportiert. Die Spaltung in das Oberflächenhüllprotein gp120 und das transmembrane Hüllprotein gp41, sowie die glycosylische Modifikation erfolgen posttranslational. Beide Proteine werden zur Zelloberfläche transportiert und assoziieren nicht kovalent miteinander. Die gp120/gp41 Komplexe werden durch das gp41 in der Zellmembran verankert und lagern sich zu Trimeren zusammen. Die Translation der Gag und Pol Proteine erfolgt von einer nicht gespleißten mRNA in alternativen translationalen Leserahmen. In 5 % aller Translationsereignisse entsteht das Gag-Pol-Fusionsprotein, aus welchem die Pol-Proteine proteolytisch freigesetzt werden. Ab einer bestimmten lokalen Konzentration der Gag-Proteine setzt der Zusammenbau des Kapsids ein (1200-2000 Kopien Gag). In ihm werden zwei identische Kopien viraler ungespleißter mRNA des gesamten HIV Genoms und Gag-Pol-Vorläuferproteine verpackt. Das Kapsid gelangt an die Zellmembran, in welche bereits die gp120/gp41-Komplexe eingelagert sind. Es beginnen sich so genannte unreife Partikel von der Zelle abzuschneiden. Als Partikelreifung wird der Prozess der sequentiellen Spaltung des Gag-Polyproteins in die einzelnen Proteine MA, CA und NC (Abschnitt 1.3.1, Wiegers et al., 1998) sowie die Spaltung des Gag-Pol-Fusionsproteins in die Proteine IN, RT und PR im sich formierenden Partikel bezeichnet. Mit dem Abschluss der proteolytischen Prozessierung des Gag-Pol Fusionsproteins ist ein neues infektiöses HIV Virion entstanden (Abbildung 1.9).

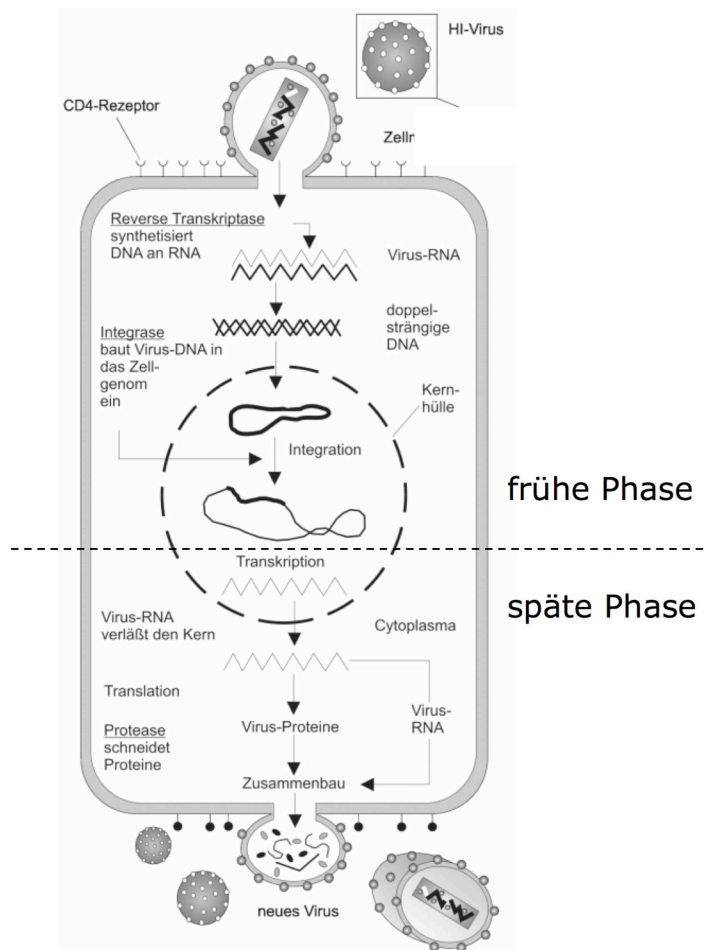


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung des Replikationszyklus von HIV-1. Die frühe Phase beginnt mit der Bindung des Virions an den Hauptrezeptor CD4 mittels gp120. Sie ist mit der Integration des zuvor revers transkribierten viralen Genoms in das Genom der Wirtszelle abgeschlossen. Die späte Phase des Infektionszyklus ist gekennzeichnet durch die Realisierung der viralen Erbinformation und die Partikelneubildung. Sie ist mit dem Abschnüren neuer infektiöser Partikel von der Zellmembran abgeschlossen. (Bildquelle: http://de.wikipedia.org/wiki/Humanes_Immundefizienz-Virus)

1.5 Wechselwirkungen des humanen Immunsystems mit HIV-1

Dem menschlichen Organismus stehen zwei grundlegende Verteidigungsmechanismen gegen Pathogene zur Verfügung. Das angeborene Immunsystem und adaptive Immunsystem.

Das angeborene Immunsystem ist die Voraussetzung für die Evolution der adaptiven Immunantwort und beinhaltet die primären Vorgänge zur Abwehr von Fremdkörpern oder Erregern (Medzhitov und Janeway, 2000). Das angeborene Immunsystem löst Vorgänge aus, die innerhalb eines kurzen Zeitraums gegen das infizierende Agens wirken können. Diese Immunantwort differenziert nicht zwischen einzelnen Erregergruppen, sondern richtet sich vielmehr generalisiert gegen als nicht selbst erkannte Strukturen. Im Falle einer Reinfektion des Organismus mit dem gleichen Erreger würden alle Vorgänge der angeborenen Immunreaktion analog zur Immunreaktion auf den primären Kontakt mit dem Pathogen erneut mit der gleichen Kinetik und Ausprägung ablaufen.

Das im Verlauf der Evolution entstandene adaptive Immunsystem reagiert spezifisch auf in den Organismus eindringende Erreger. Der Preis dieser Spezifität ist eine Latenz von zehn bis vierzehn Tagen ab dem Zeitpunkt der Infektion bis zur wirkungsvollen Ausprägung dieser Immunreaktion. Während dieser Phase kommt es zur klonalen

Selektion erregerspezifischer B- und T-Zellen. Da die selektionierten Zellen auch nach der Infektion persistieren kann das adaptive Immunsystem auf eine Reinfektion schneller und effektiver reagieren als bei der Primärinfektion. Es ist in der Lage ein „immunologisches Gedächtnis“ auszubilden.

Trotz dieser vielfältigen Möglichkeiten des menschlichen Organismus eine Infektion zu kontrollieren, gelingt es HIV-1 der adaptiven (humoral und zellulär) Immunantwort zu entgehen.

1.5.1 HIV-1 und das angeborene Immunsystem

Zum angeborenen Immunsystem werden eine Vielzahl von unterschiedlichen Zelltypen und löslicher Faktoren gezählt. Auf zellulärer Ebene spielen z.B. dendritische B-1 Zellen (DC), plasmacytoide dendritische Zellen (PDC) und nichtcytotoxische CD8⁺ Zellen eine Rolle. Sie werden von löslichen Faktoren wie Cytokinen (hier Typ 1 Interferone), Chemokinen, Defensinen, Komplement, Collectinen (Lektinbindende Proteine) und Cathelicitinen unterstützt (Levy et al., 2003).

Auf zellulärer Ebene muss sich HIV-1 hauptsächlich mit den PDC und nichtcytotoxischen CD8⁺ Zellen des angeborenen Immunsystems auseinandersetzen. PDC sind verantwortlich für die Ausschüttung des antiviralen Typ-1 Interferons α (IFN- α). Die Wirkung der nichtcytotoxischen CD8⁺ Zellen besteht in der Hemmung der Transkription von Retroviren wie HIV-1, HIV-2 oder SIV, aber auch murinen und aviären Retroviren (Copeland et al, 1995; Levy et al., 1996). Diese Immunantwort ist HLA-Typ unabhängig (Mackewitz et al., 1996) und konnte auch in HIV exponierten aber uninfizierten Personen gefunden werden (Stranford et al., 1999). Nichtcytotoxische CD8⁺ vermitteln ihren Effekt ebenfalls wie PDC über einen löslichen Faktor (CAF = CD8⁺ cell anti-HIV factor) (Walker et al., 1989, Levy et al., 2003).

Wichtige lösliche Komponenten des angeborenen Immunsystems wie Typ 1 Interferone oder das Komplement können bei einer HIV-1 Infektion einen direkten Einfluss auf das Virus ausüben (Bogdan et al., 2000; Sullivan et al., 1996). Für Mannose-bindende Lektine (MBL) konnte ein indirekter Effekt nachgewiesen werden, indem sie durch Bindung an das stark glycosylierte Oberflächenmolekül gp120 (Abschnitt 1.3.3.1) die Aufnahme von HIV-1 Partikeln durch Makrophagen steigern. Im Umkehrschluss konnte gezeigt werden, dass geringe MBL-Konzentrationen im Blut den Krankheitsverlauf zu AIDS beschleunigen (Garred et al., 1997). Während für die CCR5 bindenden β -Chemokine RANTES, MIP1- α und MIP1- β die Hemmung der Infektion zwar *in vitro* nachgewiesen wurde (Berger et al., 1999), bleibt der Nachweis eines positiven Einflusses auf den Krankheitsverlauf *in vivo* fraglich (Cocchi et al., 1995, Mackewicz et al, 1996).

1.5.2 Die HIV-1 spezifische T-Zell-vermittelte adaptive Immunantwort

Die adaptive Immunantwort wird hauptsächlich von cytotoxischen CD8⁺-T-Lymphocyten (CTL) und CD4⁺-T-Lymphocyten (T-Helferzellen) vermittelt. CD8⁺-T-Lymphocyten sind in der Lage, erkannte Zellen zu lysieren oder deren Apoptose einzuleiten. In HIV-Infizierten bewirkt eine starke CTL-Immunantwort eine verlangsamte Progression zu AIDS (Rinaldo et al., 1995, Harrer et al., 1996, Greengough et al., 1997). Während der Infektion können

bis zu 1 % aller zirkulierenden CTL HIV-1 spezifisch sein (Altman et al., 1996). Sie erkennen kurze virale Peptide, die auf der Zelloberfläche infizierter Zellen durch den *major histocompatibility complex* Klasse I (MHC-I) präsentiert werden. Das als fremd erkannte Peptid dient als Signal zur Sekretion von Granzymen oder Perforinen, welche die Zielzelle lysieren. Alternativ führt die Interaktion der CTL über den Fas-Liganden oder anderen Liganden der TNF-Familie mit Rezeptoren der Zielzelle zu deren Apoptose (Mitsui et al., 2005). Aufgrund der hohen Variabilität von HIV (Abschnitt 1.3.2) kann es auch unter dem Druck dieser Immunreaktion zur Etablierung von Fluchtmutanten kommen (Peeters & Sharp, 2000).

CD4⁺-T-Lymphocyten erkennen Peptide die auf der Zelloberfläche durch MHC-Klasse II Moleküle präsentiert werden. Diese Peptide entstehen durch den proteasomalen Abbau von phagozytierten Proteinen oder endocytierten Erregern. MHC-II Moleküle werden ausschließlich von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) exprimiert. T-Helfer-Zellen (T_H) unterstützen daher die Funktion von B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen im Blut und im Lymphgewebe. Sie sezernieren eine Vielzahl immunmodulatorischer Moleküle wie Interleukine (IL), Interferone (IFN) oder Tumor Nekrose Faktoren (TNF) (Delves und Roitt, 2000). Eine wichtige Subpopulation der T_H-Zellen sind die regulatorischen T-Zellen (Treg). Neben der Korrelation der Treg Zahl von HIV-Infizierten mit deren Viruslast (Andersson et al. 2005) wurden eine erhöhte Suszeptibilität der Treg für eine Infektion mit HIV beschrieben (Antons et al., 2008). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die LTR abhängige Transkription von HIV-1 Genen durch den Treg spezifischen Transkriptionsfaktor FoxP3 stimuliert wird (Holmes et al., 2007). Oswald-Richter et al. (2004) und Antons et al. (2008) korrelierten die erhöhte HIV-1-Replikationsrate in Treg mit dem erhöhten Turnover dieser Zellen. Sie argumentieren weiterhin, dass die daraus entstehende Treg-Depletion eine Progression zu AIDS begünstigen kann (Oswald-Richter et al., 2004, Weiss et al., 2004, Antons et al., 2008).

1.5.3 Neutralisierende Antikörper gegen die Hüllproteine von HIV-1

Die HIV-1 spezifische B-Zell-vermittelte humorale Immunantwort richtet sich vorwiegend gegen die Oberflächenhüllproteine gp120 und gp41. Aufgrund der hohen Variabilität des gp120 und der Maskierung von gp41 gibt es in HIV-Infizierten hauptsächlich Antikörperpopulationen, die nur in der Lage sind eine oder wenige Quasispezies zu neutralisieren. Antikörper mit einem breiten Neutralisationsspektrum sind dagegen unterrepräsentiert (Trkola et al., 1995). Das Ziel für einen HIV-Impfstoff, der humoralen Schutz vermitteln soll, muss die Induktion von Antikörpern sein, welche die größtmögliche Anzahl an Quasispezies neutralisieren. Der erste Schritt zur Induktion solcher breit neutralisierender Antikörper ist die Identifikation von konservierten Bereichen der immunogenen Determinanten.

In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass hohe Titer neutralisierender Antikörper im Serum von HIV-Infizierten die Progression zu AIDS verlangsamen (Reitz et al., 1988, Nara et al., 1990, Parren et al., 1999, Dianzani et al., 2002). Es konnten bisher nur wenige breit neutralisierende monoklonale Antikörper gegen HIV-1 isoliert werden. Die effektivsten unter ihnen sind die gp120 spezifischen Antikörper IgG1 2G12

(Trkola et al., 1995) und IgG1 1B12 (Burton et al., 1994), sowie die gp41 spezifischen breit neutralisierenden monoklonalen Antikörper 2F5 (Muster et al., 1993) und 4E10 (Zwick et al., 2001) (Tabelle 1.1). Da nur wenige Antikörper mit ähnlichen Eigenschaften beschrieben wurden, ist die Charakterisierung der vier, zuvor genannten, HIV-1 breit neutralisierenden monoklonalen Antikörpern am weitesten vorangeschritten.

Antikörper	Zielprotein	Epitop/Epitopregion	neutral. Subtypen
IgG1 2G12 (Trkola et al., 1995)	gp120	C4/V4-Region; Glycosylierung an N295, N332, N392	A,B,D,F (Binley et al., 2004)
IgG1b12 (Burton et al., 1994)	gp120	CD4-Rezeptortasche	B,C,D (Binley et al., 2004) A,B,C,F, (Moulard et al., 2002)
2F5 (Muster et al., 1993)	gp41	ELDKWAS	A,B,D,E,G (Binley et al., 2004)
4E10 / Z13 (Zwick et al., 2001)	gp41	WNWFNIT	alle (Binley et al., 2004)

Tabelle 1.1: Überblick der vier am besten charakterisierten monoklonalen Antikörper mit breitem Neutralisationsspektrum gegen HIV-1 Isolate. Betrachtet wurde das Neutralisationsvermögen gegen Isolate der Subtypen von HIV-1 Gruppe M.

1.5.3.1 Neutralisierende monoklonale Antikörper gegen gp120

Aufgrund der Variabilität des Oberflächenhüllproteins gp120 von HIV-1 scheint eine Induktion von breit neutralisierenden Antikörpern gegen dieses Protein unwahrscheinlich. Trotzdem wurden Antikörper aus HIV-Infizierten isoliert, die mehr als einen Subtyp des Virus neutralisieren können.

Am Beispiel des gp120 spezifischen breit neutralisierenden monoklonalen Antikörpers IgG1 2G12 (2G12) wird deutlich, dass dabei nicht nur die Tertiärstruktur des Proteins eine Rolle spielt. Für eine wirksame Bindung von 2G12 an das in der C4/V4 Region von gp120 gelegene Epitop müssen die Asparagine der Positionen 295, 332 und 392 jeweils durch einen α -1-2 Mannoserest glycosyliert sein (Scanlan et al., 2002). Die Bindung an die Zuckerreste erfolgt durch variable Bereiche der schweren Ketten und nicht durch ein konventionelles Paratop (Calarese et al., 2003). Begünstigt wird diese Stabilisierung durch Aminosäureaustausche in der variablen Region der schweren Kette, die dazu führen, dass die V(H)-Regionen des Immunglobulins in einem kleineren Winkel zueinander stehen. Das Neutralisationsspektrum und die Wirksamkeit von 2G12 konnten durch einen rekombinanten Isotypenwechsel von IgG zu IgM gesteigert werden (Wolbank et al., 2003). Der Antikörper ist in der Lage, die HIV-1 Subtypen A, B, D und F ($IC_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$) zu neutralisieren (Binley et al., 2004). In Kombination mit dem gp41 spezifischen bnAK 2F5 wurde 2G12 bereits erfolgreich in einer klinischen Studie (Phase I) zur passiven Immunisierung im humanen System eingesetzt (Stiegeler et al., 2002, Armbruster et al., 2004).

Der Wirkmechanismus von IgG1b12 (b12) beruht auf der Konkurrenz des Antikörpers um die Bindung an den CD4-Rezeptor auf der Zelloberfläche. Die Bindung an das Epitop in der CD4-Rezeptorbindungsstelle erfolgt über eine fingerartige, hypervariable Schleife (CDR H3) der schweren Kette. Die dort akkumulierten

Tryptophane tragen zur erhöhten Hydrophobizität dieser Subdomäne bei, welche in die hydrophobe Tasche der CD4-Bindungsstelle eindringt (Panthophlet und Burton, 2003, Zwick et al., 2003). Der Antikörper ist in der Lage die HIV-1 Subtypen B, C, D ($IC_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$) (Binley et al., 2004), sowie einige Isolate der Subtypen A und F zu neutralisieren (Moulard et al., 2002).

Weitere gp120 spezifische neutralisierende Antikörper sind außerdem 17b (Thali et al., 1993) und X5 (Moulard et al., 2002).

1.5.3.2 Neutralisierende monoklonale Antikörper gegen die MPER von gp41

Der gp41 spezifische monoklonale Antikörper 2F5 wurde 1993 von Muster et al. beschrieben. Der B-Zellklon von 2F5 wurde aus einem HIV-Patienten isoliert. Heute wird er von einer Hybridoma-Zelllinie exprimiert, die durch Verschmelzung der B-Lymphocyten mit einer humanen Krebszelllinie generiert wurde (Buchacher et al., 1994). Das besondere an diesem Immunglobulin ist, dass es in der Lage ist, eine Vielzahl an HIV-Isolaten der Gruppe M mit gleicher Effizienz zu neutralisieren (Muster et al., 1993, Binley et al., 2004). Der Antikörper bindet an die stark konservierte Aminosäuresequenz „ELDKWA“ (AS662-667, HIV Referenzgenom, HXB2, GeneBank Accession No: K03455, Ratner et al., 1985) in der MPER von gp41 (Muster et al. 1993, Zwick et al., 2005). Das Kernepitop wurde auf die Aminosäuren „(L)DKW“ eingegrenzt (McGaughy et al., 2003). Virusstämme, die Mutationen in diesem Bereich aufweisen, können nicht oder nur durch sehr hohe Konzentrationen von 2F5 neutralisiert werden (Trkola et al., 1995, Parren et al., 1998). Aminosäuresubstitutionen in der MPER des gp41 sind selten, da die Ektodomäne der konservierteste Bereich des gesamten Env ist (Gaschen et al., 2002). Aus diesem Grund reichen oftmals sehr geringe Konzentrationen an 2F5 ($IC_{50} < 1 \mu\text{g/ml}$) um ein entsprechendes HIV-Isolat zu neutralisieren (Conley et al., 1994, Muster et al., 1994, Purtscher et al., 1996, Binley et al., 2004). In einer vergleichenden Studie mit den ebenfalls HIV-1 breit neutralisierenden Antikörpern 2G12, b12 (Abschnitt 1.5.4.1) und 4E10 konnte 2F5 Isolate der Gruppen A, B, D, E sowie einige rekombinante Viren neutralisieren ($IC_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$). Die fehlende Neutralisation von Subtyp C-Viren konnte nachträglich durch Mutationen im Kernepitop erklärt werden (Binley et al., 2004). Sowohl in früheren Studien (Li et al., 1997, Zwick et al., 2001, Kitabwalla et al., 2003), als auch in dieser Studie konnte ein synergistischer Effekt für die Kombination von 2F5 mit anderen HIV-neutralisierenden Antikörpern gezeigt werden (Binley et al., 2004).

Entscheidend für die effektive Neutralisation durch 2F5 ist eine hoch avide Bindung des Antikörpers an die Ektodomäne von gp41. Neutralisierende Antikörper gegen das TM-Protein p15E des γ -Retrovirus PERV binden ebenfalls in der MPER des transmembranen Hüllproteins. Bindungsstudien zeigten einen Einfluss des N-terminalen Bereiches von p15E auf die Avidität der Bindung (Fiebig et al., 2003). Durch Epitopmapping dieser Antikörper konnte eine Sequenz zwischen dem Fusionspeptid und der NHR von p15E identifiziert werden, an welche die Antikörper ebenfalls binden. Dieser Bereich wurde als Epitop 1 (E1) bezeichnet. Sowohl für das feline Leukämievirus (FeLV) (Langhammer et al., 2005, 2006) als auch für das Koala Retrovirus (KoRV) (Fiebig et al., 2006) konnten virusneutralisierende Antikörper in Ratten, Katzen und Ziegen induziert werden. Die Epitope clusterten sowohl in der MPER, als auch im E1 des

korrespondierenden transmembranen Hüllproteins. ELISA basierte Bindungsstudien mit 2F5 zeigten, dass die Avidität der Bindung von 2F5 an sein Epitop durch die Zugabe aus gp41 abgeleiteter Peptide signifikant gesteigert werden konnte (Fiebig et al., 2005). Diese Daten führten zu der Vermutung vergleichbarer Vorgänge bei der Induktion von TM-spezifischen neutralisierenden Antikörpern bei γ -Retroviren und HIV-1. Die beschriebene interagierende Sequenz „AASVTLTVQARQLLS“ (AS 532-546) korrespondiert mit dem Peptid 6342 aus dem NIH Peptid Set (HIV-1 Consensus Group M Env (15-mer) Peptides, Katalog Nummer: 9487). Der Definition von Fiebig et al., 2003 folgend, wird der die Bindung von 2F5 stabilisierende Sequenzabschnitt auch für HIV als Epitop 1 (E1) und die MPER von gp41 als Epitop 2 (E2) bezeichnet (Abbildung 1.10). Auch für das Peptid DP178 (Wild et al., 1994), von dem der CHR bindende Fusionshemmer T20 (Lawless et al., 1996) abgeleitet ist, wurde eine bindungsstabilisierende Wirkung durch N-terminalen Sequenzen beschrieben (Wexler-Cohen et al., 2006). Zur Bindung des Antikörpers 2F5 genügt die Exposition des E2-Epitops allein, die zu Neutralisation erforderliche Aviditätssteigerung wird aber erst durch die Interaktion des Antikörpers mit E1 erreicht (Fiebig et al., 2005).

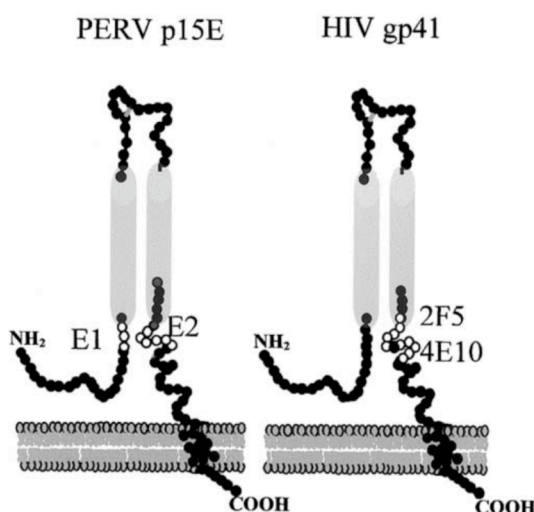


Abbildung 1.10: Vergleich der Epitopbereiche E1 und E2 von PERV p15E und HIV-1 gp41. Die durch Immunisierung mit rekombinantem p15E von PERV induzierten PERV-neutralisierenden Antikörper binden außer dem membran proximalen E2-Epitop auch im E1 Bereich des Proteins. Für die monoklonalen bnAK 2F5 und 4E10 wurden lineare Epitope in der MPER von gp41 (E2 von gp41) beschrieben. Immunisierungen mit diesen linearen Epitopen führten nicht zur Induktion von HIV-1 breit neutralisierenden Antikörper, wie 2F5 oder 4E10. Die Autoren stellten in Analogie zu den Ergebnissen mit PERV-p15E die Frage nach einem putativen, für die Neutralisation essentiellen E1-Epitop im gp41 (Fiebig et al., 2003).

Bei *in vivo* Studien zur passiven Immunisierung mit 2F5 konnte in Primaten die SHIV Übertragung von weiblichen Makaken auf ihre Nachkommen verhindert werden (Ruprecht et al., 2001, Mascola et al., 2002). In HIV-Infizierten konnte durch die Applikation einer hohen Dosis eines Antikörpercocktails die Viruslast stark reduziert werden (Stiegler et al., 2002, Armbruster et al., 2002).

Es gab verschiedene Ansätze, Antikörper dieses Types mit gleichen protektiven Eigenschaften zu induzieren. Der für γ -Retroviren funktionierende Ansatz einer Immunisierung mit dem rekombinanten transmembranen Hüllprotein zeigte sich für HIV wirkungslos (Fiebig et al., unveröffentlicht). Sowohl der Einsatz von Viren (Hepatitis A-Virus: Beneduce et al., 2002, Potato-X-Virus: Marusic et al., 2001), die als Vektoren für kurze E2 Sequenzen verwendet wurden, der Einsatz von rekombinanten Proteinen (HBsAG: Eckhart et al., 1996, HA von Influenza: Ernst et al., 1998) als auch Peptid basierte Impfstoffkandidaten (Liao et al., 2000, Xiao et al., 2000) führten nicht zum Erfolg.

Die Seltenheit der Induktion 2F5 ähnlicher Antikörper selbst in Infizierten wird durch die Zeitspanne von acht Jahren demonstriert, die zwischen der Beschreibung von 2F5 (Muster et al., 1993) und einem weiteren Antikörper mit vergleichbaren Eigenschaften liegt. Der HIV breit neutralisierende Antikörper 4E10 wurde 2001 beschrieben (Zwick et al., 2001). In dieser Studie wurde mit Z13 ein weiterer B-Zellklon isoliert, der das gleiche Epitop bindet wie 4E10. Letzterer wurde im Folgenden intensiver charakterisiert. Auch für 4E10 wurde in Analogie zu 2F5 eine Hybridomzelllinie generiert. Das von 4E10 erkannte Epitop liegt C-terminal vom 2F5 Epitop in der MPER und wurde auf die Aminosäuren NWFD/NIT kartiert (Zwick et al., 2001). 4E10 kann eine Vielzahl an laboradaptierten Isolaten und Primärisolaten aller Subtypen von HIV-1 Gruppe M neutralisieren. Er toleriert dabei Aminosäureaustausche in den Positionen eins, vier und sechs im hexameren Epitop des jeweiligen HIV-Isolats (Binley et al., 2004).

Genauere Kartierungen der gegen PERV und FeLV induzierten neutralisierenden Antikörper zeigten eine Bindung dieser an die MPER Sequenz FEGWFN (Fiebig et al., 2003 Langhammer et al. 2005, 2006). Sowohl die Lokalisation der Epitope E1 und E2 im p15E, als auch die partielle Sequenzhomologie WFN mit dem E2-Epitop des gp41 spezifischen bnAK 4E10 deuten auf vergleichbare Mechanismen der Virusneutralisation durch induzierte Antikörper hin.

Die genetische Modifikation von 4E10 von einem IgG3 Antikörper zu einem IgG1 Antikörper auf der Basis der 2F5 Sequenzen konnte das Neutralisationsspektrum von 4E10 steigern (Stiegler et al., 2001). Ansätze zur Induktion 4E10 ähnlicher breit neutralisierender Antikörper blieben trotz komplexer Versuchsanordnungen bisher erfolglos. Auch die Trimerisierung und Lipidassoziation der linearen E2 Sequenz führt nicht zum Erfolg (Lenz et al., 2005).

Die Antikörper 2F5 und 4E10 verhalten sich ähnlich im Bezug auf Virusneutralisation. Untersuchungen zum Wirkmechanismus führten zu der Erkenntnis, dass diese monoklonalen Antikörper eine Polyspezifität für Lipide der Zellmembran aufweisen (Haynes et al., 2005). Beide Antikörper weisen eine lange CDR3-Schleife auf, über welche sie mit der Lipidmembran interagieren könnten (Ofek et al., 2004, Cardoso et al., 2005). Interaktionen beider Antikörper mit humanen Autoantigenen wie Ro (Sjörgens Syndrom Antigen), Centromer B, Histonen und Cardiolipin (Haynes et al., 2005) wären dadurch denkbar. Es entstand die Hypothese, dass B-Zellklone von 2F5- und 4E10-ähnlichen Antikörpern durch klonalen Deletion aus dem Organismus entfernt werden oder HIV-spezifische Antikörper produzierende B-Zellen supprimiert werden (Haynes et al., 2005). Diese Befunde und Theorien zur Erklärung der Seltenheit dieser Antikörperpopulationen werden kontrovers diskutiert (Scherer et al., 2007), da eine Bindung von 2F5 an Cardiolipin von anderen Arbeitsgruppen nicht beobachtet werden konnte (Vcelar et al., 2007). Trotzdem steht es außer Frage, dass in HIV-Infizierten die Immunantworten auf vielen Ebenen durch das Virus beeinträchtigt werden.

1.5.4 HIV-1 vermittelte Immunsuppression

Die Retrovirus induzierte Immunsuppression wurde im Zuge der Ausbreitung der AIDS-Pandemie immer stärker untersucht. Ziel war es dabei Hinweise zu erhalten, durch welche Mechanismen das Virus in der Lage ist, der Immunantwort zu entkommen. Neben

dem direkt messbaren Einfluss der HIV-Infektion auf die Zusammensetzung der Lymphocytenpopulation (Abschnitt 1.4), muss trotzdem wie bei der HIV-Impfstoffentwicklung oft auf Modellsysteme zurückgegriffen werden.

Eine Beteiligung der Oberflächenproteine an der Induktion der Immunsuppression wird weltweit untersucht. Während für gp120 unter anderem die Apoptoseinduktion (Müller et al., 1992, Anand und Ganju, 2006) und die Induktion von T-Zell-Anergie (Faith et al., 1992, Schols et al., 1996) gezeigt werden konnte, gibt es für gp41 detailliertere Darstellungen zur Immunsuppression.

Viele Mechanismen für das transmembrane Hüllprotein gp41 von HIV-1 wurden durch Versuche mit den transmembranen Hüllproteinen p15E von γ -Retroviren als Modellsystem untersucht. Mitte der achtziger Jahre konnte eine 17 Aminosäure lange Sequenz in der Ektodomäne des p15E identifiziert werden (Cianciolo et al., 1985), welche für die immunsuppressive Wirkung von transmembranen Hüllproteinen der Retroviren verantwortlich sein soll (Mitani et al, 1987, Ruegg et al, 1989a). Homologien zu dieser als CKS17 bezeichneten Sequenz konnten in allen γ -Retroviren gefunden werden. Der konservierte Bereich wird auch als immunsuppressive Domäne (ISU) bezeichnet (Denner et al., 1994). Homologien zur ISU-Domäne von γ -Retroviren konnten auch im nef-Protein von HIV-1 (Colette et al., 1996) sowie im LMP des Epstein-Barr-Virus gefunden werden (Dukers et al., 2000). Im transmembranen Hüllprotein von HIV-1 wurde trotz geringer Sequenzhomologie zur CKS-17 ebenfalls eine immunsuppressive Domäne beschrieben (Ruegg et al., 1989b, Denner et al., 1994, 1996). Aus dieser Region abgeleitete Peptide sind in der Lage, die Mitogen-stimulierte Proliferation von B- und T-Lymphocyten sowie die „mixed lymphocyte reaction“ (MLR) zu unterdrücken (Denner et al., 1996), wie es auch für die CKS-17 Sequenz gezeigt wurde (Mitani et al., 1987). Für das aus HIV-1 gp41 abgeleitete Peptid konnte ebenfalls eine interspeziesreaktive Wirkung der Proliferationshemmung, sowie die Hemmung des cytopathischen Effektes von HIV-1 auf MT4-Zellen gezeigt werden (Denner et al., 1994). Die Hemmung des CPE steht im Konsens mit der späteren Beschreibung der aus den Helices von gp41 abgeleiteten antiviralen Peptide T20 (DP107) und T21 (DP178) (Wild et al., 1995, Lawless et al., 1996). Für gp41 konnte gezeigt werden, dass es *in vitro* die Expression von IL-2 und TNF- α herunterreguliert, während die IL-10, IL-6, IFN- α und IFN- γ Expression stimuliert werden (Takeshita et al., 1995).

Ein weiteres interessantes Modellsystem für die Untersuchung der TM-vermittelten Immunsuppression wurde von Mangeney et al. (2005) vorgestellt. Im Mausmodell konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, dass die Expression des transmembranen Hüllproteins des murinen Leukämievirus (MuLV) bzw. des Mason-Pfizer Monkey Virus (MPMV) auf der Oberfläche von Tumorzellen das Tumorstadium ermöglicht, also die Abstoßungsreaktion des Immunsystems supprimiert (Mangeney und Heidmann, 1998, Mangeney et al., 2005). Eine ähnliche Funktion wurde auch für das Syncytin (=TM) des humanen endogenen Retrovirus (HERV) W bei der humanen Plazenta vermutet (Blond et al., 2000), aber bis jetzt nur für das Syncytin 2 von HERV-FRD gezeigt (Mangeney et al., 2007). In Versuchen mit einem endogenen Retrovirus (ERV) wurde gezeigt, dass die Expression des TMs von ERV zur Induktion von Treg führt (Mangeney et al., 2005).

1.6 HIV Neutralisationstests

Zur Evaluierung von möglichen Impfstoffkandidaten ist der Einsatz von *in vitro* Neutralisationstest unabkömmlich. Es ist hierbei erforderlich, dass die Tests standardisiert durchgeführt werden, um exakte, vergleichbare Ergebnisse auch zwischen unabhängigen Testreihen zu erzielen.

Für die Infektion bei *in vitro* Neutralisationstest wurden lange Zeit laboradaptierte HIV-Stämme wie HIV-1 Isolate MN oder HIV-2 ROD verwendet. Als sich herausstellte, dass diese *in vitro* leichter zu neutralisieren sind als entsprechende Primärisolate (Moog et al., 1997), wurden diese in die Tests implementiert. Schon frühzeitig wurden auch pseudotypisierte VSV-Viren eingesetzt (Weiss et al., 1985), welche aus Sicherheitsgründen zwar verbreitet waren, aber auch kein Primärisolat im Test ersetzen können. Als natürlich durch HIV infizierbare Zielzellen werden sowohl primäre Zellen wie PBMC (Daar et al., 1990) oder adaptierte Lymphocytenzelllinien wie H9 (ECACC 85050301, Popovic et al., 1984), C8166 (ECACC 88051601, Sodroski et al., 1984) oder MT-4-Zellen (ECACC 91102415, Harada und Yamamoto, 1985, Harada et al., 1986) eingesetzt. C8166 und die später etablierten MT-4 Zellen sind durch HTLV-1 transformiert. Die am häufigsten verwendeten, durch Transfektion mit HIV rezeptorcodierenden Genen artifiziiell infizierbare Zelllinien sind die lymphoblastoiden CEM Zellen (Trkola et al., 1999) und die aus dem humanen Osteosarkom gewonnenen GHOST Zelllinie (Cecilia et al., 1998).

In der HIV-Forschung hat sich das Nachweis von p24Gag im Zellkulturüberstand (Thorstensson et al., 1991) oder im Lysat der verwendeten Zellen (Kuate et al., 2006) als Standardtest durchgesetzt. Die Inkubationszeiten dieser HIV-Neutralisationstests betragen sieben Tage (Kuate et al., 2006). Eine weitere Möglichkeit zum Messen der Viruslast in einem Testsystem ist die Verwendung von Reporter genen, wie der Luciferase. Die Transkription des Enzyms wird durch einen viral codierten Transaktivator gesteuert und zeigt so die Infektion einer bestimmten Zelle an (Spenlehauer et al., 2001). Alte Testsysteme benutzen die Inhibition der Inkorporation von ³H-Thymidin in MT-4-Zellen als indirekten Messwert für Virusreplikation (Harada et al., 1986). Die Detektion und Quantifizierung der Viruslast in einem Neutralisationstest durch real time PCR wurde bisher noch nicht beschrieben.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die HIV-Infektion hat sich zu einer Pandemie entwickelt. Auch in industrialisierten Ländern wie Deutschland ist in den letzten Jahren wieder ein Anstieg der Neuinfektionen zu verzeichnen gewesen. Trotz intensiver Bemühungen ist es bis heute nicht gelungen, einen Impfstoff zu entwickeln, der die HIV Infektion und damit die Entwicklung der fatalen Immunschwäche AIDS verhindert.

Alle Ansätze zur Herstellung eines HIV-Impfstoffes auf Basis des Oberflächenhüllproteins gp120 scheiterten aufgrund seiner komplexen Struktur und Variabilität. Impfstoffstudien basierend auf dem transmembranen Hüllprotein gp41 von HIV-1 fokussierten sich auf die Induktion von MPER spezifischen breit neutralisierenden Antikörpern. Grundlage hierfür war die Charakterisierung der HIV-1 gp41 MPER-

spezifischen breit neutralisierenden Antikörper 2F5 und 4E10. Aufgrund ihres komplexen und nicht vollständig aufgeklärten Wirkmechanismus ist es bis heute nicht gelungen, Antikörper mit vergleichbaren Eigenschaften durch Immunisierung mit linearen Epitopen zu induzieren.

Ziel dieser Arbeit ist die Überprüfung einer epitopgerichteten Vakzinierungsstrategie zur Induktion von gp41 spezifischen HIV-1 breit neutralisierenden Antikörpern. Es sollen Immunisierungsstrategien und Antigene entwickelt werden, in denen die mögliche Ausbildung eines Konformationsepitopes im gp41 zur Induktion von MPER spezifischen HIV-1 bnAK führt. Die an der Induktion dieser Antikörper potentiell beteiligten Sequenzen müssen dafür in ein geeignetes Trägerprotein eingebracht werden. Die so entstehenden Hybridproteine sollen bakteriell exprimiert und zur Immunisierung von Ratten verwendet werden. Mit dem Ziel diese Hybridproteine membranständig auf der Oberfläche von Zellen in möglichst nativer Konformation zu exprimieren, soll die DNA Sequenz der hergestellten Antigene in einem weiteren Versuchsansatz den Versuchstieren direkt appliziert werden. Dafür soll eine DNA-Vakzinierungsstrategie entwickelt werden. Die in beiden Ansätzen induzierten humoralen Immunantworten sollen hinsichtlich der Bindungsstärke, der Lokalisation und der Neutralisationsfähigkeit gegen HIV-Isolate verschiedener Gruppen und Subtypen untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

CL-XPosure™ Film	PIERCE, Illinois, USA
Filtereinheit Rotrand FP20/0,2 CA-S	Whatman Schleicher & Schueller, Dassel, Deutschland
Immobilon™ <i>Transfer Membranes</i>	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Nuncleon Surface Flachboden	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Zellkulturflaschen T25, T75, T175	TPP, Midwest Scientific St. Louis, MO, USA
Weithalsflasche Serie 303 PP	Kautex Textron, Bonn, Deutschland

2.1.3 Geräte

BioPhotometer	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Branson Sonifier II 250	G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Deutschland
Branson Modell 102 C	G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Deutschland
CO ₂ <i>Incubator</i> MCO-20AIC	Sanyo, München, Deutschland
ELISA <i>Reader</i> Spectra Classic	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Entwicklungsmaschine Curix 60	Agfa, Köln, Deutschland
EP-Gradient-S PCR	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
FACScalibur	BD-Biosciences, San Jose, USA
Filter Mate Harvester	PerkinElmer <i>precisely</i> , Wellesley, USA
Gel Doc 2000	Bio-Rad, München, Deutschland
Gene Pulser II	Bio-Rad, München, Deutschland
Inversmikroskop ID 03	Zeiss, Jena, Deutschland
Konzentrator <i>Concentrator</i> 530	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Kühlzentrifuge Centrifuge 5403	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Micro Beta Trilux Luminescence Counter	PerkinElmer <i>precisely</i> , Wellesley, USA
pH-Meter MP 220	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Realtime-PCR-Cycler MX4000	Stratagene, La Jolla, USA
Schüttelinkubator Innova 4330	New Brunswick Scientific, Nürtingen Deutschland
Sterilbank Steril Gard Class2	The Baker Company, Sanford, Maine USA
ThermoStat <i>plus</i>	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Tischzentrifuge <i>Centrifuge</i> 5415D	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Zentrifuge Avanti J-20xP	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0R	Kendro, Langensebold, Deutschland

2.1.4 Antikörper

Bezeichnung	eingesetzte Konzentration	Herkunft
<u>Fluorochrom Konjugate</u> anti-human-FITC (IgG)	1:1000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
<u>Primärantikörper</u> 2F5	0,3 µg/ml (WB+ELISA)	Zur Verfügung gestellt durch das AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAD, NIH von Dr. H. Katinger (Muster et al., 1993)
4E10	0,3 µg/ml (WB+ELISA)	Zur Verfügung gestellt durch das AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAD, NIH von Dr. H. Katinger (Stiegler et al., 2001)
Penta-His-Antikörper Ziege 1 (HIV-ISU-spezifisch) Ziege 31 (KoRV-p15E-spezifisch)	0,2 µg/ml (WB) 1:1000 (WB) 1:1000 (WB)	Qiagen, Hilden, Deutschland AG Denner, RKI AG Denner, RKI
<u>Sekundärantikörper</u> Polyclonal Goat anti-Mouse-HRP	1:8000	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Polyclonal Goat anti-Rat-HRP	1:8000	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Polyclonal Goat anti-rat-POD Polyclonal-Goat anti human- POD	1:2000 1:2000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

2.1.5 Primer

Alle Verwendeten Oligonukleotide wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5´-3´)
1	68i	GGARCAGCIGGAAGCACIATGG
2	69i	CCCCAGACIGTGAGITICAACA
3	FoxP3 Sonde	FAM-TCCGCTGGGCCATCCTGGAGGCTC-BHQ1
4	FoxP3-Con-for	GTGGCCCGGATGTGAGAAGG
5	FoxP3-Con-rev	GGTCCCTGTGGGCACATCCA
6	FoxP3-for	TCAAGCACTGCCAGGCG
7	FoxP3-Real-for	CGACCCCCTTTCACCTACGCC
8	FoxP3-Real-rev	GGATGGCGTTCTTCCAGGTGGC
9	FoxP3-rev	CAGGAGCCCTGTTCGGAT
10	GAPDH 2 (-)	TGGTCCACACCCATGACGA
11	GAPDH 2 (+)	GGCGATGCTGGCGCTGAGTAC
12	GAPDH Sonde	HEX-TTCACCACCATGGAGAAGGCTGGG-BHQ1
13	HIV-1-M Sonde	FAM-TGACGCTGACGGTACAGGCCAGAC-BHQ1
14	HIV-1-N/O Sonde	FAM-ATCTCTAGCAGTGGCGCCGAACA-BHQ1
15	HIV-1-N-For	CCCTCAGACCATCTAGACTG
16	HIV-1-N-Rev	ACCCATCCTCTCTCCTACTT
17	HIV-1-O-For	TCCCTCAGATCACTTAGACTG
18	HIV-1-O-Rev	TCCTCCCCTAGGGACTT
19	HIV-2-gp36-F	GCGGGATCCGGCGCGGCGTCTTGACGCTGTGCGGCTCA
20	HIV-2-gp36-R	GTAGAATTCTCAATATTTGACCCAGGAGGCTAAATCAAA
21	HIV-2-LTR-F	GGGACTTCCAGAAGGGGCT
22	HIV-2-LTR-R	CCAGGCGGCGACTAGGAGAG
23	HIV-2-RTF	CTGTATAAATGTACCCGCT
24	HIV-2-RTP	FAM-CTGCGGAGAGGCTGGCA-BHQ1
25	HIV-2-RTR	ACTTGCTTCTAATTGGCAG

26	HybII-MDS2-Rev	CTGCTGCAGTCAATTCACCTATAGAAAAGTACAGCAAAAACTATTCTTAAACCTACCAAGC
27	HybII-MSD1-Rev	TTCTTAAACCTACCAAGCCTCCTACTATCATATATGAATAATTTTATATACCACAGCCAATTTGT
28	Ko-E1-A	GCGGGATCCACGAGCATGACACTAACAGTGCAGGCACGCCAACTACTATCTTTGACTAGCCTCCAGATT
29	KoE2-A/B-Rev	TAGAATTCTCAACTTGCCCACTTATCGAGCTCTGACGCCCACTTATCTAACTCTTC
30	KoE2-C-Rev	TAGAATTCTCATGTTATGTTGAACCATCCCTCGTACCAACTTGCCCACTTATCGAG
31	pDis-Seq-Rev	TCGAGGCTGATCTCGAG
32	rgp36-For	GCGGGATCCGGCGCGGCTCCTTGACGCTGTCGGCTCA
33	rgp36-Rev	GTAGAATTCTCAATATTTGACCCAGGAGGCTAAATCAAA
34	Switch-F1	TGGGCAAGTTGGTACGAGGGATGGTTCAACATAACATTGACTAGCCTCCAG
35	Switch-F2-BamHI	CGTGGATCCGAGTTAGATAAGTGGGCGTCAGAGCTCGATAAGTGGGCAAGTTGGTAC
36	Switch-R1	CTGCACTGTTAGTGTGTCATGCTCGTTTCCCTTGAGTCTCCTCAT
37	Switch-R2-EcoRI	TGGAATTCTCAAGATAGTAGTTGGCGTGCCTGCACTGTTAGTGT
38	T7-Prom	TAATACGACTCACTATAGGG
39	T7-Term	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
40	UR004-E1-For	GTTCCGCGTGGATCCACGAGCATGACACTA
41	UR004-MSDII-Rev	TCTTAAACCTACCAAGCCTCCTACTATCATATATGAATAATTTTAT
42	UR004-MSDI-Rev	TATGAATAATTTTATATACCACAGCCAATTTGTTATGTTGAACCATCC
43	UR018-F	CGGGATCCAGCACTATGGGCGCAGCGTCAGTGACGCTGACGGTACAG
44	UR019-F	CGGGATCCCTTAGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCG
45	UR020-F	CGGGATCCCTGTTCCCTGGGTTCTTAGGAGCAGCAGGAAGC
46	UR023-F	CGGGATCCCGCAGCGATAGGAGCTCTGTTCCCTGGGTTCTTA
47	N-TM-FoR	GTTCCGCGTGGATCCGCGAGCATCACACTAACAGTGCAGGCACGCACACTACTATCTTTGACTAGCCTC CAG
48	N-TM-Rev	GAGTTAGATCAGTGGGACTCAGAGCTCGATCAGTGGGACAGTTGGTACGAGGGATGGTTCCGCATAACA TGAGAATTCTA
49	O-TM-For	GTTCCGCGTGGATCCGCGCCACGGCACTAACAGTGCAGGCACACTCAGTACTAAAGTTGACTAGCCTC CAG
50	O-TM-Rev	GAGTTAGATGAGTGGGCGTCAGAGCTCGATGAGTGGGCAAGTTGGTACGAGGGATGGTTCCGCATAACA TGAGAATTCTA
51	pCal-n-His (+)	TATGCATCACCATCACCATCAGG
52	pCal-n-His (-)	CGTGATGTGATGGTGTGTCAT
53	RaLV-env-For	GGAGGAATCACCTTAGGAG
54	RaLV-env-Rev	CCTTGTGGGAATCAAACAGC

2.1.6 Peptide & Pepsotmembranen

Folgende freie Peptide wurden für die Neutralisationshemmversuche eingesetzt:

Bezeichnung	Aminosäuresequenz	Herkunft
HIV-ISU	NH ₂ -KQLQARILAVERYLKDQQL-COOH	JPT, Berlin, Deutschland
E2-long	NH ₂ -CNEQELLELDKWASLWNWFDITNWL-COOH	JPT, Berlin, Deutschland

Zur Epitopkartierung wurden Pepsotmembranen der Firma JPT (Berlin, Deutschland) verwendet, welche die Aminosäuresequenz der Ektodomäne des gp41 von HIV-1 Isolat IIIB oder Ba-L, die des Hybridantigens UR004 (Abschnitt 3.1.2.1.2) oder die Sequenz des gp36 von HIV-2_{7312A} umfassen. Die einzelnen Aminosäuresequenzen befinden sich im Anhang A-V. Die im Peptid-ELISA verwendeten Peptide wurden dem NIH-Peptidset NIH-6451 (15-mer aus HIV-1 MN Env) entnommen (www.aidsreagent.org).

2.1.7 Plasmide

Für die bakterielle Expression der Hybridproteine wurde das Plasmid pCal-n (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) verwendet. Die eukaryontische Expression und

membranassoziierte Präsentation der Hybridantigene wurde mit dem Vektor pDisplay (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt. Das Plasmid pBlueskript KS⁻ diente als Vektor für die Standardamplifikation zur Charakterisierung der HIV-1 Gruppe N und O spezifischen real time PCR.

Vektorkarten und Aminosäuresequenzen der Konstrukte befinden sich im Anhang A-II bis A-IV. Eine Übersicht der Verwandtschaft der hergestellten Hybridproteine befindet sich im Anhang A-I.

2.1.8 Zellen

Zellbezeichnung	Zelltyp	Medium	Referenz
C8166	humane T-Zelllinie	RPMI	Sodroski <i>et al.</i> , 1984
GHOST R5	humane Osteosarkom-Zelllinie	DMEM + 500 µg/ml Geneticin + 1 µg/ml Puromycin + 25 µg/ml Hygromycin	Cecilia <i>et al.</i> , 1998
Rat1	Fibroblasten-Zelllinie aus der Ratte	DMEM	

2.1.9 Viren

Alle verwendeten Viren wurden vom National Institute of Health (NIH) AIDS Research & Reference Reagent Program (Germantown, USA) bezogen. Die gelieferten Virusstocks wurden wie in Abschnitt 2.2.6.1 beschrieben expandiert. Eine Übersicht aller Isolate ist in Tabelle 3.1 zu finden.

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.2.1.1 Plasmid-Präparation aus *Escherichia coli*

Mini-Präparation

Zur Isolation von Plasmiden aus Bakterien wurden das QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet. Eine 1,5 ml Übernachtskultur wurde nach Herstellerangaben verarbeitet. Die Elution erfolgte in 50 µl ddH₂O.

EndoFree-Maxi-Präparation

Für die Transfektion von rat1 Zellen und die Beschichtung der Goldpartikel für die ballistische Immunisierung wurden große Mengen endotoxinfreier Plasmid-DNA benötigt, da Endotoxin die Transfektionseffizienz verringern kann (Zeisig *et al.*, 2003). Die entsprechenden Präparationen wurden mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.1.2 Isolation genomischer DNA

Die Isolation genomischer DNA aus Zellen erfolgte mit dem (QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben.

2.2.1.3 Isolation von Gesamt-RNA

Hierfür wurde das RNeasy-Mini-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Es wurde nach dem Protokoll „Purification of Total RNA from Animal Cells Using Spin Technology“ (RNeasy Mini Handbook, 04/2006) inklusive DNase-Verdau verfahren.

2.2.1.4 Reinigung von DNA-Fragmenten

Die Isolierung von DNA-Fragmenten nach Agarosegel-Elektrophorese erfolgte mit dem MiniElute Gel Extraction Kit. Die Reinigung von PCR-Fragmenten bzw. deren Entsalzung erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit. Beide Kits waren von Qiagen (Hilden, Deutschland) und in beiden Fällen wurde nach den Vorgaben des Herstellers gearbeitet. Die Elution der DNA erfolgte auch hier mit 50 µl ddH₂O.

2.2.1.5 Restriktionsverdau

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA wurde mittels TypII-Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Es wurden die vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen für die verwendeten Enzyme eingehalten. Beim Verdau eines Plasmides wurden zwischen 2 µg und 5 µg DNA eingesetzt. Handelte es sich um ein PCR Fragment wurden 50 % des nach der Gelextraktion erhaltenen Eluates (= 25 µl) in einem 50 µl Reaktionsansatz verdaut. Die Inkubationsdauer betrug 2 h bei 37°C. Es wurden Restriktionsendonukleasen der Firma NEB (Frankfurt a.M., Deutschland) eingesetzt.

2.2.1.6 Ligation

Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten wurde mit der T4-DNA Ligase (Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland) entweder für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C durchgeführt. Unter Berücksichtigung des molaren Verhältnisses von 1:5 (Vektor:Insert) wurden immer ca. 250 ng Vektor für die Reaktion eingesetzt. Das Reaktionsvolumen betrug jeweils 20 µl.

2.2.1.7 Transformation

Transformation umschreibt das Einbringen von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien oder Hefen. Alle in dieser Arbeit verwendeten Baktierenstämme (siehe Tabelle 2.1) waren chemisch kompetent. Die Herstellung der kompetenten Bakterien erfolgte nach dem Protokoll im QiaExpressionist (Qiagen, 5.Auflage, 2002, S.39f).

Für die Transformation wurden 10 µl eines Ligationsansatzes oder 100 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Die DNA wurde für 20 min mit 100 µl der kompetenten Bakterien auf Eis

inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 60 s bei 42°C. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 2 min auf Eis wurden 500 µl 37°C-warmes LB-Medium zu dem Ansatz gegeben. Dieser wurde 30 min schüttelnd bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien bei 2000xg/5 min pelletiert und in 100 µl Medium aufgenommen. Bei einer Transformation nach Ligation wurden die gesamten 100 µl auf einer LB-Agar-Platte (mit Selektionsantibiotikum) ausgestrichen. Erfolgte die Retransformation eines Plasmides wurden nur 50 µl des gesamten Ansatzes ohne vorheriges Zentrifugieren auf die Platte gebracht. Die Nährbodenplatten wurden für 16 h bei 37°C inkubiert.

<i>Escherichia coli</i> Stämme	Eigenschaften
Top 10 (Stratagene, Niederlande)	<i>E. coli</i> (F'(lac ^q , Tn10(TetR)) <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>m15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (<i>StrR</i>) <i>endA1</i> <i>nupG</i>)
BL21-CodonPlus(DE3)-RP (Stratagene, Niederlande)	<i>E. coli</i> B F- <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (<i>rB- mB</i>) <i>dcm</i> + <i>Tetr</i> <i>gal</i> λ(<i>DE3</i>) <i>endA</i> <i>Hte</i> (<i>argU</i> <i>proL</i> <i>Camr</i>)
Nährmedium	
LB-Medium	1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl
Ampicillin	100 µg / ml
Kanamycin	50 µg / ml

Tabelle 2.1: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme und bakterieller Nähr- bzw. Selektionsmedien

2.2.1.8 Agarosegel Elektrophorese

Ein Verfahren zur Trennung von DNA-Molekülen ist die Agarosegel Elektrophorese. Das Polymer aus D-Galaktose und 3,6-Anhydrogalaktose dient als Matrix, in der sich die negativ geladenen DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichtes bewegen. Die Agarosekonzentration richtet sich dabei nach dem zu trennenden DNA-Molekulargewichtsbereich (<1kb: 1,5% (w/v) Agarose, >1kb 1% (w/v) Agarose). Die Agarose wurde in der entsprechenden Konzentration in 1x TAE-Puffer (50xTAE-Puffer: 2 M Tris, 1 M Acetat, 50 mM EDTA) aufgekocht und dann zum Erstarren (T<40°C) luftblasenfrei in die vorbereitete Gießkammer dekantiert. Die Proben wurden mit der entsprechenden Menge 10x-DNA-Ladepuffer (5 ml Glycerin, 350 µl gesättigte Bromphenolblaulösung, 250 µl 10 %ige Xylen-Cyanol-Lösung, 200 µl 50x TAE, ad 10 ml ddH₂O) versehen. Die Elektrophorese wurde horizontal bei 5-8 V/cm² in Bio Rad-Gelkammern durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch Interkalierung von Ethidiumbromid (1 µg/ml / 20 min) in die DNA. Mit einem Transilluminator können die Moleküle durch eine Fluoreszenzanregung mit ultraviolettem Licht (254 nm) sichtbar gemacht werden. Die abgestrahlte Wellenlänge ist energieärmer und somit im sichtbaren Bereich E_{max}=590 nm. Die Gele wurden digital mit dem BioRad GelDoc200 dokumentiert.

2.2.1.9 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen erfolgte photometrisch am ND-1000 NanoDrop® (peQlab, Erlangen, Deutschland) durch des Bestimmung des Extinktionsquotienten 260nm/280nm.

2.2.2 PCR-Techniken

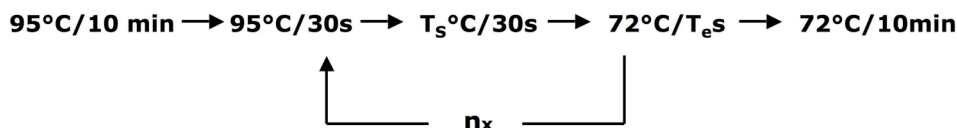
Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) können sequenzspezifische Nukleinsäurebereiche aus einem Nukleinsäuregemisch isoliert und vermehrt werden (Mullis *et al.*, 1986). Dabei hybridisieren synthetisch hergestellte Oligonukleotide (Primer) sequenzspezifisch mit ihrem komplementären Bereich auf dem Matrizenstrang. Die DNA-abhängige DNA-Polymerase nutzt die am 3'Ende des Oligonukleotids befindliche freie Hydroxylgruppe, um einen zur Matrize komplementären DNA-Strang zu synthetisieren.

2.2.2.1 Standard PCR

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Technik hauptsächlich in Form der Mutagenese PCR eingesetzt, um die zur Immunisierung verwendeten Hybridantigene herzustellen. Dabei wurden die Primer so konzipiert, dass sie die gewünschten Veränderungen in den neu synthetisierten DNA-Strang einbringen. Eine Abwandlung der Standard PCR stellt die Kolonie-PCR dar, die zur Identifizierung von positiven Bakterienklonen nach Transformation mit Plasmid-DNA verwendet wurde (*colony screening*, Walker *et al.*, 1993). Dabei wird Material einer Bakterienkolonie mit Hilfe eines sterilen Holzstäbchens in den PCR Ansatz gebracht und anschließend entweder eine 3ml Flüssigkultur oder eine neue Kulturplatte mit demselben Stäbchen beimpft. Die Amplifikation der Zielsequenz erfolgt direkt aus den während der initialen Erhitzung lysierten Bakterien.

allgemeiner Reaktionsansatz, (soweit nicht anders vermerkt):

Reagenz	Konzentration Stocklösung	µl/Ansatz	Hersteller
Template	10 ng - 20 ng Plasmid oder Koloniematerial	x	
Primer vorwärts	100 pmol	0,50	Sigma-Genosys, Steinheim, Deutschland
Primer rückwärts	100 pmol	0,50	Sigma-Genosys, Steinheim, Deutschland
Puffer	10x	2,50	Applied Biosystems
dNTPs	10 mM pro dNTP	0,50	Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland
MgCl ₂	25 mM	0,25	Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland
Polymerase nukleasefreies ddH ₂ O	5 U / µl	0,25 ad 25	Applied Biosystems ad 25 µl



n =Anzahl der Zyklen

T_s =Hybridisierungstemperatur (primerspezifisch):

$$T_s = 69,3 + 0,41(\%GC) - 650/N^{-1}$$

%GC: Summe prozentualer Anteil der Basen Guanin und Cytosin im Primer)
 N : Länge des Primers in Basen

T_e =Elongationszeit (amplifikatspezifisch):

$$T_e = L/P_e$$

L : berechnete Länge des Fragments

P_e : polymerasespezifische Elongationsgeschwindigkeit (Amplitag Gold: ca. 1kB/60s)

Abbildung 2.1 : Algorithmus zur Bestimmung der Reaktionsbedingungen einer Standard PCR

Als Polymerase wurde die Ampli Taq Gold Hot-Start Taq-Polymerase (Applied Biosystems) verwendet, die einen Aktivierungsschritt von 10 min erfordert. Die optimale Elongationstemperatur lag bei 72°C . Für jede PCR wurde eine primer- und amplifikatspezifische Anpassung der Reaktionsbedingungen vorgenommen (Abbildung 2.1).

2.2.2.2 real time PCR

Reagenz	Stocklsg.	$\mu\text{l}/$ Ansatz
PCR-Puffer	10x	2,2
MgCl_2	25 mM	1,75
dNTP's	10 mM pro dNTP	0,63
Primer Virus-for	100 pmol/ μl	0,5
Primer Virus-rev	100 pmol/ μl	0,5
Sonde Virus (Fam)	100 pmol/ μl	0,5
Primer GAPDH-for	100 pmol/ μl	0,5
Primer GAPDH-rev	100 pmol/ μl	0,5
Sonde GAPDH (Hex)	100 pmol/ μl	0,5
AmpliTaq Gold	5 U/ μl	0,25
Bidest.		14,17 (HIV-2: 13,92)
DMSO (nur für HIV-2 PCR)	100 %	0,25
Template		3,0

Tabelle 2.2 : Standardreaktionsansatz für die hier durchgeführten real time PCR zur Bestimmung der Provirusintegration

Temperaturprofil: $95^{\circ}\text{C}/10\text{min}-50\text{x}$: [$95^{\circ}\text{C}-60\text{s}/52^{\circ}\text{C}-60\text{s}/72^{\circ}\text{C}-20\text{s}$]

Die real time PCR erlaubt die zeitgleiche Amplifikation und Detektion von DNA (Higuchi, *et al.*, 1992). In dieser Arbeit wurde die sondenbasierte real time PCR zur Quantifizierung der Provirusintegration im Neutralisationstest Transkription eingesetzt.

Die dazu verwendeten und etablierten real time PCRs detektieren die DNA mittels der Degradation einer sequenzspezifischen Oligonukleotidsonde. Durch die Verwendung von hochspezifischen Primer/Sonden-Kombinationen ist diese Technik verlässlicher als der Einsatz von DNA-interkalierenden Farbstoffen, wie Ethdiumbromid oder SYBR-Green. Am 3'-Ende der Sonde wird ein Quencher-molekül (Black Hole Quencher=BHQ)

angebracht, welches die Fluoreszenz des am 5'-Ende der Sonde im Förster-Radius befindlichen Reporters (z.B. Carboxyfluorescein=Fam) unterdrückt. Während der Synthese der DNA wird die Sonde durch die 3'-5'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase abgebaut, wodurch sich Quencher und Reporter voneinander entfernen. Der Reporter kann deshalb ein Fluoreszenzsignal aussenden, das vom Gerät detektiert wird. Dabei ist die Zunahme der Fluoreszenz zwischen den Zyklen proportional zur Anzahl der neu synthetisierten Stränge. Werden Primer und Sonde im Überschuss zugegeben und können aufgrund optimaler Bedingungen (Salzkonzentration, Temperatur, Sequenzhomologie) alle passenden, denaturierten DNA-Einzelstränge binden, kommt es in jedem Zyklus zu einer Verdoppelung der Amplifikate. Die PCR besitzt dann eine Effizienz von 100%. Das heißt im Umkehrschluss, ein Unterschied von 1 Ct (cycle threshold= PCR-Zyklus in dem die amplifikationsabhängige Fluoreszenzintensität einen festgelegten Schwellenwert überschreitet) eine Differenz von 50 % in der Menge der gemessenen DNA-Spezies ausmacht. Bezogen auf die Messung der Proviruslast im *in vitro* Neutralisationstest würde es bei vergleichbarer Zellmenge und Zellvitalität gleichbedeutend mit 50 % Neutralisation sein. Die Faktoren Zellmenge/Zellvitalität wurden über die Koamplifikation des zellulären GAPDH-Gens (Abschnitt 3.1.1.4) erfasst. Die Berechnung der Neutralisation erfolgte nach der folgenden Formel: Hemmung der Virusreplikation [%] = $100 - 100/2^{\Delta\Delta Ct}$.

Die Quantifizierung der RaLV-env Transkription wurde mittels einer Brilliant® SBYR® Green real time PCR (Stratagene, La Jolla, USA) auf RaLV-env cDNA (Abschnitt 2.2.2.5) durchgeführt. Die Amplifikation erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers mit den Primern 53+54 (Abschnitt 2.1.5).

2.2.2.3 Charakterisierung der real time PCR

Für die Charakterisierung der real time PCR für die HIV-1 Gruppen N und O wurden Plasmidstandards hergestellt. Dafür wurden die Banden der PCR zum Beweis der Gruppenspezifität der Primer (Abbildung 3.3.) ausgeschnitten und die Nukleinsäure mit dem Gel-Extraction-Kit (Qiagen, Deutschland, Hilden) aus der Agarosematrix extrahiert. Die PCR-Fragmente wurden einem Verdau mit der Mung-Bean-Nuklease (NEB, Frankfurt a.M., Deutschland) unterzogen, um die Taq-Polymerase bedingten 3'-Überhänge zu entfernen. Die verdauten Fragmente wurden in den mittels Restriktionsenzym *Sma*I linearisierten Vektor pBlueskript KS- (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) durch eine Blunt-end Ligation kloniert. Da die Orientierung des Inserts im Vektor hier keinen Einfluss auf den Lauf der PCR hat, konnte eine ungerichtete Ligation durchgeführt werden und somit das Herstellen von Klonierungsprimern umgangen werden. Die rekombinanten Plasmide wurden in *E. coli* Top 10 transformiert und durch Sequenzierung der Inserts verifiziert.

Vor dem Einsatz in der PCR wurden die Plasmide mit dem Restriktionsenzym *Not*I linearisiert und durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Nach der Gelextraktion erfolgte die photometrische Bestimmung der Konzentration der Ausgangslösungen der Plasmide am NanoDrop®. Da die Größe der rekombinanten Plasmide bekannt war, konnte mit Hilfe der Konzentration die Absolutzahl an Plasmiden in der Ausgangslösung berechnet werden. Die Berechnung der Effizienz „E“ erfolgte nach der Formel:

$E=10^{1/s}-1$ (E=Effizienz in %, s=Steigung der Regressionsgeraden der Titration)

Für die Charakterisierung der HIV-2 spezifischen real time PCR (Abschnitt 3.1.1.3) wurde ein PCR-Amplifikat direkt als Kopienstandard eingesetzt. Das Standardamplifikat für HIV-2 wurde mit den Primern 21+22 (Abschnitt 2.1.5) erzeugt.

2.2.2.4 Sequenzierung

Die Überprüfung der exakten Sequenz der generierten Konstrukte erfolgte mittels der PCR-Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1977). Es wurde der fertige Mastermix Big Dye (ABI Terminator Chemie, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) mit fluoreszenzmarkierten Didesoxinukleotiden in Verbindung mit jeweils passenden Primern verwendet. Die notwendige PCR wurde im Labor durchgeführt. Erstellung der Sequenzen erfolgte durch den hauseigenen Service.

Reaktionsansatz

1 ng-3 µg
5 pmol
1,5 µl
1,0 µl
add 10 µl

Template-DNA (PCR-Produkte 1-20ng, Plasmide 250ng-3µg)
Primer
5x Puffer (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)
ABI-BigDye (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)
ddH₂O

2.2.2.5 Reverse Transkription

Die reverse Transkription wurde mit dem RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas (St.Leon-Rot, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Sie diente zur Herstellung der RaLV-env spezifischen cDNA (Primer Nr. 53+54 Abschnitt 2.1.5, Abschnitt 3.1.3.1).

2.2.3 Arbeiten mit Proteinen und Peptiden

2.2.3.1 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Für die bakterielle Expression der Antigene wurde der *E. coli* Stamm BL-21-CodonPlus(DE3)-RP (Stratagene, Niederlande, Tabelle 2.1) verwendet. Dazu wurde das gewünschte Expressionsvolumen mit einer Übernachtskultur in Selektionsmedium auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft. Die Kultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C/220rpm schüttelnd inkubiert. Dann erfolgte die Induktion der Expression mittels Zugabe von Isopropylthiogalaktopyranosid (IPTG) in einer Endkonzentration von 1 mM. Das Galaktoseanalogon IPTG vermittelt die Induktion der Expression des auf dem Plasmid pCal-n (Stratagene, La Jolla, USA) kodierten Proteins über eine Katabolitenrepression. Dabei titriert das im Überschuss zugegebene IPTG den Gal-Repressor des Gal-Promotors aus und dereprimiert die Expression der *downstream* Gene. Nach der Expression für 3 h bei 37°C/220rpm wurden die Bakterien durch Zentrifugation (10.000xg/10min/4°C) geerntet. Da alle hier generierten Proteine unlöslich in physiologischen Lösungsmitteln

waren, wurde der Überstand jeweils verworfen und nur die Zellen wurden weiter verarbeitet (z.B. SDS-PAGE Analyse & Western Blot) oder bei -20°C gelagert.

2.2.3.2 Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA-Agarose

Das Antigen UR038 war, wie alle anderen Proteinantigene auch, unlöslich in physiologischen Lösungsmitteln. Es wurde daher über den angefügten 6xHis-Tag unter denaturierenden Bedingungen affinitätschromatographisch über eine Ni-NTA-Matrix gereinigt. Zusätzlich wurden das gp36 von HIV-2 für die Immunisierung und das gp41 von HIV-1 (=UR040, Anhang A-III und A-VII) für ELISA bzw. Western Blot Analysen auf diese Weise gereinigt. Hierzu wurde das Bakterienpellet nach Expression in einem 25stel des Expressionsvolumens im Lysepuffer (s.u.) resuspendiert. Zum Aufschluss wurde die Lösung 3x20 s mit Ultraschall (Duty Cycle: 50 % / Output Max: 5) behandelt. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur in einem Überkopfschüttler, um möglichst viel Protein aus dem Zellpellet zu lösen. Die Separation von Zellresten und Lysat erfolgte durch Zentrifugation (15 min/12.000xg/RT). Der Überstand wurde auf die zuvor mit Lysepuffer (fünffaches Säulenvolumen) äquilibrierte Ni-NTA-Säule gegeben. Es wurde nach dem Herstellerprotokoll verfahren. Nach dem Waschen der Säule (zehnfaches Säulenvolumen mit Waschpuffer) erfolgte die pH-abhängige Elution mit Elutionspuffer in 1 ml Fraktionen.

Grundpuffer 8 M Harnstoff / 0,1 M NaH₂PO₄ / 0,01 M Tris-Cl

Lysepuffer pH=8,0

Waschpuffer pH=6,3

Elutionspuffer pH=4,5

Die Puffer wurden immer unmittelbar vor der Verwendung frisch angesetzt.

2.2.3.3 Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Zur Darstellung der rekombinanten Proteine wurde die diskontinuierliche Tricin-Sodium-Dodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Hierbei werden zwei Gelmatrices verwendet, welche sich im pH-Wert des Gelpuffers unterscheiden. Dadurch kommt es zu einer Ausbildung eines Feldstärkegradienten zwischen Sammel- und Trenngel, welcher es den Proteinen in einer Spur ermöglicht nahezu zeitgleich ins Trenngel einzutreten. Die SDS-Gele wurden bei konstanter Stromstärke (Sammelgel: 0,03 A Trenngel: 0,05 A) gefahren. Die Trennung erfolgte vertikal in der Gelapparatur Hoefer SE 250 (Hoefer, Holliston, USA). Die Stärke der Gele betrug 1,5 mm. Die Trenngele hatten, soweit nicht anders vermerkt, einen Polyacrylamidanteil von 10 % und die Sammelgele einen von 4 %. Zur Abschätzung der Molekulargewichte wurde als Massenstandard 6 µl des Markers PAGE-RULER (Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland) eingesetzt. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit gleichem Volumen Tricin-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend für 5 min bei 13.000xg zentrifugiert.

Durch eine Coomassie Blau Färbung wurden die getrennten Proben sichtbar gemacht. Die Färbung erfolgte für 30 min und die anschließende Entfärbung für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur. Alternativ konnte das Gel auch zur Western Blot Detektion eingesetzt werden.

Kathodenpuffer	100 mM Tris-Base (pH=8,25); 100 mM Tricin; 0,1 % (w/v) SDS
Anodenpuffer	200 mM Tris-Base (pH=8,9)
Gelpuffer	3 M Tris-Base (pH=8,45); 0,3 % (w/v) SDS
2 x Tricin-Probenpuffer	100 mM Tris-Base (pH=6,8); 24 % (w/v); Glycerin; 0,8 % (w/v); SDS; 0,04 % (w/v); Coomassie Brilliant Blau G-250; 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol
Färbelösung	50 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 0,2 % (v/v) Coomassie Brilliantblau G-250
Entfärbelösung	25 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure

2.2.3.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen und Peptiden

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem BCATM Protein Assay Kit der Firma Pierce (Rockford, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Alternativ erfolgte eine Messung der Proteinkonzentration bei 280 nm am Eppendorf Biophotometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) in einer Küvette (Schichtdicke 10 mm) gegen das Lösungsmittel.

2.2.3.5 Acetonfällung von Proteinen

Zur Extraktion von Proteinen aus dem Medium wurde Medium mit -20°C kaltem Aceton im Verhältnis 1:4 gemischt und für 2 Stunden oder über Nacht bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch zentrifugiert (20 min/15.000 x g/4°C). Der Überstand wurde verworfen und das restliche Aceton verdampfte unter dem Abzug für 10 min bei Raumtemperatur. Das Proteinpellet wurde anschließend in der gewünschten Menge PBS oder ddH₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.2.4 Immunologische Techniken

2.2.4.1 Western Blot

Der Nachweis der Induktion spezifischer Antikörper, sowie der Nachweis der Expression von Antigenen erfolgten mittels Western Blot. Dazu wurden Antigene (1-5 μg /Bahn) bzw. Zelllysate (10-50 μg /Bahn) auf ein SDS-PAA-Gel geladen und größenabhängig getrennt. Der Transfer der separierten Proteine erfolgte mittels Semi-Dry Western Blot Verfahren (Biorad Trans-Blot SD[®], Semi-Dry Transfer Cell, Biorad, Hercules, USA). Die Proteine wurden für 45 min bei 12 V auf eine PVDF-Membran geblottet (Polyvinylidendifluorid, 0,2 μm , Millipore, Billerica, USA). Anschließend wurde die Membran für 2 h bei Raumtemperatur blockiert (10 % FKS in PBS), um alle noch freien Bindungsstellen zu sättigen. Die Inkubation mit den in Blockierungspuffer verdünnten Seren (1 : 350 - 1 : 1000) oder monoklonalen Antikörpern (0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) erfolgte über Nacht. Danach wurde die Membran dreimal für 10 min mit 50 ml Waschpuffer (PBS/0,05 % Tween20/pH 7,4) gewaschen.

Die Inkubation mit dem zum Primärantikörper (pAK) speziesspezifischen Peroxidase (POD)-konjugiertem Sekundärantikörper (sAK) erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur. Wiederum wurde die Membran drei Mal gewaschen und danach für 10 min in 50 ml einer 25 mM Tris-HCl (pH 8,0) geschwenkt. Die Detektion erfolgte durch Zugabe einer Substratlösung (25 mM Tris-HCl (pH=8,0)/ 0,5 mg/ml Diaminobenzidin (DAB/0,05 % H₂O₂). Das Abstoppen der Braunfärbung der Banden wurde durch Schwenken der Membran in bidest. Wasser erreicht. Die Lagerung der Membranen erfolgte nach der Trocknung mittels Filterpapier in Folien eingeschweißt und lichtgeschützt.

2.2.4.2 Enzym Linked Immunosorbend Assay (ELISA)

Die Quantifizierung im Serum enthaltener Antikörper erfolgte mittels ELISA. Das jeweilige Antigen wurde in einem Carbonatpuffer (pH=9,5, 100 mM Na₂CO₃, 100 mM NaHCO₃+2H₂O) an das Trägermaterial der ELISA-Platten (Nunc, USA) adsorbiert (100 ng/Well). Zur Bestimmung der Immunantwort gegen das E1 oder E2-Peptid von HIV wurden die Peptide in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst (1mg/ml) und dann in ddH₂O auf 1 µg/ml verdünnt. Davon wurden 100 ng/Well über Nacht bei 37°C ge-coated. Es folgte ein Waschschrift (3x mit PBS-T (=PBS mit 0,05 % Tween 20)). Die Blockierung wurde mit 10% FKS in PBS für 1 h bei 37°C durchgeführt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper oder Serum in entsprechender Verdünnung in Blockierungslösung erfolgte bei 37°C für 2h. Wiederum schloss sich ein Waschschrift an (3x mit PBS-T). Der speziesspezifische, enzymkonjugierte Sekundärantikörper wurde in Blockierungspuffer verdünnt und für 2h bei 37°C auf den Platten inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift (6 x mit PBS-T). Der ELISA wurde durch Zugabe der Substratlösung [OPD-Tablette (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) in 30 ml ddH₂O gelöst + 250 µl H₂O₂] und für maximal 15 min im Dunkeln entwickelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 N H₂SO₄ abgestoppt. Anschließend wurden die Platten bei 492nm/620nm im ELISA-Reader (Tecan, Crailsheim, Deutschland) gemessen und die Daten mit Microsoft Excel ausgewertet.

2.2.4.3 Durchflusscytometrie

Zur Darstellung der Oberflächenexpression der für die DNA-Immunisierung verwendeten Hybridantigene wurde die Durchflusscytometrie verwendet. Hierbei wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper mit Zellen inkubiert, die dann hinsichtlich ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenzsignale in allen Kombinationen analysiert werden konnten. Für die Färbung der Rat1-Zellen wurden 10⁹ Zellen mit dem Zellschaber von dem Boden der Zellkulturflasche gelöst. Nach dreimaligem Waschen mit 1 ml eiskaltem PBS (Zentrifugation 5 min/800 x g) wurden die Rat1-Zellen mit 10 µg/ml 2F5 für 30 min in je 200 µl PBS auf Eis im Dunkeln inkubiert. Alle 10 min wurden die Zellen leicht aufgewirbelt. Anschließend folgten wiederum drei Waschschriffe, wie zuvor beschrieben. Die Rat1-Zellen wurden danach mit dem Sekundärantikörper α-human-FITC (200 µl 1:1000 in PBS, Sigma) für 30 min bei 4°C abgedunkelt inkubiert. Anschließend wurden sie drei Mal mit 1ml PBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte durch Zugabe von 500µl 2%igem Formaldehyd in PBS. Die Zellen konnten nun am FACScalibur (BD

Biosciences, San Jose, USA) untersucht werden. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software CellQuest Pro (BD Biosciences, San Jose, USA).

2.2.4.4 Epitopkartierungen

Zur exakten Identifizierung der Bindungsspezifitäten der induzierten Antiseren, sowie der monoklonalen Antikörper 2F5 und 4E10 wurden Pepspot-Membranen (JPT, Berlin, Deutschland) verwendet. Diese bestehen aus überlappenden Oligopeptiden, welche die Sequenz des jeweiligen Antigens umfassen. Die Peptide wurden kovalent über den C-Terminus auf eine Zellulose-Membran gespottet. N-terminal sind sie mit einem Acetylrest als Schutzgruppe versehen. In dieser Arbeit wurden Pepspotmembranen von HIV-gp41 (HIV-1 Ba-L und HIV-1 IIIB), UR004 und HIV-2gp36 (HIV-2_{7312A}) (Anhang A-V) verwendet.

Die Kartierung der Epitope erfolgte nach Herstellerangaben. Die Seren wurden, sofern nicht anders vermerkt, 1:750 in Blockierungspuffer verdünnt. Das jeweilige Präimmenserum diente als Kontrolle.

2.2.5 Zellkulturarbeiten

2.2.5.1 Umgang mit Zelllinien

Die Zellen wurden zwei Mal pro Woche mit frischem Medium versorgt. Es wurden die Standardmedien RPMI (Rosswell Park Memorial Institut) und DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 10 % (v/v) FKS, 100 µg/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10mM HEPES und 4 mM Glutamin verwendet. Die Cryokonservierung der Zellen erfolgte in FKS mit 10 % DMSO und anschließender Lagerung bei -80°C für 24h. Danach wurden die Zellstocks in der Gasphase von flüssigem Stickstoff bei -196°C dauerhaft gelagert. Alle für die *in vitro* Versuche benutzten Zelllinien sind hier zusammengefasst:

2.2.5.2 Transfektion von Rat1-Zellen

Zur Transfektion, dem Einbringen von Plasmid-DNA in eukaryontische Zellen, wurde die Lipofektion mittels Lipofectamine2000® (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) eingesetzt. Die Transfektion diente in dieser Arbeit dazu, die Oberflächenexpression der für die DNA-Immunisierung hergestellten Konstrukte *in vitro* zu überprüfen. Es wurden 24 h vor der Transfektion 4×10^5 Rat1-Zellen/Well in einer 6-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Pro Konstrukt wurde je 4 µg Plasmid einer Endo-Free-Maxi-Prep (Firma, Ort) eingesetzt. Der Transfektionsvorgang richtete sich nach Herstellerangaben. Nach erfolgreicher Selektion stabil transfizierter Rat1-Zellen mittels 600 µg/ml Geneticin G418 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) im Kulturmedium wurden die Zellen durch PCR, im IPA und im FACS untersucht.

2.2.6 Arbeiten mit infektiösem Virus

2.2.6.1 Herstellung von infektiösen HIV-Stocks

Die Kultivierung der verwendeten HIV Isolate (Abschnitt 2.1.9 und 3.1.1) erfolgte auf humanen Peripheren mononukleären Zellen (engl.: *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC). Die Isolation der PBMCs wurde mittels Dichtegradientenzentrifugation in Ficoll-Röhrchen nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden Zellen aus zwei Buffy Coats (Blutspendedienst, Berlin Wannsee) isoliert und anschließend gepoolt, um den Einfluss einer eventuellen Mutation des Korezeptors CCR5 zu umgehen. Bei 5-14 % aller Europäer tritt die so genannte CCR5-delta32 Variante des Rezeptors auf und erschwert so den HIV Eintritt (Sabeti *et al.*, 2005). Die Generierung der infektiösen Überstände erfolgte für alle verwendeten Viren nach dem gleichen Schema (Abbildung 2.2).

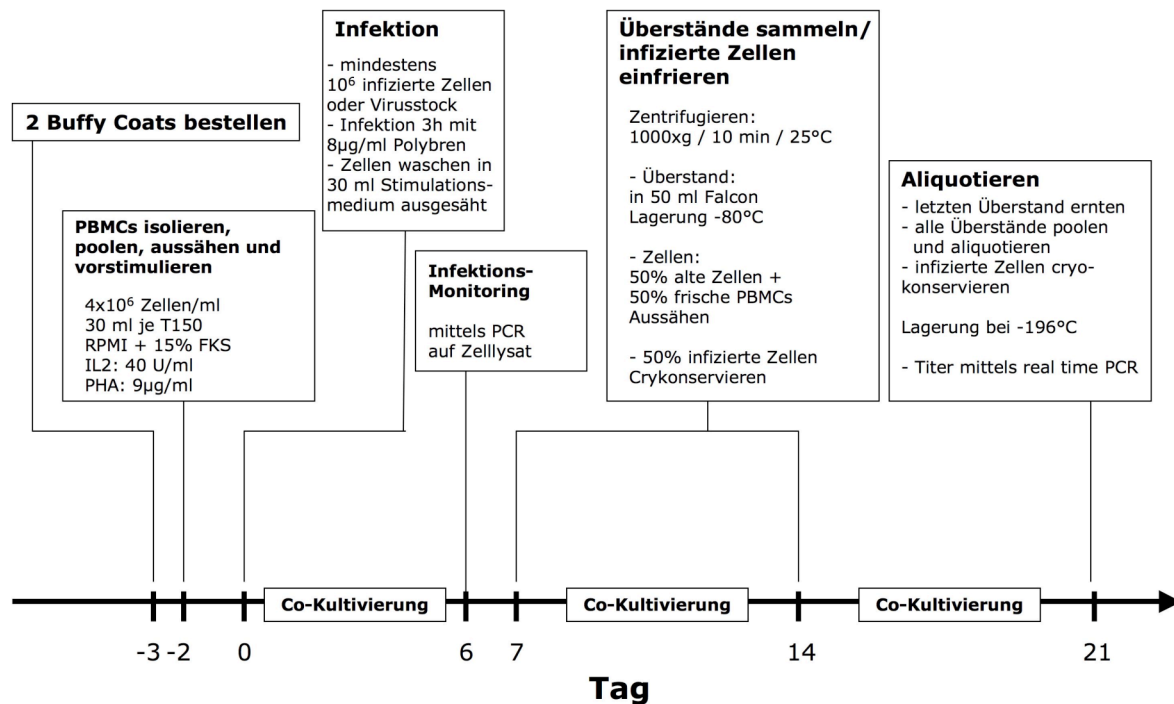


Abbildung 2.2: Zeitstrahl zur Herstellung der infektiösen Virusstocks für die verwendeten HIV-Isolate.

2.2.6.2 *In vitro* Neutralisationstest

Zur Bestimmung der neutralisierenden Aktivität eines induzierten Immuserums wurde ein real time PCR basierter Neutralisationstest verwendet. Alle Tests wurden in 96-Well Zellkulturplatten durchgeführt. Das zu testende Serum wurde in der gewünschten Verdünnung (Endvolumen 20µl) mit einer vorher bestimmten Virusverdünnung (Endvolumen 80µl) für 30 min bei 37°C vorinkubiert. Danach wurden das Serum-Virus-Gemisch (100µl) und die Zielzellen (100µl) vereint. Für CXCR4-trope HIV-Stämme (z.B. HIV-1 IIIB) wurden 5x10⁴ C8166-Zellen pro Well (Suspensionszellen) nach der

Präinkubation zum Testgemisch gegeben. Für den Test von CCR5-topen HIV-Isolaten (z.B. HIV-1 Ba-L) wurde das Testgemisch auf 24 h zuvor ausgesäte GHOST-R5 Zellen (10^4 /Well, adhärrent) pipettiert. Der fertige Reaktionsansatz inkubierte für 65h bei 37°C/5% (v/v) CO₂. Anschließend wurde der Überstand verworfen und verbliebenes Virus durch Inkubation für 20 min bei 99°C inaktiviert. Das Aufschließen der Zellen erfolgte durch eine Frier-Tau Lyse (=3x 20min/-80°C & 5 min/60°C). Anschließend wurden 100µl Lysepuffer (0,2mg/ml Proteinase K, 10% (v/v) PCR-Puffer, ad 100% nukleasefreies Wasser) je Well hinzu pipettiert. Die versiegelten Platten wurden für 3 h bei 60°C inkubiert, um PCR inhibierende Proteine mittels Proteinase K zu degradieren. Danach erfolgte die Inaktivierung der Proteinase K für 30 min bei 95°C. Zur Quantifizierung der Proviruslast wurden 3 µl der Zelllysate in die real time PCR eingesetzt. Alle Werte wurden als Triplikat bestimmt und der Antikörper 2F5 (5 µg/ml oder 10 µg/ml) sofern nicht anders vermerkt als Positivkontrolle für Neutralisation mitgeführt.

2.2.7 Tierversuche

2.2.7.1 Versuchstiere

Zur Immunisierung wurden 8-12 Wochen alte, weibliche Wistar-Ratten vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR, Berlin, Deutschland) oder Charles River (Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Tiere wurden in der Tierversuchsabteilung des Robert Koch-Instituts oder am BfR in Marienfelde gehalten. Die Versuchstiere der Studie bei Eurogentec wurden von Charles River bezogen und in Seraing (Belgien) gehalten.

2.2.7.2 Applikation der Antigene

Die Antigenemulsion wurde durch Vermischen (1 : 1) des Antigens (in PBS) mit Freund´s Adjuvant (Pierce, Bonn, Deutschland) mittels Resuspendieren durch eine 0,6 mm Kanüle (BD, Heidelberg, Deutschland) hergestellt. Die Ratten wurden intramuskulär (je 250 µl in die Muskulatur der Hinterläufe) und subcutan (500 µl unter das Nackenfell) immunisiert. Der Boost erfolgte am Tag 21 (p.I.) nach gleichem Applikationsschema. Es wurden, sofern nicht anders vermerkt, 250 µg Antigen pro Applikation verabreicht. Die Immunisierung bei Eurogentec erfolgte nach dem firmeninternen Protokoll (Classic 87-day polyclonal package).

Die Applikation der DNA erfolgte mittels Helios GeneGun®. Dazu wurde pro Applikationstag drei Mal auf der rasierten Bauch der Ratte mit einem Druck von 400 psi geschossen (1 µg/Schuss, siehe 2.2.7.3). Es folgten zwei Boosts (Tag 21 und Tag 42 p.I.). Für die Applikation wurde der vom Hersteller mitgelieferte Abstandshalter auf die GeneGun geschraubt.

2.2.7.3 Beschichtung der Tefzel-Schläuche für die ballistische Immunisierung

Für die ballistische Immunisierung mussten Tefzel-Schläuche mit DNA-beladenen Goldpartikeln beschichtet werden. Der Tefzel-Schlauch wurde vor der Beladung mit 100% Ethanol gespült und anschließend mit Stickstoff für 1 h begast, um ihn zu trocknen. Während dieser Zeit wurden 25 mg Goldpartikel (\varnothing 1 μm) in 100 μl 0,05 M Spermidin (in ddH₂O) aufgenommen und 5 s durch vortexen vereinzelt. Verbliebene Aggregate der Goldpartikel wurden durch 3-5 s Beschallung mittels Ultraschall (Bandelin, Berlin, Deutschland) aufgeschlossen. Anschließend wurden 50 μg Plasmid-DNA in 100 μl ddH₂O in die Suspension gegeben, und es wurde erneut 5 s gevortext. Die Präzipitation der DNA an die Goldpartikel erfolgte durch die tropfenweise Zugabe von 100 μl 1M CaCl₂-Lösung bei vorsichtiger Bewegung des Gemisches. Nach zehnminütiger Inkubation wurden die DNA-beladenen Goldpartikel dreimal mit 100 %igem Ethanol (möglichst wasserfrei gehalten) gewaschen. Danach wurden sie in 3 ml 0,025 mg/ml PVP (Polyvinylpyrrolidon) (in 100 %igem Ethanol) aufgenommen. Erneut erfolgte eine kurze Vereinzlung (3-5 s) der DNA-Gold-Partikel im Ultraschallbad. Im Anschluss wurden diese mit einer 10 ml-Spritze in den Tefzel-Schlauch gesaugt. Der Schlauch wurde in die Biorad Tubing Prep Station[©] gespannt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit sanken die Gold-DNA-Partikel zu Boden. Mit der 10 ml-Spritze wurde der Überstand vorsichtig abgezogen. Der Schlauch rotierte alle 30 s um 45°. Nachdem er eine vollständige Umdrehung vollbracht hatte, wurde er erneut für 2 min rotiert. Das sollte eine gleichmäßige Verteilung der Goldpartikel über die inner Oberfläche des Schlauches gewährleisten.

Anschließend wurde der beschichtete Schlauch aus der Tubing Prep Station herausgezogen und mit dem Biorad *Tubing Cutter* in 1 cm lange Fragmente geschnitten. Die Lagerung der Munition erfolgte bei 4°C in einem Excikator.

Ca. 45-47 Fragmente konnten aus einer Präparation gewonnen werden. Da 50 μg DNA ursprünglich präzipitiert wurden, kann man von einer Applikationsmenge von ca. 1 μg /Schuss ausgehen.

2.2.7.4 Blutabnahme und Serumgewinnung

Die Blutentnahme erfolgte durch retrobulbäre Punktion unter Inhalationsnarkose mit Isofluran (Cuarmed, Karlsruhe, Deutschland). Das Blutungsintervall lag bei 14 Tagen. Das frisch abgenommene Blut wurde 30min bei 20°C und danach 15h bei 4°C gelagert. Anschließend wurde das entstandene Koagulat 15min bei 10.000xg pelletiert. Der Überstand (=Serum) wurde abgenommen und für 45min bei 56°C inaktiviert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C unter der Zugabe von Penicillin/Streptomycin (je 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder bei -20°C ohne die Zugabe von Antibiotika.

3. Ergebnisse

3.1 Optimierung des real time PCR basierten Neutralisationstests für Retroviren

Um die Immunisierungsstudien systematisch auswerten zu können, wurde der angewandte Neutralisationstest durch Kontrollen zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse und zum Nachweis der Virusspezifität erweitert.

3.1.1 Generierung und Charakterisierung von infektiösen Virusstocks aller Gruppen und Subtypen von HIV-1 sowie drei HIV-2 Isolaten

Um die durch Immunisierung induzierten Antiseren auf subtypenübergreifende Neutralisation von HIV-1 Isolaten zu testen, wurden infektiöse Virusstocks verschiedener HIV Isolate hergestellt. Die vom AIDS-Reagent Programm des National Institutes of Health (NIH) in den USA bezogenen Virusstocks wurden auf Peripheren Mononukleären Blutzellen (PBMCs), wie in Abschnitt 2.2.6.1 beschrieben, expandiert. Während der Kultivierung der Zellen wurde die Infektion mit HIV spezifischen Primern durch den PCR-Nachweis der Provirusintegration überwacht (Abbildung 3.1).

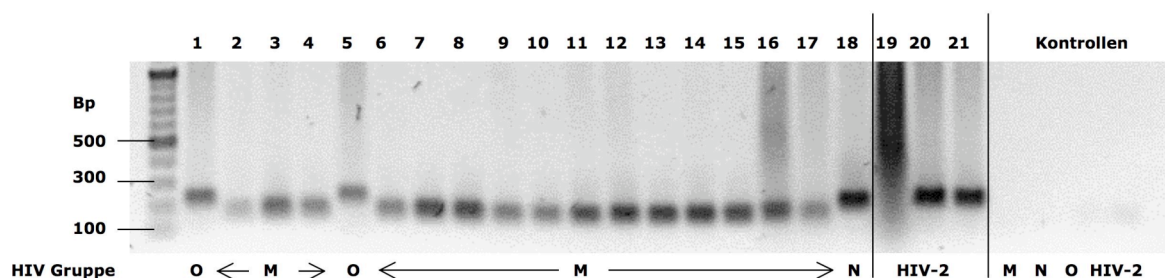


Abbildung 3.1: Nachweis der Infektion humaner PBMCs mit den verschiedenen HIV Isolaten zur Herstellung infektiöser Virusstocks mittels gruppenspezifischer PCR. Die Nummerierung der Isolate ist in Tabelle 3.1 aufgeschlüsselt.

Der Test der gewonnenen zellfreien Überstände auf Infektiösität erfolgte nach dem Schema des Neutralisationstest (Abschnitt 2.2.6.2). Bis auf das Isolat 19 (HIV-2 CDC310342) konnten für alle Viren infektiöse Überstände generiert werden. Es folgte eine Titerbestimmung aller HIV-Isolate, um im Neutralisationstest eine vergleichbare Anzahl an Viruspartikeln einzusetzen (Tabelle 3.1).

Es konnten für 14 Isolate der HIV-1 Gruppe M infektiöse Überstände gewonnen werden. Zwei Isolate der Gruppe O und ein Isolat der Gruppe N, sowie zwei HIV-2 Isolate konnten ebenfalls expandiert werden. Als Standardviren für die Neutralisationstests wurden die Viren HIV-1 Ba-L (R5-troper Stamm) und HIV-1 IIIB (X4-troper Stamm) der Gruppe M verwendet.

Nr.	Bezeichnung	Gruppe	Subtyp	Corezeptor	Acc. No.	TCID ₅₀ / 0,1 ml
1	HIV-1 MVP5180	O		CCR5	L20571	10 ^{4,8}
2	HIV-1 92RW020	M	A	CCR5	U08794	10 ^{2,5}
3	HIV-1 SE364 (GS015)	M	C	CCR5	L22944	10 ^{3,4}
4	HIV-1 HH8793 (GS029)	M	G	CCR5	AF061641	10 ^{3,8}
5	HIV-1 BCF13	O		CCR5	Y14503	10 ^{2,1}
6	HIV-1 UG268 (GS012)	M	C	CCR5	L22948	10 ^{2,5}
7	HIV-1 BR 93/020	M	F	CCR5	U27401	10 ^{4,8}
8	HIV-1 BZ126 (GS030)	M	F	CCR5	L22082	10 ^{4,8}
9	HIV-1 93TH053	M	E	CCR5	k. A.	10 ^{3,9}
10	HIV-1 R132	M	G	CCR5	k. A.	10 ^{2,5}
11	HIV-1 92UG038 (UG 92-038)	M	D	CCR5	AY669759	10 ^{3,9}
12	HIV-1 93TH054	M	E	CCR5	AB220945	10 ^{2,5}
13	HIV-1 UG 8367	M	k. A.	CCR5	k. A.	10 ^{2,1}
14	HIV-1 96USHIPS9	M	B	CCR5	k. A.	10 ^{4,8}
15	HIV-1 96USSN20	M	A	CCR5	AF096341	10 ^{4,8}
16	HIV-1 Ba-L	M	B	CCR5	AB221005	10 ^{5,4}
17	HIV-1 IIIIB	M	B	CXCR4	X01762	10 ^{6,9}
18	HIV-1 YBF-30	N		CCR5	AJ006022	10 ^{4,8}
19	HIV-2 CDC 310342		k. A.	CXCR4	k. A.	-
20	HIV-2 60415K		A	CXCR4	EU293547 (LTR)	10 ^{3,9}
21	HIV-2 7312A		A/B	CXCR4	L36874	10 ^{4,8}

Tabelle 3.1: Übersicht der kultivierten HIV Isolate, deren Charakterisierung und mittels real time PCR bestimmter TCID₅₀ Werte. k. A.=keine Angaben in der NCBI Datenbank

3.1.2 Etablierung eines Taqman PCR-Systems für die HIV-1 Gruppen N und O

Die E2 Sequenzen der HIV-1 Gruppen M, N und O unterscheiden sich (Abschnitt 3.1.3). Zur Induktion HIV-1 Gruppe N und HIV-1 Gruppe O spezifischer neutralisierenden Antikörper sollten die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Hybridantigene an diese Sequenzen angepasst werden. Da die bisher verwendete real time PCR nur HIV-1 Gruppe M Isolate detektiert, musste eine vergleichbare real time PCR für die Gruppen N und O für die Durchführung der Versuche etabliert werden. Diese real time PCR sollte in der Folge auch als interne Kontrolle der Gruppenspezifität von virusneutralisierenden Antisera eingesetzt werden.

Die Primer und die Sonde wurden so gewählt, dass eine Diskriminierung zwischen den Gruppen N und O über die Auswahl der Primer möglich ist. Die für die Sonde gewählte Hybridisierungssequenz ist in beiden Isolaten konserviert (Abbildung 3.2). Um möglichst in einem PCR Lauf alle Kontrollen einsetzen zu können, wurde dieses System zur Provirusquantifizierung den PCR-Bedingungen der bereits vorhandenen Gruppe M spezifischen real time PCR angepasst, so dass dieses Reaktionsprofil verwendet werden konnte (Abschnitt 2.2.2.2).

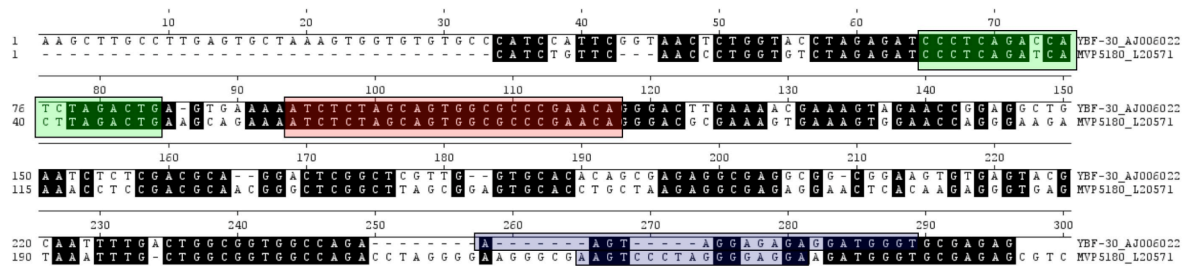


Abbildung 3.2: Lokalisation der Primer und der Sonde zur Detektion von Proviren der HIV-1 Gruppen N und O. Während die Sonde (rot) beide Isolate detektiert, kann eine Unterscheidung der Viren über die Wahl der Vorwärtsprimer (grün) bzw. Rückwärtsprimer (violett) erfolgen. Die Sequenzen der Oligonukleotide können dem Abschnitt 2.1.5 (Nr. 14-18) entnommen werden.

Um Kreuzreaktionen der Isolate auszuschließen, wurden die gewählten Primersets auf dem jeweils anderen Isolat in einer PCR getestet. Eine Kreuzreaktion konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 3.3).

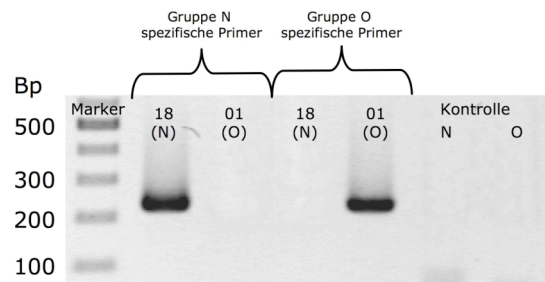


Abbildung 3.3: Darstellung der Gruppenspezifität der Primer HIV-1-N-For & HIV-1-N-Rev, sowie HIV-1-O-For und HIV-1-O-Rev. Template für die PCR waren jeweils Lysate von PBMCs infiziert mit HIV-1 YBF-30 (Gruppe N, Isolat Nr. 18, Tabelle 3.1) oder mit HIV-1 MVP5180 (Gruppe O, Isolate Nr. 01, Tabelle 3.1). Die Primer binden gruppenspezifisch. Als Kontrolle wurde Wasser eingesetzt.

Zur Charakterisierung der real time PCR und zur Bestimmung der Amplifikationseffizienz wurde ein Plasmidstandard generiert (Abschnitt 2.2.2.3). Daraufhin wurden Verdünnungsreihen mit definierter Kopienzahl für die Bestimmung der Effizienzen beider PCRs erstellt (Abbildung 3.4).

Die Nachweisgrenzen der PCRs für die HIV-1 Gruppen N und O lagen bei 10 bzw. 40 Kopien pro Reaktionsansatz. Für die Gruppe N spezifische real time PCR konnte eine Effizienz von 99,4 % festgestellt werden. Die Effizienz der Gruppe O spezifischen real time PCR lag bei 97,9 %.

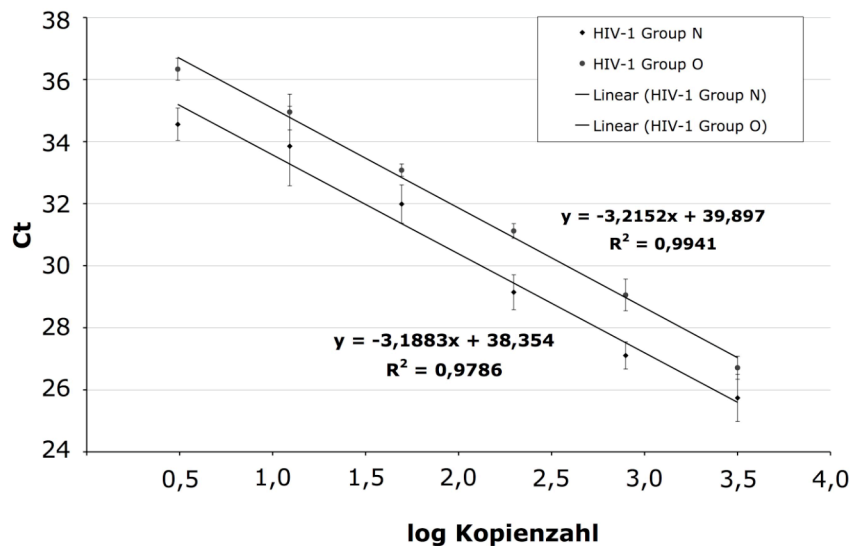


Abbildung 3.4: Bestimmung der Effizienz der HIV-1 Gruppe N bzw. Gruppe O spezifischen real time PCRs. Es wurden 4-fach Verdünnungsreihen beider Plasmidstandards von 10^4 bis 2,4 Kopien je Ansatz gemessen. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus Triplikaten mit der Standardabweichung.

3.1.3 Etablierung einer Taqman real time PCR für HIV-2 als interne Kontrolle

Der Vergleich der MPER-Aminosäuresequenz der transmembranen Hüllproteine von HIV-1 Gruppen M, N, O mit der MPER-Sequenz des transmembranen Hüllproteins von HIV-2 zeigte, dass die Zielepitope der Immunisierungsstudien in diesen Viren nicht vorkommen (Abbildung 3.5). Es sollte überprüft werden, ob sich HIV-2 Viren daher als Kontrolle zur Virusspezifität innerhalb des *in vitro* Neutralisationstests einsetzen lassen.

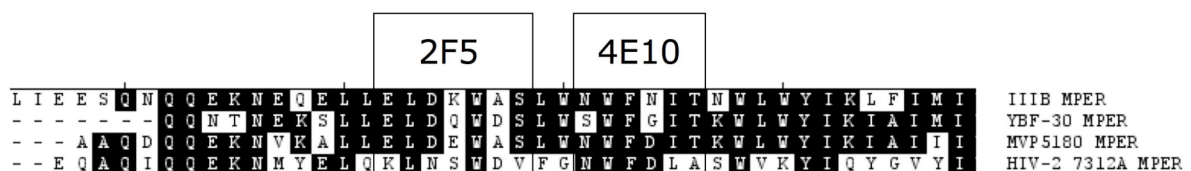


Abbildung 3.5: Alignment der Aminosäuresequenz der MPER von HIV-1 IIIB (X01762), HIV-1 YBF-30 (AJ006022), HIV-1 MVP5180 (L20571) und HIV-2 7312A (L36874). Die Kästen markieren die Epitope der HIV-1 breit neutralisierenden Antikörper 2F5 und 4E10. Das zur Kontrolle vorgesehene Isolat HIV-2 7312A zeigt keine Übereinstimmungen mit den Kernsequenzen der beiden Antikörper und kann somit als Kontrolle zur Virusspezifität im *in vitro* Neutralisationstest fungieren.

Es wurde eine HIV-2 spezifische real time PCR als Grundlage eines HIV-2 spezifischen *in vitro* Neutralisationstests etabliert. Aufgrund der funktionellen Beteiligung an der Transkription von proviralen Sequenzen, sind die LTRs von Retroviren auf Nukleotidenebene konserviert (Abschnitt 1.2). Daher sollten diese als Zielsequenzen für die HIV-2 spezifische real time PCR dienen. Zum Zeitpunkt der Etablierung dieser real time PCR war nur die Sequenzinformation von HIV-2_{7312A} (Gene Bank: L36874) in der GenBank vorhanden. Es wurde nur auf der Basis dieses Isolates die Primer HIV-2-LTR-F und HIV-2-LTR-R abgeleitet (Nr. 21, 22, Abschnitt 2.1.5). Da für das Virus HIV-2_{60415K} keine Sequenzinformation verfügbar war, wurde durch eine Temperatur-Gradienten-PCR

überprüft, ob die von HIV-2_{7312A} abgeleiteten Primer bei einer bestimmten Temperatur auch Sequenzen des anderen Isolates amplifizieren können (Abbildung 3.6).

Nachdem die optimale Annealing Temperatur von 54,5°C zur Amplifikation eines Bereiches der LTR von HIV-2_{60415K} festgestellt wurde, konnten die durch eine PCR mit den Primern HIV-2-LTR-F und HIV-2-LTR-R erhaltene Bande aus dem Gel extrahiert und sequenziert werden (Gene Bank: EU293547).

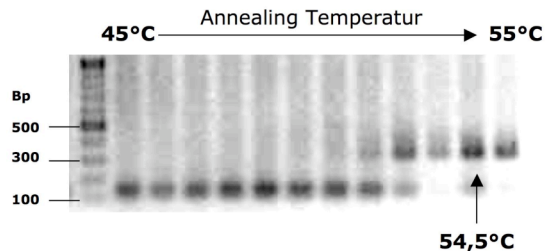


Abbildung 3.6: Agarosegel der Temperaturgradienten PCR mit den Primern HIV-2-LTR-F und HIV-2 LTR-R. Als Template diente ein Lystat von humanen PBMCs infiziert mit HIV-2_{60415K} (Nr. 20, Tabelle 3.1). Bei einer Annealing Temperatur von 54,5°C konnte ein Amplifikat mit der erwarteten Größe von 319 Bp optimal generiert werden.

Durch einen Sequenzvergleich der LTRs der beiden verwendeten Isolate mit weiteren HIV-2 Isolaten, sollten konservierte Bereiche in der LTR dieser Viren lokalisiert werden. Aus den konservierten Bereichen wurden die Primer und die Sonde abgeleitet (Abbildung 3.7).

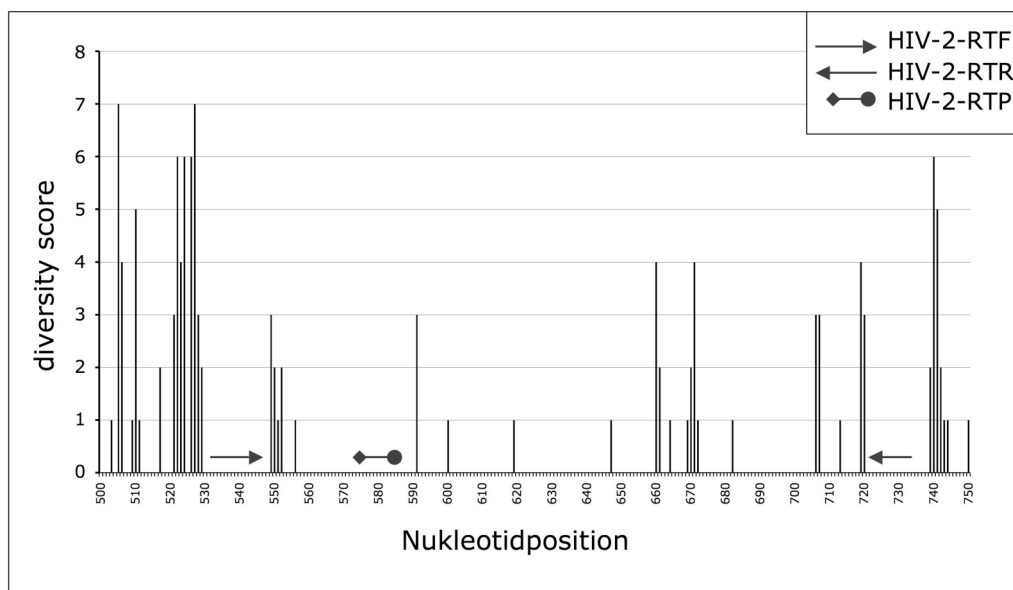


Abbildung 3.7: Diversity Score Plot (DSP) der LTR Sequenzen von acht verschiedenen HIV-2 Isolaten. Die Balken zeigen den Grad der Sequenzdiversität auf Nukleotidebene der miteinander verglichenen Isolate. Bereiche ohne Balken, stellen 100 % identische Sequenzen dar und waren somit bevorzugte Hybridisierungsregionen für Primer und Sonde. Aus dieser Darstellung wurden die Primer HIV-2-RTF und HIV-2-RTR, sowie die Sonde HIV-2-RTP abgeleitet (Abschnitt 2.1.5, Nr. 23 - 25). Die auf der Abszisse dargestellte Nummerierung bezieht sich auf die Sequenz des Isolates HIV-2_{7312A} (L36874). Die folgenden Isolate wurden zum Sequenzvergleich herangezogen: HIV-27312A (L36874), HIV-260415K (EU293547), HIV-2 EHO (U27200), HIV-2 UCI (L07625), HIV-2 D205 (X61240), HIV-2 BEN (M30502), HIV-2 ALI (AF082339) and HIV-2 96FR12 (AY530889).

Um die HIV-2 Spezifität der gewählten Primersequenzen zu überprüfen, wurde auf dem Lysat HIV-infizierter PBMCs eine PCR durchgeführt. Die Primer amplifizierten spezifisch HIV-2 Sequenzen (Abbildung 3.8).

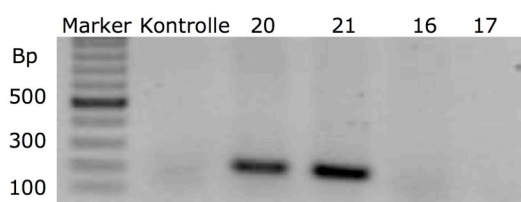


Abbildung 3.8: PCR zum Nachweis der Spezifität der Primer HIV-2-RTF und HIV-2-RTR. Das 209 bp große Amplifikat konnte nur in den Reaktionen generiert werden, in denen Lysate HIV-2 infizierter PBMCs als Template eingesetzt wurden (Banden 20 und 21). Auf den Lysaten HIV-1 infizierter PBMCs (16= HIV-1 Ba-L; 17=HIV-1 IIB, siehe Tabelle 3.1) konnten die Primer kein Amplifikat generieren. Ein Kreuzdetektion von den hier verwendeten HIV-1 Isolaten durch die HIV-2 real time Primer konnte somit ausgeschlossen werden. Als Kontrolle wurde Wasser eingesetzt.

Das zuvor für die Sequenzierung der LTR und das Design der real time PCR mit Primern HIV-2-LTR-F und HIV-2-LTR-R erstellte 319 bp große Amplifikat (Abbildung 3.6), diente als Standard zur Bestimmung der Effizienz der HIV-2 spezifischen real time PCR (Abbildung 3.9). Aus den Kenndaten der Regressionsgraden der Template-Titration konnte für die HIV-2 spezifische real time PCR eine Effizienz von 99,4 % errechnet werden. Die zuverlässige Nachweisgrenze lag bei 10 Kopien pro Ansatz.

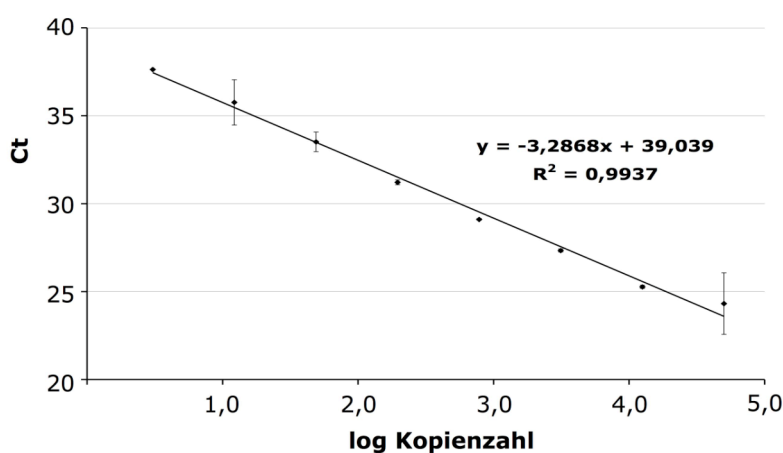


Abbildung 3.9: Bestimmung der Effizienz der HIV-2 spezifischen real time PCR. Es wurde eine vierfache Verdünnungsreihe von 5×10^4 bis 3,05 Kopien/Ansatz gemessen. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus Triplikaten mit der Standardabweichung.

Da es Ziel war, im Rahmen dieser Arbeit durch die Immunisierung mit Hybridantigenen, welche die Epitope der HIV-1 breit neutralisierenden Antikörper 2F5 und 4E10 tragen, ähnliche Antikörper im Versuchstier zu induzieren, mussten die beiden Referenzantikörper auf Neutralisation der als Kontrolle vorgesehenen HIV-2 Isolate getestet werden. 2F5 konnte keines der beiden getesteten HIV-2 Isolate neutralisieren (Abbildung 3.10). Damit konnten die Isolate HIV-2_{7312A} und HIV-2_{60415K} als Kontrolle im Neutralisationstest verwendet werden, um die Virusspezifität der induzierten Antiseren zu demonstrieren.

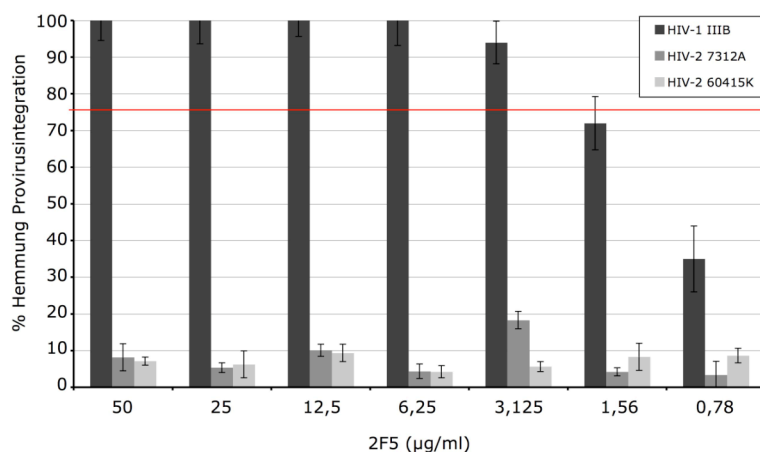


Abbildung 3.10: Ergebnis der Neutralisationstests von 2F5 mit HIV-1 IIIB, HIV-2 60415K und HIV-2 7312A. Der Antikörper 2F5 war nicht in der Lage mit einer maximalen Konzentration von 50 µg/ml eines der beiden hier getesteten HIV-2 Isolate zu neutralisieren. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus Triplikaten mit der Standardabweichung.

3.1.4 Etablierung der real time PCR-Systeme als Duplex PCR mit simultaner GAPDH Detektion

Zur Evaluierung der erhaltenen Werte in einem Neutralisationstest musste sicher gestellt sein, dass identische Zellzahlen zur Messung eingesetzt werden. Einflüsse auf die Proliferation und damit auf die am Messzeitpunkt zu Verfügung stehende Zahl an Zellen, können testbedingt auftreten. Seren können cytotoxische oder cytostatische Effekte in der Zellkultur bewirken. In vielen Testsystemen wie dem *p24-capture* ELISA wird die optische Kontrolle der Wells durchgeführt, um die Proliferation der Zielzellen während der Inkubationsphase zu überwachen. Zu dieser, auch bei dem real time PCR basierten *in vitro* Neutralisationstest durchgeführten Kontrolle, sollte nun ein Messwert für die Zellzahl generiert werden. Die Detektion des GAPDH-Gens auf genomischer DNA kann zur Kontrolle cytostatischer Effekte eingesetzt werden. Durch eine PCR, die spezifisch GAPDH in einer Probe detektiert, kann der erhaltene Wert mit einer bestimmten Zellzahl korreliert werden. Treten bei zwei zu vergleichenden Proben keine signifikanten Schwankungen dieses Messwertes auf, kann das als weiterer Beweis dafür gewertet werden, dass sich die bestimmte Proviruslast auf eine identische Zellzahl bezieht. Damit kann ein Serumeffekt, welcher die Zellteilung beeinflusst und damit zu falschen Ergebnissen bezüglich der möglichen Neutralisation führt, ausgeschlossen werden. Für die PCR konnte eine Effizienz von 99 % errechnet werden (Abbildung 3.11). Damit würde ein Unterschied von 1 Ct einen Zellteilungszyklus im Well markieren. Die Amplifikation von GAPDH erfolgte simultan als Duplex real time PCR mit dem getesteten Virus.

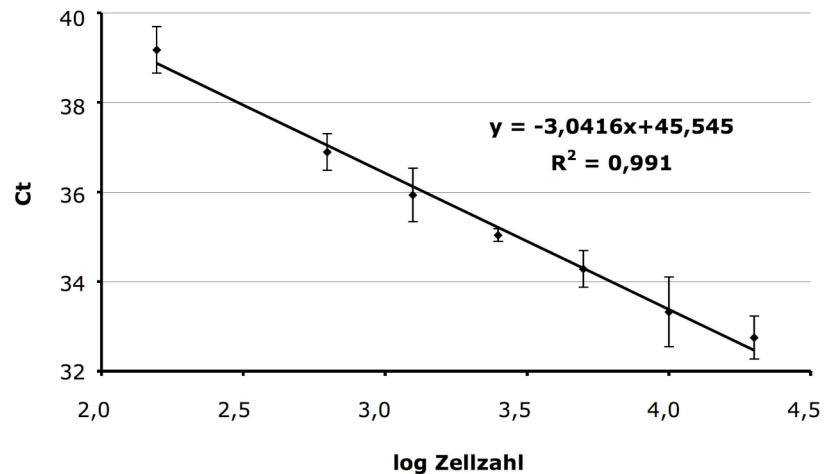


Abbildung 3.11: Bestimmung der Effizienz der GAPDH real time PCR. Es wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe von 2×10^4 bis 157 Zellen/Ansatz gemessen. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus Triplikaten mit der Standardabweichung.

3.2 Generierung rekombinanter Hybridantigene zur Induktion gp41 spezifischer HIV breitneutralisierender Antikörper

Wie im Abschnitt 1.3.3.2 beschrieben, nimmt das gp41 von HIV-1 aufgrund der Konserviertheit der Ektodomäne und der Isolation der beiden breitneutralisierenden gp41-spezifischen Antikörper 2F5 und 4E10 (Muster et al., 1993, Zwick et al., 2001) eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung einer B-Zell-Immunität induzierenden Vakzine ein. Da die Immunisierung mit rekombinatem gp41 nicht zur Induktion solcher Antikörper führte, wurden die Epitope und das Bindungsverhalten dieser Antikörper weiter charakterisiert. Basierend auf den in der Arbeitsgruppe erzielten Ergebnissen der Induktion neutralisierender Antikörper gegen das transmembrane Hüllprotein p15E von PERV (Fiebig et al., 2003), sollte eine neue Strategie zur Induktion von gp41-MPER spezifischen Antikörpern entwickelt werden. Da es gelang, mit rekombinatem p15E der γ -Retroviren neutralisierende Antikörper im Rattenmodell zu induzieren, deren Epitope ebenfalls in der MPER des p15E liegen, sollten die entsprechenden Bereiche dieser Proteine durch gp41 Sequenzen substituiert werden. Da auch gezeigt werden konnte, dass N-terminale Sequenzen des gp41 von HIV-1 einen Einfluss auf die Avidität der Bindung des monoklonalen Antikörpers 2F5 an sein Epitop haben (Fiebig et al., 2005), sollten auch diese Sequenzen in die rekombinanten Antigene eingebracht werden. Diese bakteriell exprimierten, rekombinanten Proteine (Hybridantigene) sollten in Immunisierungsstudien getestet werden. Der Einfluss des N-terminalen Bereiches der transmembranen Hüllproteine auf die Avidität von MPER-spezifischen neutralisierenden Antikörpern deutete auf die Notwendigkeit einer exakten Ausrichtung der beiden Domänen des Proteins zur Induktion von breitneutralisierenden Antikörpern gegen diese Epitope hin. Um dem Immunsystem ein putatives Konformationsepitop in möglichst nativer Form zu präsentieren, sollten die rekombinanten Antigene auf der Oberfläche von Zellen präsentiert werden. Zur Applikation wurde die GeneGun[®] verwendet. Die induzierten Antiseren sollten hinsichtlich ihrer Bindungsstärke und Bindungslokalisation,

sowie der Virusneutralisation charakterisiert werden. Aus dem Vergleich der durch die unterschiedlichen rekombinanten Antigene induzierten Immunantworten sollten neue Erkenntnisse zur Entwicklung eines potentiellen Impfstoffkandidaten gewonnen werden.

3.2.1 Rekombinante Proteinantigene

Als Basis der Klonierungen zur Herstellung der Hybridantigene wurde das transmembrane Hüllprotein p15E von KoRV verwendet. Hintergrund dieser Überlegungen war ein Sequenzvergleich der MPER des KoRV-p15E mit dem gp41 von HIV-1, welcher zeigte, dass in der MPER des transmembranen Hüllproteins des KoRV Rudimente des Epitops ELDKWAS des gp41 spezifischen Antikörpers 2F5 zu finden sind (Tabelle 3.2).

Retrovirus	Aminosäuresequenz der MPER	Übereinstimmung mit AS Positionen in der MPER von HIV-1 Ba-L
MuLV	LR E RLS Q RQKLFESQQGWFEGL F NKSPWF	17,3 %
FeLV	LR E RLK Q RQQLF D SQQGWFE G W F NKSPWF	20,7 %
PERV	LR E RL E RRRR E READQGWFE G W F NRSPWM	24,1 %
RaLV	LR E RLA Q RQKLFDSQQGWFE G W F NRSPWF	20,7 %
KoRV	L K E R LDKR Q LE H Q K NLSWYEG W F N RS P W L	34,5 %
HIV-1	Q Q E K N E Q E L L E LDKWAS - L W N W F N I T N W L	-

Tabelle 3.2: Aminosäuresequenzvergleich der MPER der transmembranen Hüllproteine (TM) ausgewählter γ -Retroviren mit der MPER des gp41 von HIV-1 Ba-L.

Eine Substitution der nicht passenden Aminosäuren zur Komplettierung der HIV-spezifischen Epitope, sollte daher weniger strukturelle Veränderungen nach sich ziehen, als eine Fusion mit ganzen Domänen des gp41. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass weder 2F5 noch 4E10 KoRV trotz dieser Rudimente neutralisieren kann (Abbildung 3.12).

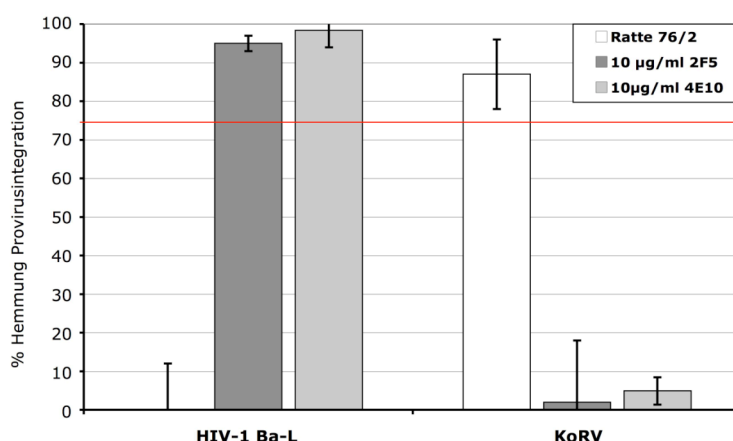


Abbildung 3.12: Test der monoklonalen HIV-1 breitneutralisierenden Antikörper 2F5 und 4E10 auf Kreuzneutralisation von KoRV. 2F5 und 4E10 wurden in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Als Kontrolle für KoRV wurde ein gegen das p15E von KoRV induzierte Rattenserum 76/2 (Fiebig et al., 2006) bei einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus Triplikaten mit der Standardabweichung.

Um die Sequenz des p15E von KoRV (pCal-n-KoRV-p15E, Fiebig et al., 2006) mit verschiedenen Kombinationen relevanter Sequenzen des gp41 von HIV-1 zu versehen, wurden Mutageneseprimer (Abschnitt 2.1.5, Nr. 26-50) verwendet. Die durch PCR generierten Amplifikate wurden über die Schnittstellen *Bam*HI und *Eco*RI in den bakteriellen Expressionsvektor pCal-n (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) kloniert. Durch Kolonie-PCR mit sequenzspezifischen Primern wurden positive Klone identifiziert. Die Verifizierung der erfolgreichen Klonierung erfolgte durch eine anschließende Sequenzierung. Alle Klone mit mutationsfreien Sequenzen wurden in den bakteriellen Expressionsstamm *E. coli* BL-21 retransformiert. Die Überprüfung der Expression erfolgte mittels SDS-PAGE. Der Nachweis der Präsenz der eingebrachten Epitope des gp41 von HIV-1 wurde durch Western Blots und Detektion der Hybridproteine durch den monoklonalen gp41 spezifischen Antikörper 2F5 erbracht.

3.2.1.1 Herstellung, Charakterisierung und Applikation der E2-substituierten Hybridantigene

In der ersten Studie sollten rekombinante Hybridantigene hergestellt werden, in die ausschließlich die MPER des KoRV-p15E durch die MPER des gp41 von HIV-1 substituiert wurden. Die durch Mutagenese PCR erzeugten Antigene UR001 (Primer 38+29, Abschnitt 2.1.5) und UR002 (Primer 38+30, Abschnitt 2.1.5) unterschieden sich in der Anordnung der Epitope. Während UR001 nur die durch die native KoRV-p15E implizierte Repetition des 2F5 Epitopes (ELDKWAS) enthält, wurde bei UR002 ebenfalls das Epitop des Antikörpers 4E10 (WFNIT) in das Antigen eingebracht (Abbildung 3.13).

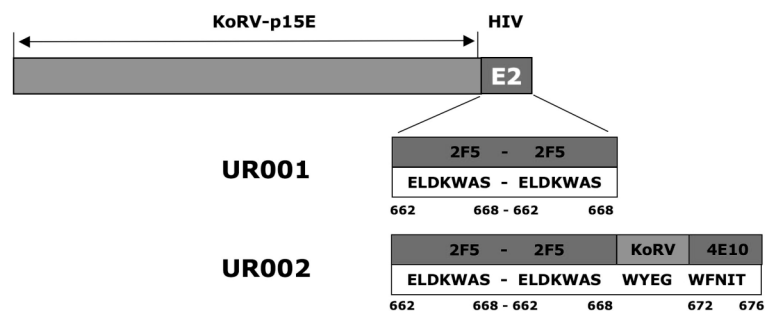


Abbildung 3.13: Schematische Darstellung der Antigene UR001 und UR002.

Sowohl das rekombinante Protein UR001, als auch UR002 wurden in *E. coli* überexprimiert, waren aber unlöslich unter physiologischen Bedingungen. Da eine Reinigung der Proteine unter denaturierenden Bedingungen über das Calmodulinbindeprotein (CBP) nicht möglich war, wurden die Bakterien nach der Expression pelletiert. Das Pellet wurde in PBS resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Durch Inkubation des Zellysates mit großen Volumina PBS wurden die wasserlöslichen Proteine quantitativ ausgewaschen. Die verbliebenen unlöslichen rekombinanten Proteine wurden in Adjuvans emulgiert (Abschnitt 2.2.7.2) und zur Immunisierung von weiblichen Wistar Ratten verwendet. Die Rattengruppen bestanden aus je 4 Tieren. Gruppe 84 wurde pro Applikation mit 250 µg UR001 und die Rattengruppe 89 mit 250 µg UR002 immunisiert. Es wurde nach dem RKI-

Standardimmunisierungsprotokoll verfahren (Abschnitt 2.2.7.2). Für alle Tests wurde das Boost- Serum verwendet.

Durch die Immunisierung mit den Hybridantigenen konnten in allen Versuchstieren gp41 spezifische Antikörper induziert werden (Abbildung 3.14).

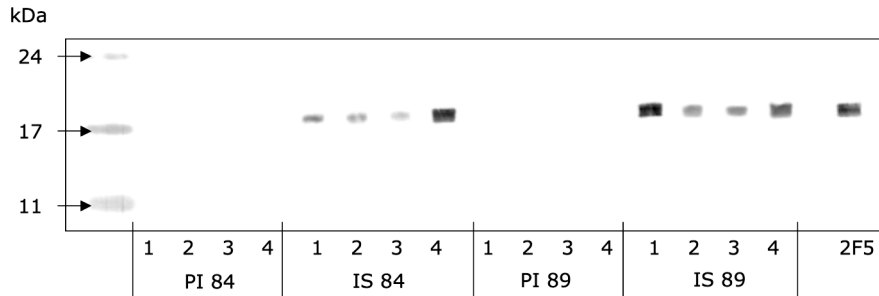


Abbildung 3.14: Test der Präimmunsere (PI) und Immunsere (IS) der Rattengruppen 84 (UR001) und 89 (UR002) im Western Blot auf Anwesenheit gp41 spezifischer Antikörper. Als Antigen wurde affinitätschromatographisch gereinigtes gp41 (Abschnitt 2.2.3.2) auf ein präparatives SDS-Gel geladen. Die Sere wurden bei einer Verdünnung von 1:750 in der Multiblotkammer aufgetragen. 0,3 µg/ml 2F5 dienten als Positivkontrolle. sAK der Sere: anti-Ratte-HRP (1:4000); sAK 2F5 anti-human HRP (1:8000).

Der Test der Sere im *in vitro* Neutralisationstest zeigte, dass kein Immunsere in der Lage war, bei einer Verdünnung von 1 : 10 die Provirusintegration von HIV-1 IIIB zu reduzieren (Abbildung 3.15). Somit konnten zwar gp41-bindende, aber keine HIV-1 neutralisierenden Antikörper induziert werden.

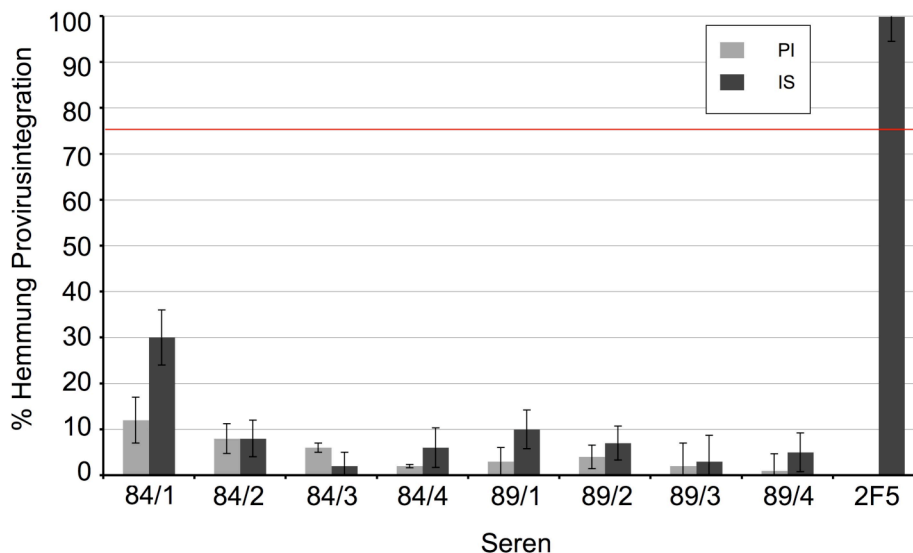


Abbildung 3.15: Neutralisationstest der Sere der Rattengruppen 84 und 89 mit HIV-1 IIIB. Die Rattengruppe 84 wurde mit UR001 und die Rattengruppe 89 mit UR002 immunisiert. Die Sere wurden in einer Verdünnung von 1:10, der Antikörper 2F5 in einer Endkonzentration von 5 µg/ml eingesetzt. Pi=Präimmunsere, IS=Immunsere. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus Triplikaten mit der Standardabweichung.

Um herauszufinden, ob die hier induzierten Antikörper auch die Polyspezifität für den E1 und den E2 Bereich aufwiesen, sollten die Bindungsstellen der induzierten Antiseren in gp41 bestimmt werden. Zur Epitopkartierung wurde eine Pepspotmembran verwendet,

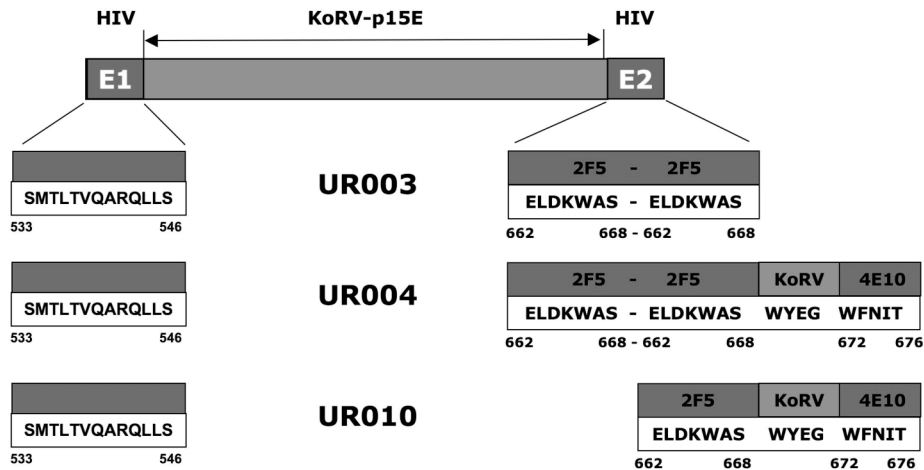


Abbildung 3.17: Schematische Darstellung der Antigene UR003, UR004 und UR010.

Wiederum wurden die Proteine in *E. coli* BL21 überexprimiert. Erwartungsgemäß blieben diese Konstrukte unlöslich unter physiologischen Bedingungen. Auch diese Proteine wurden zur Immunisierung von Ratten eingesetzt.

In ELISA Studien der induzierten Rattenserum konnte gezeigt werden, dass gp41-spezifische Antikörper induziert wurden. Der gp41-spezifische Antikörpertiter aller Rattenserum lag zwischen $7,2 \times 10^4$ und $1,2 \times 10^5$. Alle Rattenserum enthielten sowohl E1- als auch E2-spezifische Antikörper, wobei die E2 Reaktion vergleichbar zur E1 Reaktion oder stärker ausgeprägt war (Tabelle 3.3). Die Untersuchung der Rattenserum im Neutralisationstest zeigte, dass die gegen das Hybridantigen UR004 generierten Antiserum der Rattengruppe 104 bei einer Verdünnung von 1:10 in der Lage waren, signifikant die Provirusintegration zu verringern. Drei der durch Immunisierung mit UR010 induzierten Antiserum konnten ebenfalls bei einer Verdünnung von 1:10 Neutralisation von HIV-1 Ba-L bewirken. Die Seren, der Rattengruppe 103, welche aus der Immunisierung mit UR003 hervorgingen, waren nicht in der Lage die Provirusintegration von HIV-1 Ba-L zu inhibieren (Abbildung 3.18).

Tier	Antigen	Titer gp41	E1 Reaktivität	E2 Reaktivität
99/1	UR003	1 : $1,4 \times 10^5$	+	+
99/2		1 : $1,4 \times 10^5$	+	++
99/3		1 : $1,4 \times 10^5$	+	+
99/4		1 : $1,4 \times 10^5$	+	++
104/1	UR004	1 : $1,2 \times 10^5$	++	++
104/2		1 : $1,2 \times 10^5$	+	++
104/3		1 : $1,2 \times 10^5$	++	+
104/4		1 : $8,0 \times 10^4$	++	++
152/1	UR010	1 : $7,2 \times 10^4$	++	++
152/2		1 : $7,2 \times 10^4$	+	++
152/3		1 : $7,2 \times 10^4$	+	++
152/4		1 : $7,2 \times 10^4$	+	++

Tabelle 3.3: Ergebnis der ELISA-Bindungsstudie der durch Immunisierung mit den Hybridantigenen UR003, UR004 und UR010 induzierten Seren im ELISA. Die Seren wurden im Peptid ELISA bei einer Verdünnung von 1:300 getestet. + = $OD_{562} < 0,1$, ++ = $0,1 < OD_{562} < 0,4$

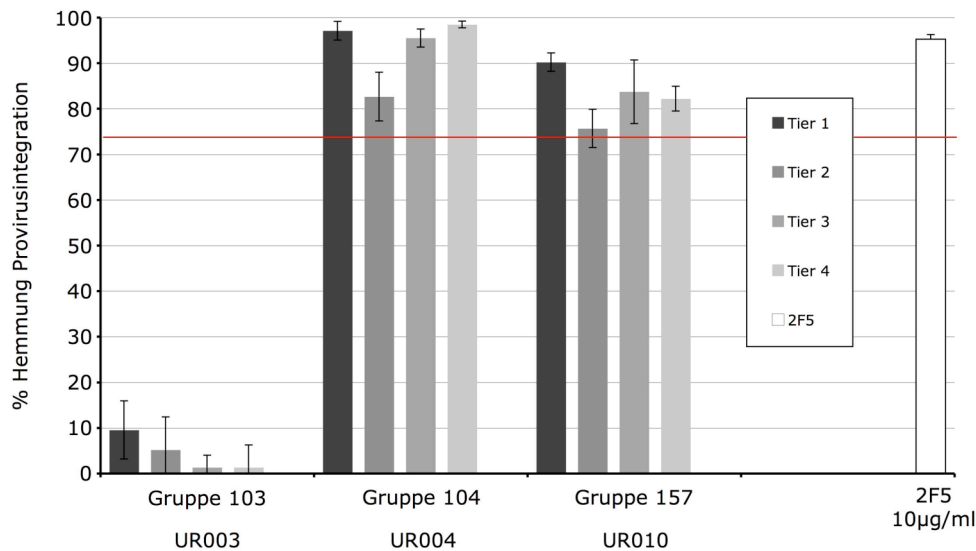


Abbildung 3.18: Neutralisationstest der Antisera generiert gegen die Antigene UR003, UR004 und UR010. Alle Seren wurden bei einer Verdünnung von 1:10 getestet auf neutralisierende Aktivität gegen HIV-1 Ba-L getestet. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus Triplikaten mit der Standardabweichung.

Eine Titration der Rattenserum im Neutralisationstest zeigte, dass die Seren der Ratten 104/1, 104/2 und 104/3 bis zu einer Verdünnung von 1:40 eine neutralisierende Wirkung auf HIV-1 Ba-L hatten. Das Serum der Ratte 104/4 konnte bis zu einer Verdünnung von 1:20 eine signifikante Reduktion der Provirusintegration bewirken. Die Seren der Gruppe 152, immunisiert mit UR010, hatten alle einen geringeren Neutralisationstiter. Nur die Seren 152/1 und 152/3 konnten bis zu einer Verdünnung von 1:20 die Provirusintegration signifikant hemmen (Abbildung 3.19).

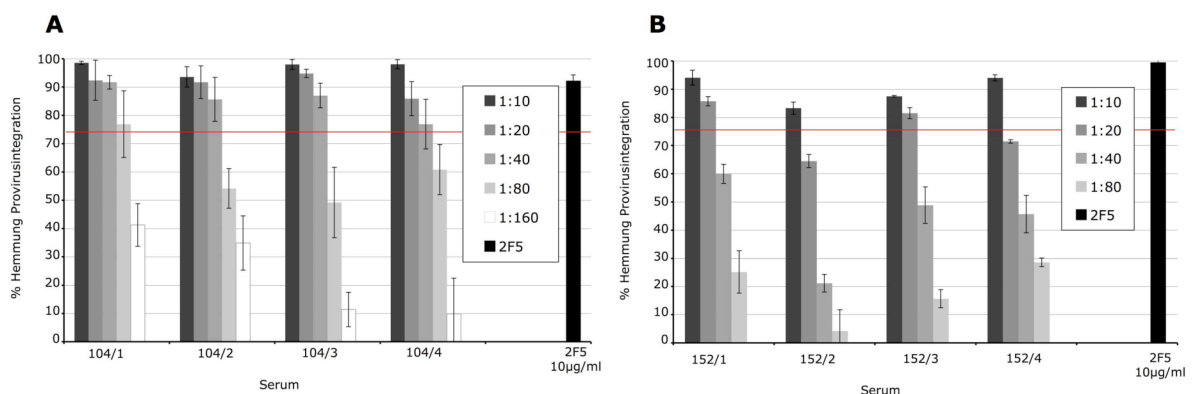


Abbildung 3.19: Titration der Antisera der Rattengruppen (A) 104 (UR004) und (B) 152 (UR010) im Neutralisationstest gegen HIV-1 Ba-L. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus Triplikaten mit der Standardabweichung.

Um die genauen Epitope der induzierten Antikörper zu identifizieren, wurden Epitopkartierungen aller Seren der Gruppe 104 durchgeführt. Es zeigten sich zwei Epitopcluster auf der gp41-Peppspot Membran. Ein Cluster lag im N-terminalen E1-Bereich (Kerneptiop ARQLLL) des gp41, C-terminal zum Fusionspeptid. Das zweite Cluster erstreckte sich über einen längeren Bereich der MPER (E2) von gp41. Daher war es nicht möglich, nur ein Epitop zu lokalisieren. Der detektierte Bereich erstreckt sich sowohl über das 2F5 Epitop (ELDKWAS) als auch über das 4E10 Epitop (WFNIT). Da es sich um polyklonale Seren handelt, kann man hier von der Anwesenheit verschiedener

Antikörperpopulationen ausgehen. Auffällig war die viel intensivere Bindung an den E2-Bereich, als die Bindung an den E1 Bereich (Abbildung 3.20).

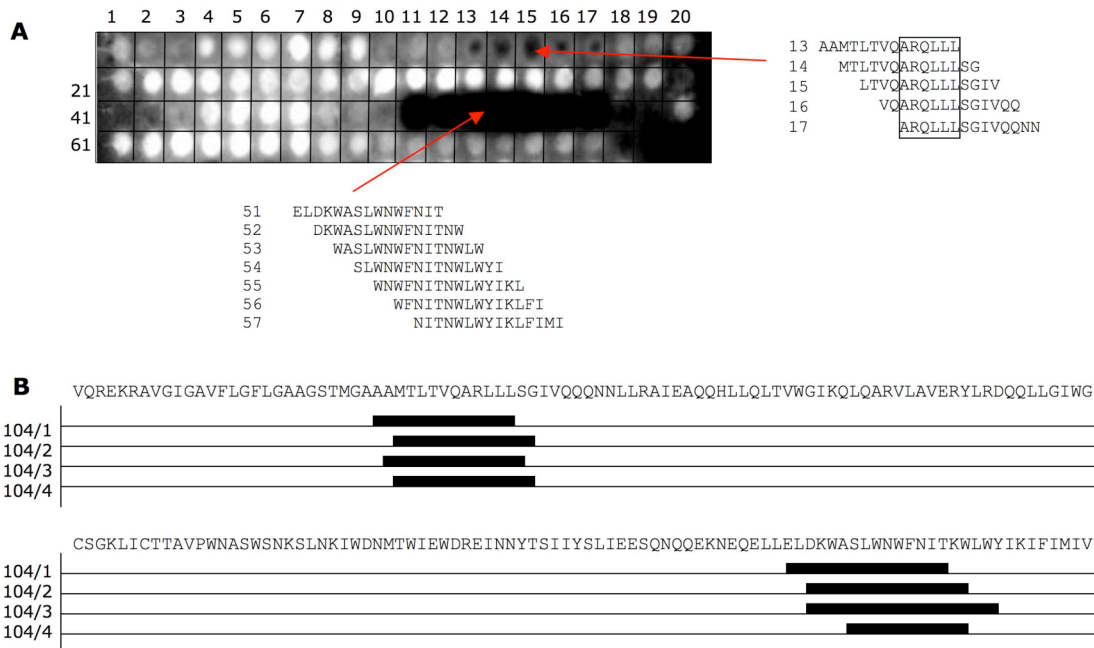


Abbildung 3.20: Epitopkartierungen der Seren der Rattengruppe 104 auf einer gp41 Pepsotmembran. Alle Seren wurden bei einer Verdünnung von 1:750 getestet. (A) Die Epitopmembran nach Inkubation mit dem Serum der Ratte 104/1. (B) Zusammenfassung aller Epitopkartierungen der Rattengruppe 104.

Um zu zeigen, dass die in dem Serum befindlichen an E2 spezifischen Antikörper die Neutralisation vermitteln, wurde ein Neutralisationshemmversuch mit freiem E2 Peptid durchgeführt. Als Kontrolle wurde ein anderes aus gp41 abgeleitetes Peptid mitgeführt. Es zeigte sich, dass sich die durch die Seren der Gruppe 104 bewirkte Neutralisation durch Zugabe von E2 Peptid aufheben lies. Erst bei einer Peptidkonzentration von 0,188 µg/ml E2-Peptid konnten alle Seren wieder eine signifikante Reduktion der Provirusintegration bewirken. Die Präinkubation mit dem HIV-ISU-Peptid hatte keinen Einfluss auf die neutralisierende Wirkung der Immunsereen (Abbildung 3.21).

Die Seren der Rattengruppe 104 wurden gepoolt und hinsichtlich des Neutralisationsspektrums gegen verschiedene Subtypen der Gruppe M von HIV-1 und jeweils einem Isolat der Gruppe N und O untersucht. Der Serumpool konnte bei einer Verdünnung von 1:10 eine signifikante Reduktion der Provirusintegration der HIV-1 Gruppe M Subtypen B (Isolat Ba-L), D (Isolat 92UG038), E (Isolat 93TH054) und A (Isolat 96USSN20) bewirken. Die Isolate der Gruppe M Subtypen C (SE364), G (HH8793) und F (93/020, BZ126) konnten nicht ausreichend neutralisiert werden. Auf die Infektion HIV-Isolate YBF-30 (Gruppe N) und MVP-5180 (Gruppe O) zeigte der UR004 spezifische Pool der Rattensereen ebenfalls keinen Effekt (Abbildung 3.22).

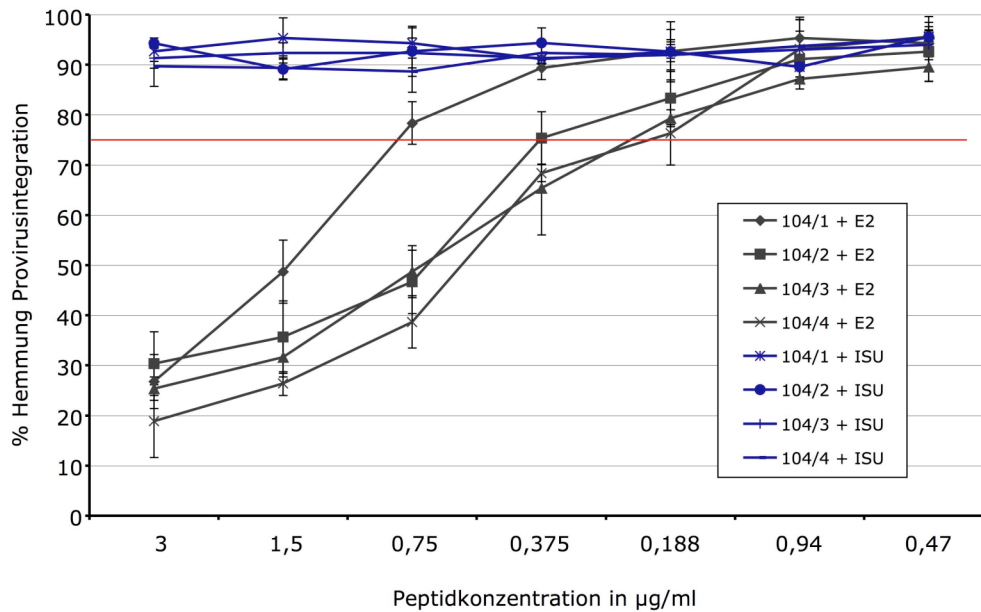


Abbildung 3.21: Neutralisationshemmversuch mit den Seren der Rattengruppe 104 und HIV-1 Ba-L. Die Seren wurden bei einer konstanten Verdünnung von 1:20 mit dem E2-Peptid (schwarze Linien) oder dem HIV-ISU-Peptid (blaue Linien) präinkubiert. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus Triplikaten mit der Standardabweichung.

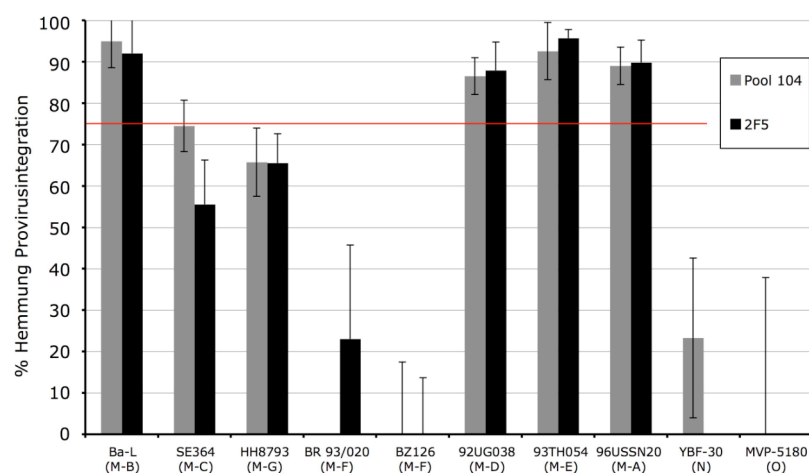


Abbildung 3.22: Neutralisationstests eines Serumpools von Rattengruppe 104 gegen verschiedene HIV-1 Isolate. Für die Gruppe M Viren wurden jeweils 10 µg/ml 2F5 als Referenz mitgeführt. Das Ziegen Serum wurde bei einer Verdünnung von 1:10 getestet. In Klammern unter den Bezeichnungen der Viren sind immer dessen HIV-1 Gruppe und dessen Env-Subtyp vermerkt. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus Triplikaten mit der Standardabweichung.

Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden erneut zwei Rattengruppen immunisiert. Die Gruppen 128 und 130 wurden beide pro Tier und Immunisierung mit je 250 µg UR004 gespritzt. Die gewonnenen Antiseren zeigten ebenfalls gp41 spezifische Antikörper, welche sowohl E1 als auch E2 spezifisch waren (Tabelle 3.4).

Die Seren beider Ratten Gruppen waren ebenfalls positiv im *in vitro* Neutralisationstest gegen HIV-1 Ba-L. Dabei konnten die Seren der Gruppe 128 bei einer Verdünnung von 1:80 eine signifikante Reduktion der Provirusintegration von HIV-1 Ba-L bewirken. Die Seren 130/1, 130/3 und 130/4 konnten dies bis zu einer Verdünnung von 1:40, während das Serum 130/2 nur bis einer Verdünnung von 1:20 einen signifikanten Effekt zeigte (Abbildung 3.23).

Gruppe	Antigen	Titer gp41	E1 Reaktivität	E2 Reaktivität
128	UR004	1 : 1,6x10 ⁵	+	++
130	UR004	1 : 6,4x10 ⁵	+	++

Tabelle 3.4: Charakterisierung der Bindung der Seren im ELISA an affinitätschromatographisch gereinigtes gp41 sowie dem E1-Peptid und dem E2-Peptid von HIV-1. + = OD₅₆₂ < 0,1, ++ = 0,1 < OD₅₆₂ < 0,4

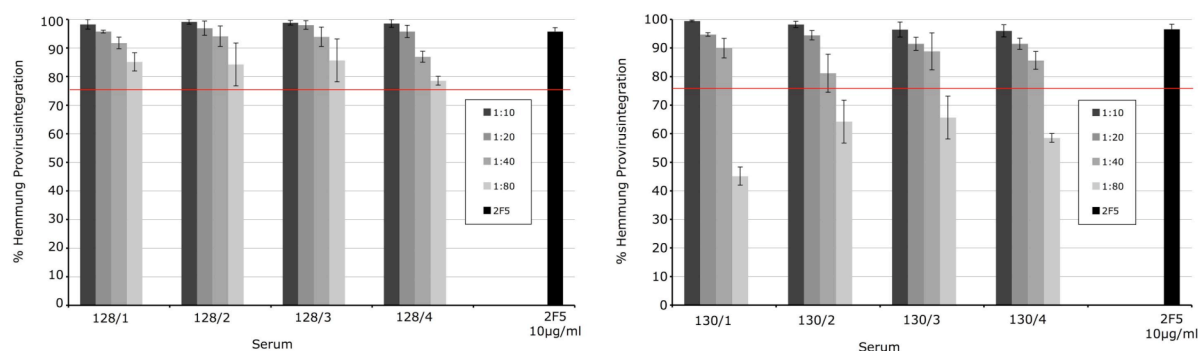


Abbildung 3.23: Titration der Antiseren der Rattengruppen 128 und 130 generiert gegen das Hybridantigen UR004 im Neutralisationstest gegen HIV-1 Ba-L. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus Triplikaten mit der Standardabweichung.

Die Seren der Gruppe 104 wurden in ein unabhängiges Labor gesendet und dort mit einem Luciferase-Assay auf Neutralisation geprüft. Alle Rattenserum konnten in diesem Assay bis zu einer Verdünnung von 1:40 50 % Neutralisation von HIV-1 IIIB bewirken (Abbildung 3.24).

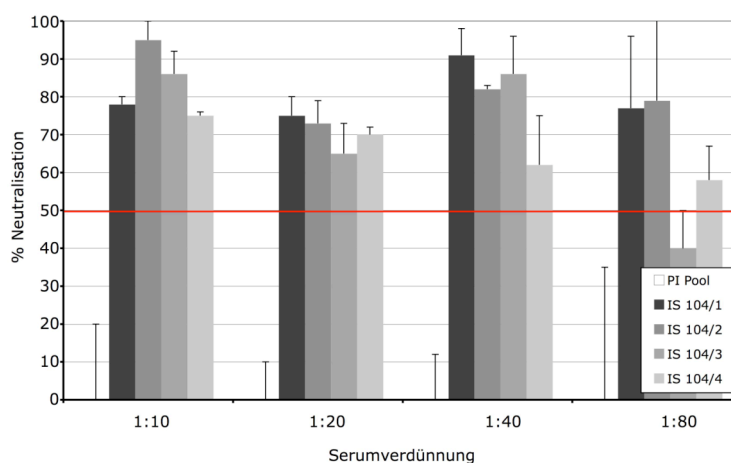


Abbildung 3.24: Ergebnis der Neutralisationstests in einem unabhängigen Labor der Rattenserum der Gruppe 104. Getestet wurde die Aktivität gegen HIV-1 IIIB. Für den verwendeten Test wurde eine Signifikanzgrenze von 50 % Neutralisation vom durchführenden Labor festgelegt (rote Gerade). Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus Triplikaten mit der Standardabweichung.

Die Immunisierung mit dem Hybridantigen UR003 konnte nur bindende, aber keine neutralisierenden Antikörper induzieren. Durch die Immunisierung mit den Hybridantigenen UR004 und UR010 konnten gp41 MPER spezifische HIV-1 neutralisierende Antikörper in Ratten induziert werden. Für die UR004 spezifischen

Rattenseren konnte eine subtypenübergreifende neutralisierende Wirkung nachgewiesen werden.

3.2.1.3 Generierung von Hybridantigenen mit MPER Sequenzen der HIV-1 Gruppen N und O

Um zu testen, ob der Mechanismus, der für HIV-1 Gruppe M spezifischen Antigene beobachtet wurde, auch auf die Gruppe N und O anwendbar ist, sollte das Hybridantigen UR004 an die N-terminalen E1 und die C-terminale E2 Sequenz der hier verwendeten Isolate YBF-30 und MVP-5180 angeglichen werden. Dazu wurden Mutagenese PCRs mit den Primern Nr. 47+48 und 49+50 (Abschnitt 2.1.5) durchgeführt (Abbildung 3.25).

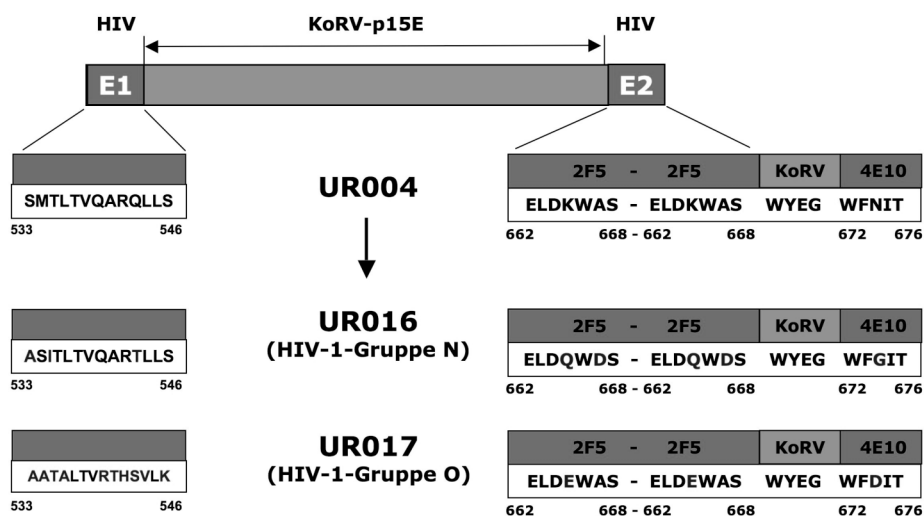


Abbildung 3.25: Schematische Darstellung der Herstellung der Antigene UR016 und UR017 auf der Basis von UR004.

Die generierten rekombinanten Proteine UR016 und UR017 wurden ebenfalls in *E. coli* exprimiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot dargestellt (Abbildung 3.26).

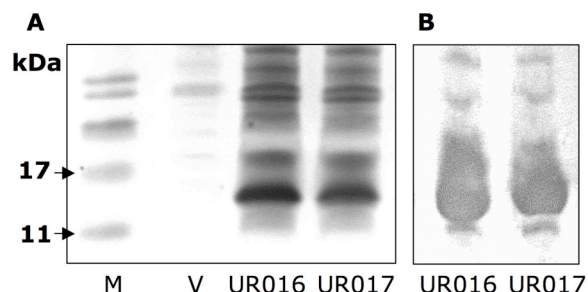


Abbildung 3.26: Charakterisierung der Hybridantigene UR016 und UR017 nach Expression in *E. coli* BL21 mittels (A) SDS-PAGE und (B) Western Blot. Die Detektion im Western Blot erfolgte mit dem KoRV-p15E-spezifischen Ziegenserum 31 (1:500) und Anti-Goat-HRP (1:2000, Sigma). M-Marker, V-Vorinduktionspool, UR016-Expressionspellet UR016, UR017-Expressionspellet UR017.

Nach der Charakterisierung wurden die Antigene zur Immunisierung verwendet. Rattengruppe 162 wurde mit 250 µg UR016 und Rattengruppe 163 mit je 250 µg UR017 immunisiert. Die Seren der Tiere wurden 14 Tage nach dem Boost entnommen und im Neutralisationstest eingesetzt. Keines der induzierten Seren konnte die Provirusintegration gegen das jeweilige Zielvirus signifikant reduzieren, obwohl antigenspezifische Antikörper induziert wurden (Abbildung 3.27).

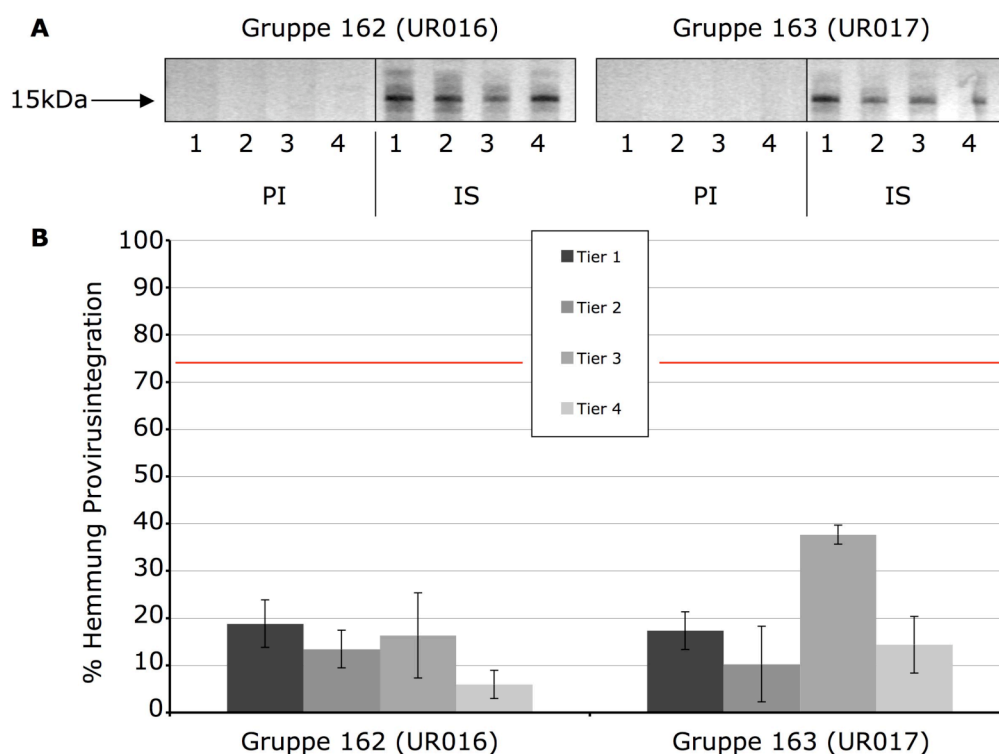


Abbildung 3.27: Charakterisierung der gegen die Hybridproteine UR016 und UR017 induzierten humoralen Immunantwort. (A) Western Blot der Präimmunsere (PI) und der Immunsere (IS) bei einer Verdünnung von 1 : 750 auf Lysat infizierter PBMCs. (B) Neutralisationstest der Immunsere der Gruppe 162 (UR016) gegen HIV-1 YBF-30 (Gruppe N) und der Gruppe 163 (UR017) gegen HIV-1 MVP-5180 (Gruppe O) bei einer Verdünnung 1:10. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus Triplikaten mit der Standardabweichung.

Durch die Immunisierung mit den auf UR004 basierenden HIV-1 Gruppe N und O spezifischen Hybridantigen UR016 und UR017 wurden nur bindende Antikörper induziert.

3.2.1.4 Sequentielle N-terminale Verlängerung von UR004

Vor dem Hintergrund zweier Veröffentlichungen, die eine Involvierung von N-terminalen Sequenzen bei der Bindung der HIV-1 breit neutralisierenden Antikörper 2F5 (Sanchez-Martínez et al., 2006) und 4E10 (Hager-Braun et al., 2006) an ihre Epitope postulierten, sollte das bereits mehrmals positiv getestete Hybridantigen UR004 um die entsprechenden Sequenzen erweitert werden. Dazu wurden überlappende Primer abgeleitet, welche das Hybridprotein in vier Stufen N-terminal verlängert (Primer 43-46, Abschnitt 2.1.5, Abbildung 3.28).

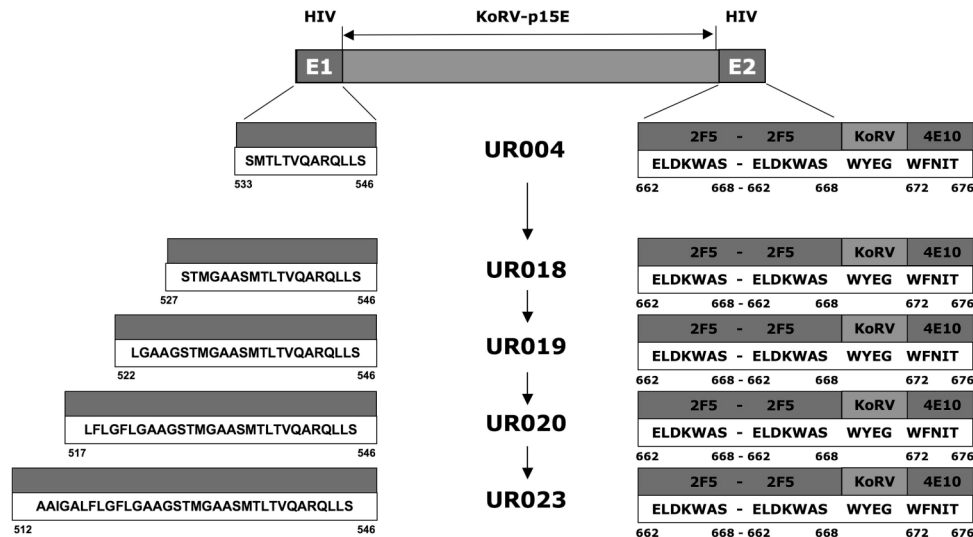


Abbildung 3.28: Schematische Darstellung der Herstellung der Antigene UR018, UR019, UR020 und UR023 auf der Basis von UR004.

Auch diese Antigene wurden in *E. coli* BL21 exprimiert. Wieder waren sie nicht löslich in physiologischen Lösungsmitteln (Abbildung 3.29).

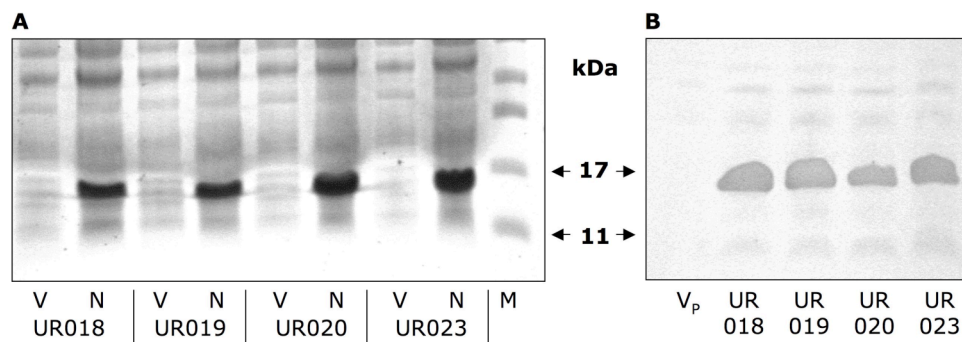


Abbildung 3.29: Charakterisierung der Hybridantigene UR018, UR019, UR020 und UR023 nach Expression in *E. coli* BL21 mittels (A) SDS-PAGE und (B) Western Blot. Die Detektion im Western Blot erfolgte mit 2F5 (0,3 µg/ml) und Anti-human IgG-HRP (1:8000, Dako). M - Marker, V - Pellet vor Induktion, V_p - Pool Pellets vor Induktion, N - Pellet nach Induktion.

Die exprimierten Proteine wurden zur Immunisierung eingesetzt. Hierzu wurde je eine Rattengruppe pro Antigen mit je 250 µg Protein pro Tier und Applikation immunisiert. Als Vergleich diente das zuvor positiv getestete UR004. Die induzierten Immunantworten wurden im ELISA überprüft. Alle Tiere bildeten eine gp41 spezifische Immunantwort aus. Auffällig war hier, dass für das Konstrukt UR004 eine schwächere gp41 spezifische Immunantwort induziert wurde. Außerdem war die Reaktion gegen das E1 Peptid im Gegensatz zu früheren Studien stärker als die E2-spezifische Immunantwort (Tabelle 3.5). Außerdem wurden die Immunsereen bei einer Endverdünnung von 1:10 auf neutralisierende Aktivität gegen HIV-1 Ba-L getestet. Hierbei zeigte sich, dass keines der in dieser Studie induzierten Immunsereen in der Lage war, eine signifikante Reduktion der Provirusintegration herbeizuführen. Überraschend war, dass in dieser Studie auch das zuvor mehrmals positiv getestete Hybridantigen UR004 keine HIV-1 neutralisierende Immunantwort induzieren konnte (Abbildung 3.30)

Rattengruppe	Antigen	E1	E2	gp41
179	UR018	++	+	++
180	UR019	++	+	++
181	UR020	++	+	++
183	UR023	++	+	++
185	UR004	++	+	++

Tabelle 3.5: Übersicht der durch Immunisierung mit den Hybridproteinen UR018, UR019, UR020 und UR23 induzierten Immunantwort in Ratten. Die Charakterisierung der induzierten Immunantworten erfolgte im ELISA. E1 und E2 = peptidspezifische Immunantwort, gp41 = Immunantwort gegen das affinitätschromatographisch gereinigte gp41 von HIV-1, + = $OD_{562} < 0,1$, ++ = $0,1 < OD_{562} < 0,4$

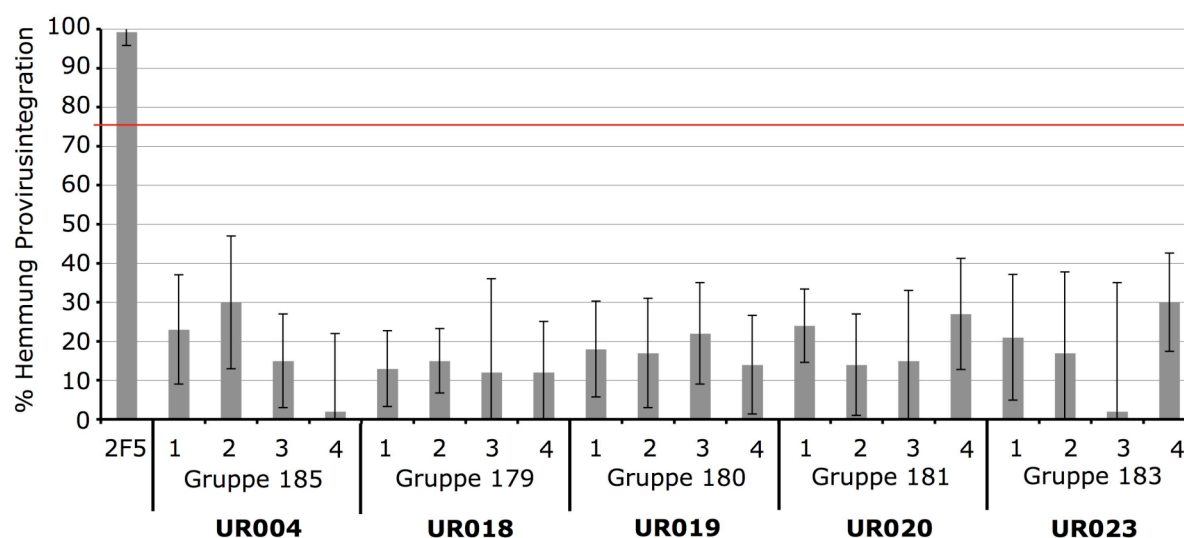


Abbildung 3.30: Neutralisationstest der Rattenserum nach Immunisierung mit den Hybridantigenen UR004, UR018-UR020 und UR23. Gestestet wurde die neutralisierende Aktivität der Seren gegen HIV-1 Ba-L bei einer Verdünnung von 1:10. Als Positivkontrolle wurden 10 µg/ml 2F5 eingesetzt. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus Triplikaten mit der Standardabweichung. Die rote Gerade zeigt den Schwellenwert bei 75 % Neutralisation an.

Durch die schrittweise N-terminale Verlängerung des Hybridantigens UR004 konnten nur gp41 spezifische bindende Antikörper induziert werden. Auch durch das mitgeführte UR004 wurden keine neutralisierenden Antikörper induziert. Im ELISA zeigte sich eine ausgeprägte E1-spezifische Immunantwort.

3.2.1.5 Vertauschen der Lokalisation der Epitope E1 und E2 im Hybridantigen UR004

Aus den ersten Immunisierungsstudien gingen Antiseren hervor, die einen höheren Titer an Antikörpern gegen den E2 Bereich oder vergleichbare Mengen Antikörper gegen beide Epitope aufwiesen. Die Immunantwort in den letzten Immunisierungsstudien richtete sich hauptsächlich gegen den E1-Bereich der Hybridproteine (Tabelle 3.5). Ein Versuch sollte klären, ob die unterschiedliche Immunogenität von E1 und E2 sequenzbedingt oder eine Folge der Lokalisation der Sequenz im Hybridprotein ist. Hierfür wurden die Positionen der Epitope E1 und E2 im Antigen UR004 mittels Mutagenese PCR (Primer 34-37, Abschnitt 2.1.5) ausgetauscht (Abbildung 3.31).

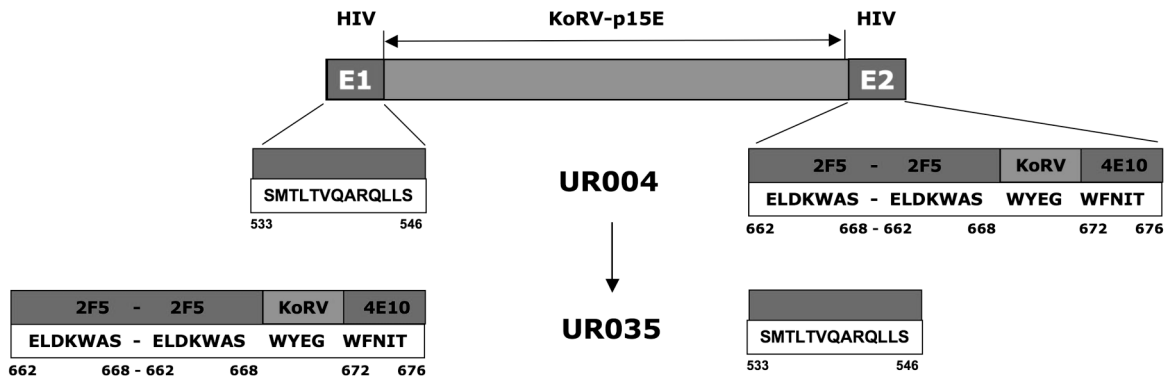


Abbildung 3.31: Schematische Darstellung der Herstellung des Antigens UR035 auf der Basis von UR004.

Mit dem in *E. coli* BL21 exprimierten Protein UR035 wurden vier Ratten mit je 250 µg pro Tier und Applikation nach dem Standardprotokoll immunisiert. Die induzierte Immunantwort war wiederum stärker gegen das E1-Peptid als gegen das E2 Peptid. Damit konnte gezeigt werden, dass die Antikörper sequenzspezifisch induziert wurden. Im *in vitro* Neutralisationstest gegen HIV-1 Ba-L zeigte sich zwar eine Reduktion der Provirusintegration, welche aber die Signifikanzgrenze nicht überschreitet (Abbildung 3.32).

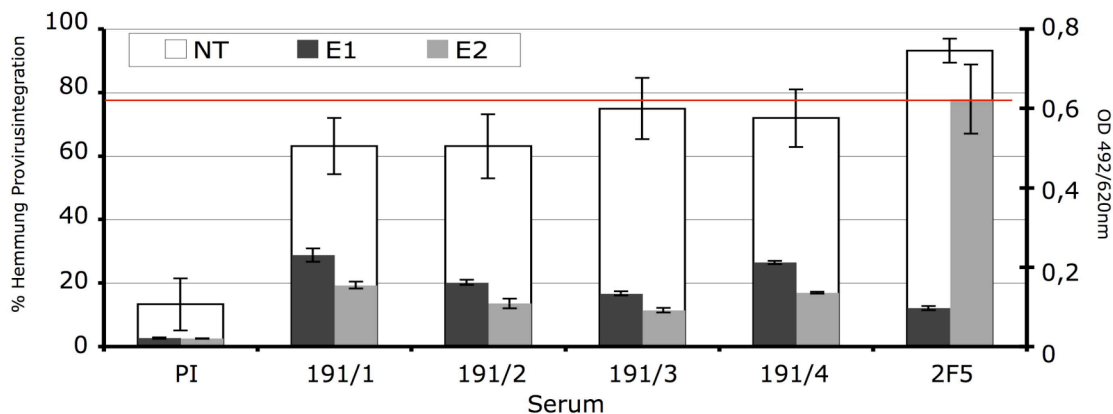


Abbildung 3.32: Charakterisierung der durch UR035 induzierten humoralen Immunantwort im Peptid-ELISA und Neutralisationstest. Im Peptid-ELISA wurden die Seren 1:500 verdünnt und im Neutralisationstest 1:10. Der monoklonale Antikörper 2F5 wurde mit einer Konzentration von 0,3 µg/ml im ELISA und 5µg/ml im Neutralisationstest eingesetzt. Es wurde die Neutralisation des Isolats HIV-1 Ba-L bestimmt. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus Triplikaten mit der Standardabweichung. Die rote Gerade zeigt den Schwellenwert bei 75 % Neutralisation an. E1=ELISA Ergebnis gegen das Peptid E1, E2=ELISA Ergebnis gegen das Peptid E2, NT=Hemmung der Provirusintegration im Neutralisationstest in %.

Durch das Vertauschen der E1 und E2 Epitope in UR004 konnte keine stärkere E2-spezifische Immunantwort induziert werden. Es wurde zwar eine Bindung der Antikörper an gp41 spezifische Peptide gemessen, diese waren aber nicht neutralisierend.

3.2.1.6 Erhöhung des Reinheitsgrades von UR004 durch Modifikation mit einem 6xHIS-Tag

Die Klonierung von rekombinanten transmembranen Hüllproteinen der Retroviren PERV und KoRV resultierte jeweils in Proteinen, welche löslich in physiologischen Lösungsmitteln (PBS) waren (Fiebig et al., 2003, 2006). Die Veränderung der N- und C-

terminalen Sequenzen des KoRV-p15E führte dazu, dass die Hybridproteine nicht mehr unter physiologischen Bedingungen in Lösung gingen. Da an alle Konstrukte über den Vektor pCal-n (Stratagene, Belgien) ein CBP-Tag fusioniert wurde, konnten diese nicht affinitätschromatographisch unter denaturierenden Bedingungen gereinigt werden. Aus diesem Grund wurde der CBP-Tag des Hybridproteins UR004 durch einen 6xHIS-Tag ersetzt. Dieser ermöglichte eine denaturierende Affinitätschromatographie in Anwesenheit von hohen Harnstoffkonzentrationen (Abschnitt 2.2.3.2). Das entstandene Antigen wurde mit der Nummer UR038 bezeichnet.

Dazu wurden zueinander komplementäre Oligonukleotide (Nr. 51+52, Abschnitt 2.1.5) entworfen, welche das Translationsstartcodon, die Sequenz des 6x His-Tags und an den Enden die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *NdeI* (5'-Ende) sowie *BamHI* (3'-Ende) beinhalten. Es wurden äquimolare Mengen der beiden Oligonukleotide gemischt und hybridisiert. Danach erfolgte eine Ligation in das zuvor mit *NdeI* und *BamHI* geschnittene Plasmid pCal-n-UR004. Positive Klone wurden mittels Kolonie-PCR identifiziert und in *E. coli* BL21 retransformiert. Anschließend erfolgte die Expression des neuen Antigens UR038 und dessen Darstellung. Die Anwesenheit des 6xHis-Tags wurde mittels eines spezifischen Antikörpers im Western Blot nachgewiesen (Abbildung 3.33-C). Der Nachweis des 2F5 Epitopes erfolgte auch im Western Blot (Abbildung 3.33-B). Das Antigen blieb weiterhin unlöslich in physiologischen Lösungsmitteln. Aus diesem Grunde wurde eine Affinitätschromatographie über eine Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden Deutschland) bei Anwesenheit von 8 M Harnstoff durchgeführt. Das Protein konnte unter diesen Bedingungen erfolgreich gereinigt werden (Abbildung 3.33-D+E).

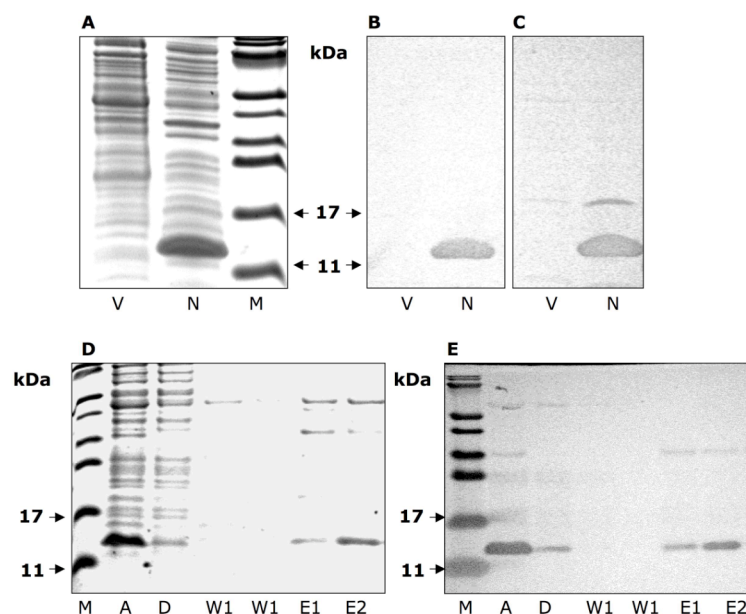
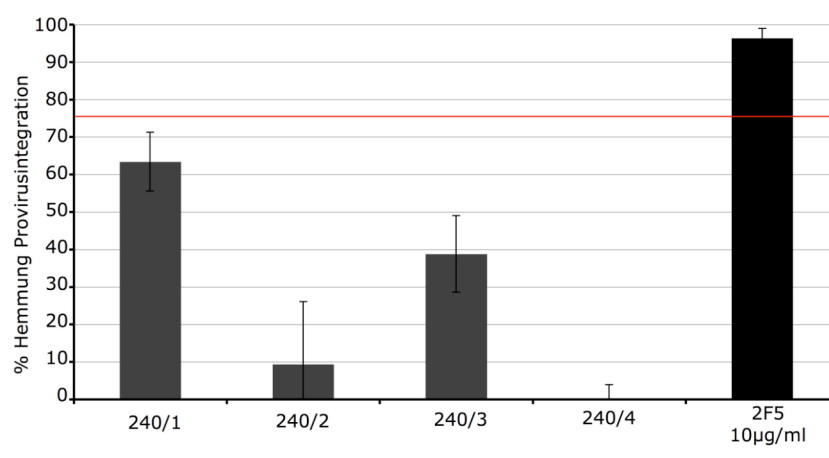


Abbildung 3.33: Charakterisierung von UR038 nach Expression in *E. coli* BL21 mittels (A) SDS-PAGE. (B) Nachweis des 2F5 Epitopes im Western Blot (pAK: 2F5 0,3 µg/ml; sAK: anti-human-POD 1:5000). (C) Nachweis des 6xHis-Tag am Protein mittels Western Blot (pAK: Penta-His-AK 0,1 µg/ml; sAK: anti-mouse-HRP 1:4000). V-Vorinduktionspellet, N-Nachinduktionspellet, Darstellung der Ni-NTA Affinitätschromatographie von UR038 durch (D) SDS-PAGE und (E) im Western Blot mit 2F5 (wie B). M-Marker, A-Ausgangsmaterial, D-Durchlauf, W1/2-Wasch Fraktionen, E1/E2 Elutionspools.

Es wurde eine Immunisierungsstudie mit dem gereinigten Antigen durchgeführt. Im Neutralisationstest zeigte sich, dass die durch UR038 induzierten Immunsereen nicht in der Lage waren, die Provirusintegration von HIV-1 Ba-L zu verringern (Abbildung 3.34).



3

Abbildung 3.34: Neutralisationstest der durch Immunisierung mit UR038 generierten Antiseren. Die Seren wurden bei einer Verdünnung von 1:10 gegen HIV-1 Ba-L getestet. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus Triplikaten mit der Standardabweichung. Die rote Gerade zeigt den Schwellenwert bei 75 % Neutralisation an.

Das Hybridantigen UR038 (=UR004-His) konnte mittels NI-NTA-Affinitätschromatographie von kontaminierenden *E.coli* Proteinen getrennt werden. Eine Immunisierungsstudie mit diesem Hybridantigen konnte aber wiederum nur gp41 bindende Antikörper induzieren.

3.2.2 Test der Hybridantigene als DNA-Vakzine

Der Einsatzes von rekombinanten Proteinen zur Immunisierung bietet den Vorteil der genau applizierbaren Menge und der Verfügbarkeit der Antigene in großen Mengen. Zu den größten Nachteilen der proteinbasierten Impfstoffe zählt das Einhalten der Kühlkette während des Transports der Impfdosen zum Einsatzort. Gerade in afrikanischen Ländern stellt die Temperatursensitivität eine Restriktion der Einsatzgebiete dar. Ein weiterer Nachteil ist, dass rekombinante Proteine häufig in heterologen Expressionssystemen hergestellt werden müssen. Das kann dazu führen, dass sie Konformationen einnehmen, welche die Induktion bestimmter Gruppen von Antikörpern nicht zulassen. Daher ist es schwierig, Antikörper gegen Konformationsepitope durch rekombinante Proteine zu induzieren. Auch das Aufnehmen der Proteine in Adjuvans könnte komplexe Tertiärstrukturen auflösen. Eine Möglichkeit die dargestellten Probleme zu umgehen stellt die Immunisierung mit nackter DNA dar. Diese, zur Proteinimmunisierung alternative Strategie wurde für ausgewählte Antigene dieser Arbeit durchgeführt. Die Sequenzen der Hybridantigene wurden in den eukaryontischen Oberflächenexpressionsvektor pDisplay (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) kloniert. Das pDisplay Vektorsystem von Invitrogen verfügt über eine Membranlokalisationssequenz (Anhang A-III) und es ist in der Lage, dem rekombinanten Protein eine Transmembrandomäne zu liefern. Um aber eine möglichst native Ausrichtung der gp41-MPER Sequenz in den Hybridantigenen zur

Zellmembran zu erreichen, wurden alle Konstrukte mit der Transmembrandomäne des gp41 von HIV-1 versehen. Hierzu wurden Primer konzipiert, die in zwei Schritten die Sequenz der Hybridantigene C-terminal verlängerten (Primer 26+27 und 41-42, Abschnitt 2.1.5, Sequenz der Konstrukte Anhang A-IV). Die DNA wurde mittels ballistischer Immunisierung durch die GeneGun[®] appliziert. Als Versuchstiere wurden in Analogie zu den Proteinimmunisierungen weibliche Wistar Ratten verwendet. Die induzierte humorale Immunantwort wurde hinsichtlich Bindungsstärke, Bindungsspezifität und Lokalisation, sowie Virusneutralisation untersucht.

3.2.2.1 Induktion HIV-1 neutralisierender Antikörper durch DNA Immunisierung mit einem PERV-p15E basierten Hybridprotein

Hybrid-II (HybII), ein Hybridprotein basierend auf dem p15E von PERV ähnlich den zuvor beschriebenen KoRV-HIV-Hybridproteinen, wurde von M. Schmolke (2004) hergestellt. Da mit diesem Protein in 50 % aller Immunisierungen neutralisierende Antikörper gegen HIV-1 im Rattenmodell induziert werden konnten (Schmolke, 2004), wurde dieses Protein in die DNA-Impfstudie mit einbezogen. Hierzu wurde die Sequenz des HybII durch PCR mit dem Transmembrandurchgang von gp41 versehen und in den Vektor pDisplay kloniert. Das neu entstandene Plasmid mit der Sequenz des HybII wird als UR007 bezeichnet. Als Kontrollen wurden in der Studie ein gp41 Vollängenkonstrukt (UR006), die NHR von gp41 (UR008) und die CHR von gp41 (UR009) ebenfalls in den Vektor pDisplay kloniert. Diese Kontrollkonstrukte wurden bereits von M. Schmolke (2004) kloniert und hier nur in die chronologische Nomenklatur eingebunden.

Um die Oberflächenexpression der Konstrukte zu überprüfen, wurden Rat1 Zellen stabil transfiziert. Die Selektion der Zellen erfolgte durch Zugabe von 600 µg/ml Geneticin (Gibco, Carlsbad, USA) in das Nährmedium. Durch eine PCR wurde die Anwesenheit des richtigen Plasmides für jede der transfizierten Zelllinien nachgewiesen. Die in pDisplay inserierten Konstrukte konnten dabei anhand der Größe des Amplifikates differenziert werden (Abbildung 3.35-A). Die Überprüfung der Oberflächenexpression der rekombinanten Proteine erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Der zur Detektion verwendete Antikörper 2F5 konnte an die mit UR006 (natives gp41), UR007 (beinhaltet das Epitop ELDKWAS) und UR009 (CHR von gp41 beinhaltet ELDKWAS) transfizierten Zellen binden. Rat1 Zellen transfiziert mit Leervektor bzw. UR008 (NHR von gp41) wurden nicht von 2F5 gebunden (Abbildung 3.35-B). Somit war der Beweis der Oberflächenexpression der Antigene und der Zugänglichkeit des Epitopes *in vitro* erbracht.

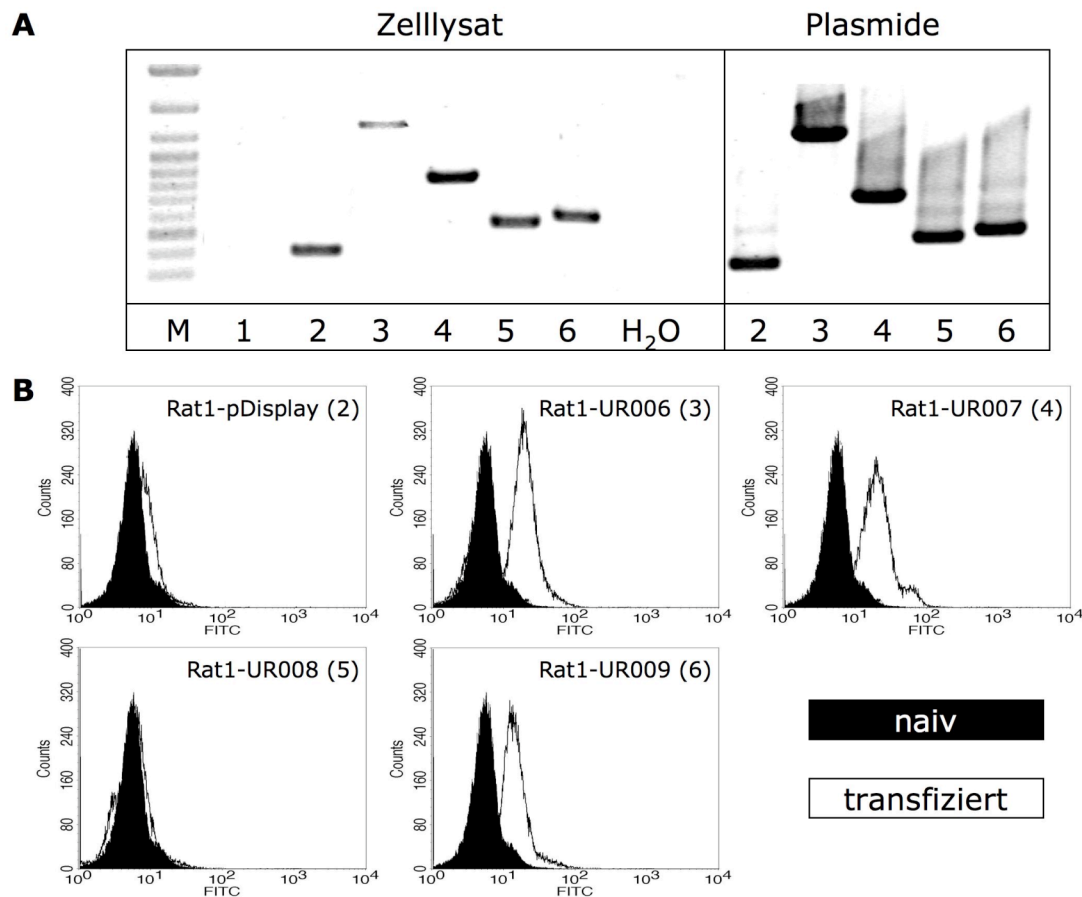


Abbildung 3.35: Darstellung der Expression der Antigene für die DNA Immunisierung. (A) Nachweis der transfizierten Plasmide mittels PCR auf Zellysat verschieden transfizierter Rat1 Zellen und der Kontrollplasmide (Primer 31+38, Abschnitt 2.1.5). (B) Darstellung der Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie. Es wurden stabil transfizierte (600 µg/ml Geneticin), nicht permeabilisierte Rat1 Zellen mit 10 µg/ml 2F5 (pAK) und anti-human-FITC (sAK) (1:1000, Sigma) angefärbt. Aufgetragen sind die Zellzahlen gegen die FITC-Fluoreszenzintensität der stabil transfizierten Zelllinien (weiß) und der naiven Rat1-Zellen als Vergleichspopulation (schwarz).

Die Konstrukte wurden für die ballistische Immunisierung von Ratten auf Goldpartikel präzipitiert, welche wiederum an einen Tefelz-Schlauch adheriert wurden. Jeder Ratte wurden pro Immunisierung 3 Schuss (1 µg/Schuss, Abschnitt 2.2.7.3) appliziert. Am Tag 21 erfolgte Boost 1 und am Tag 42 Boost 2. Das Boost 2 Blut wurde am Tag 56 nach Immunisierung, 14 Tage nach dem letzten Boost abgenommen. Es wurde pro Konstrukt eine Rattengruppe bestehend aus vier Individuen immunisiert. Die Boost 2 Seren wurden hinsichtlich ihrer Bindungsstärke im ELISA gegen His-Tag gereinigtes gp41 (Abschnitt 2.2.3.2) charakterisiert. Alle Seren der Ratten, die mit einem aus gp41 abgeleiteten Konstrukt immunisiert wurden, hatten gp41 spezifische Antikörper. Den höchsten Titer wiesen die Tiere der Gruppe 125 auf, welche mit dem nativen gp41-Konstrukt (UR006) immunisiert wurden. Die mit dem angepassten Hybrid II (UR007) immunisierten Ratten erreichten einen Titer an gp41 bindenden Antikörpern von 1:32.000 (Abbildung 3.36).

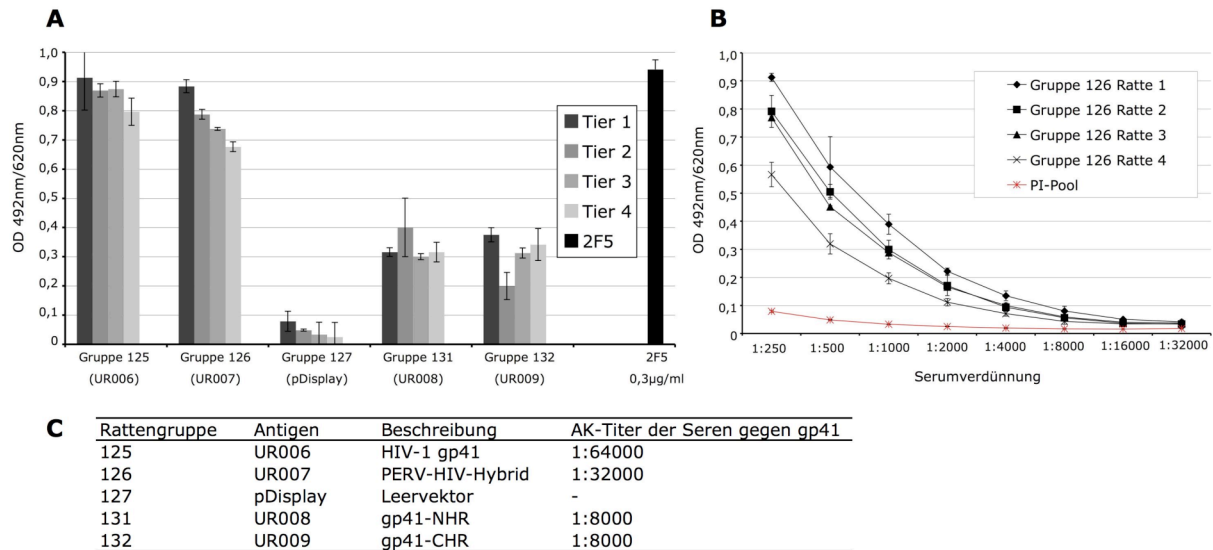


Abbildung 3.36: gp41-ELISA-Bindungstudie der durch DNA-Immunsierung induzierten Boost2-Immunsere. Als Antigen wurde in allen Studien affinitätschromatographisch gereinigtes rekombinantes gp41 verwendet (Abschnitt 2.2.3.2). (A) Alle Seren wurden primär bei einer Verdünnung von 1:300 getestet. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus Triplikaten mit der Standardabweichung. (B) Titration der Seren der Gruppe 126 im ELISA. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus Triplikaten mit der Standardabweichung. (C) Zusammenfassung der Titer aller Gruppen dieser Immunsierungsstudie; sAK für Seren: anti-rat-HRP (1:4000, Sigma) sAK für 2F5: anti-human-HRP (1:8000, DAKO, Hamburg, Deutschland).

Im *in vitro* Neutralisationstest konnten nur die Seren der Gruppe 126, welche mit dem PERV-Hybrid immunisiert wurden, eine Hemmung der Provirusintegration von HIV-1 Ba-L bewirken (Abbildung 3.37 A). Die durch Immunsierung mit gp41 (UR006), dessen NHR (UR008) oder dessen CHR (UR009) induzierten Immunsere zeigten keinen Effekt auf die Provirusintegration, obwohl zuvor gp41-spezifische Antikörper nachgewiesen werden konnten. Außerdem waren die Seren der Gruppe 126 in der Lage die Provirusintegration von HIV-1 IIIB bis zu einer Verdünnung von 1:10 zu hemmen (Abbildung 3.37 B).

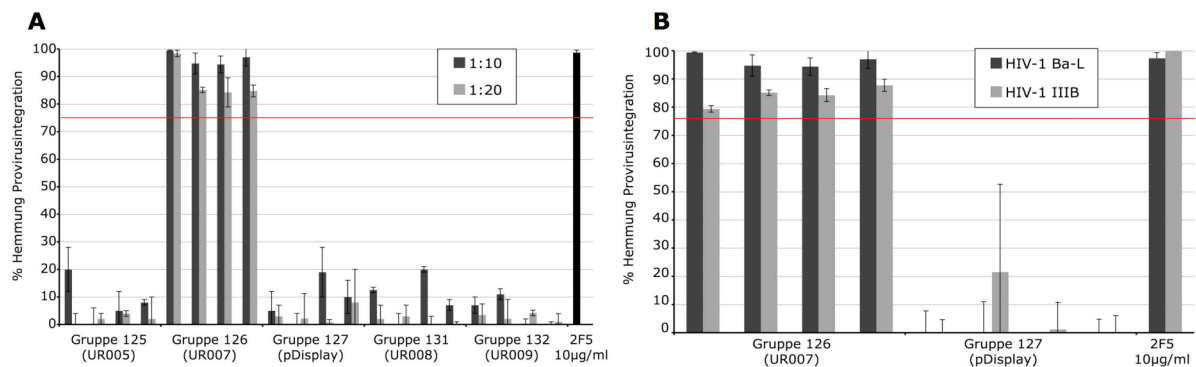


Abbildung 3.37: Neutralisationstest der durch DNA-Immunsierung induzierten Rattensere. (A) Alle Seren wurden bei einer Verdünnung von 1:10 und 1:20 auf neutralisierende Aktivität gegen HIV-1 Ba-L getestet. (B) Test der Seren der Gruppe 126 (UR007) und 127 (pDisplay Leervektor) auf Neutralisation von HIV-1 Ba-L und HIV-1 IIIB bei einer Verdünnung von 1:10. Alle Werte entsprechen dem Mittelwert aus Triplikaten mit der Standardabweichung. Die rote Gerade zeigt den Schwellenwert bei 75% Neutralisation an.

Durch DNA-Immunsierung mit dem PERV-basierten Hybridprotein UR007 konnten HIV-1-neutralisierende Antikörper induziert werden.

3.2.2.2 DNA-Immunisierungsstudie mit KoRVp15E basierten Hybridantigenen

Auch die KoRV-p15E basierten Hybridantigene UR002 (Abschnitt 3.2.1.1), UR004 und UR010 (beide Abschnitt 3.2.1.2), UR018, UR019, UR020 und UR023 (alle vier Abschnitt 3.2.1.4) wurden mittels PCR mit der Transmembrandomäne von gp41 versehen und für die DNA Immunisierung verwendet (Primer 41+42, Abschnitt 2.1.5). Zur Kontrolle der Expression wurden wieder Rat1 Zellen stabil mit den neuen Konstrukten transfiziert. Eine Auflistung der Bezeichnung ist in Tabelle 3.6 zu finden. Die Aminosäuresequenzen stehen im Anhang A-IV. Die Expression der Antigene auf der Zelloberfläche wurde wiederum mittels Durchflusszytometrie. Alle Konstrukte wurden von den Rat1 Zellen in Gegenwart von Geneticin (600 µg/ml) exprimiert (Abbildung 3.38).

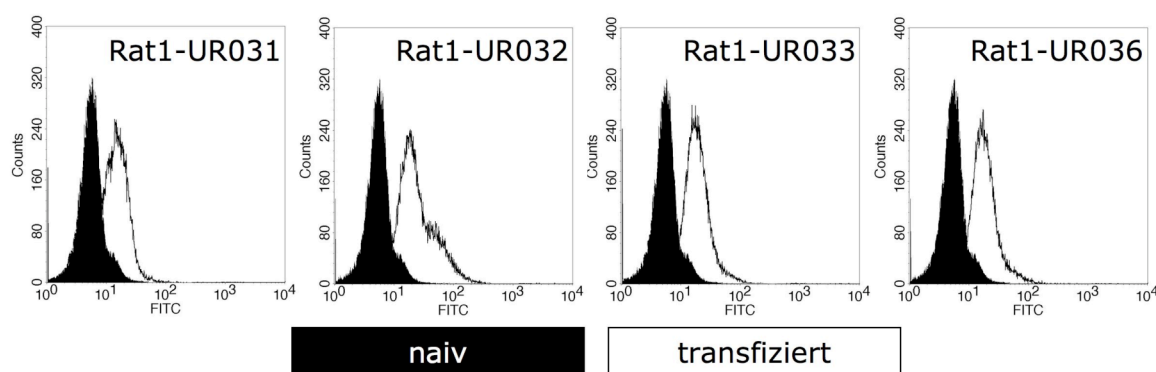


Abbildung 3.38: Darstellung der Oberflächenexpression der für die DNA-Immunisierung hergestellten Konstrukte UR031, UR032, UR033 und UR036 mittels Durchflusszytometrie. Es wurden stabil transfizierte (600 µg/ml Geneticin), nicht permeabilisierte Rat1 Zellen mit 10 µg/ml 2F5 (pAK) und anti-human-FITC (1:1000, Sigma) angefärbt. Aufgetragen sind die Zellzahlen gegen die FITC-Fluoreszenzintensität der stabil transfizierten Zelllinien (weiß) und der naiven Rat1 Zellen als Vergleichspopulation (schwarz).

Zur Verifizierung der Ergebnisse mit UR007 wurde erneut mit diesem Plasmid, sowie den Kontrollen pDisplay (Leervektor) und UR006 immunisiert. Durch die Immunisierung mit der GeneGun® konnten gp41-spezifische Antikörper induziert werden, wobei sich auch hier die Immunantwort auf den E1-Bereich konzentrierte. Die mit dem Leervektor beschossene Gruppe zeigte erwartungsgemäß keine gp41 spezifischen Antikörper (Tabelle 3.6).

Konstrukte (Ausgangskonstrukt)	pDisplay Beschreibung	Gruppe/Tier	gp41	E1	E2
pDisplay	Leervektor	199/1	-	-	-
		199/2	-	-	-
		199/3	-	-	-
		199/4	-	-	-
UR006	gp41	200/1	++	++	++
		200/2	+	+	+
		200/3	++	+	++
		200/4	++	++	++
UR007	HybridII-MSD	201/1	++	++	+
		201/2	+	+	+
		201/3	+	+	+
		201/4	++	+	+
UR013 (UR002)	KoRV-p15E/HIV- E1	202/1	++	++	+
		202/2	+	+	+
		202/3	+	+	+
		202/4	++	++	+
UR014 (UR004)	KoRV-p15E/HIV- E1/HIV-E2 (2x EDLKWAS)	203/1	++	++	+
		203/2	++	++	+
		203/3	+	++	+
		203/4	++	++	+
UR015 (UR010)	KoRV-p15E/HIV- E1/HIV-E2	204/1	++	++	+
		204/2	+	++	+
		204/3	+	+	+
		204/4	+	+	+
UR031 (UR018)	UR004-N+6	8/1	++	++	+
		8/2	+++	+++	+
		8/3	+	++	+
		8/4	++	++	+
UR032 (UR019)	UR004-N+12	9/1	++	++	+
		9/2	++	++	+
		9/3	++	++	+
		9/4	++	++	+
UR033 (UR020)	UR004-N+16	10/1	++	++	+
		10/2	++	++	+
		10/3	++	+	+
		10/4	++	++	+
UR036 (UR023)	UR004-N+18	11/1	+	+	+
		11/2	++	+++	+
		11/3	+	++	+
		11/4	++	+++	+

Tabelle 3.6: Ergebnisse der DNA-Immunsierung mit den KoRV-p15E basierten Hybridantigenen. Die Seren wurden im ELISA bei einer Verdünnung von 1:500 auf Bindung an affinitätschromatographisch gereinigtes gp41 getestet. Im Peptid-ELISA wurden alle Seren 1:300 verdünnt. E1=Reaktivität gegen das E1-Peptid von gp41; E2=Reaktivität gegen das E2-Peptid von gp41; - : keine Reaktion, + = $OD_{562} < 0,1$, ++ = $0,1 < OD_{562} < 0,4$, +++ = $OD_{562} > 0,4$

Im *in vitro* Neutralisationstest zeigte sich, dass keines der induzierten Seren in der Lage war, die Provirusintegration von HIV-1 signifikant zu reduzieren. Es wurden zwar gp41 bindende, aber keine neutralisierenden Antikörper induziert. Auch die Immunsierung mit dem zuvor positiv getesteten UR007 führte in diesem Fall nicht zur Induktion neutralisierender Antikörper (Abbildung 3.39).

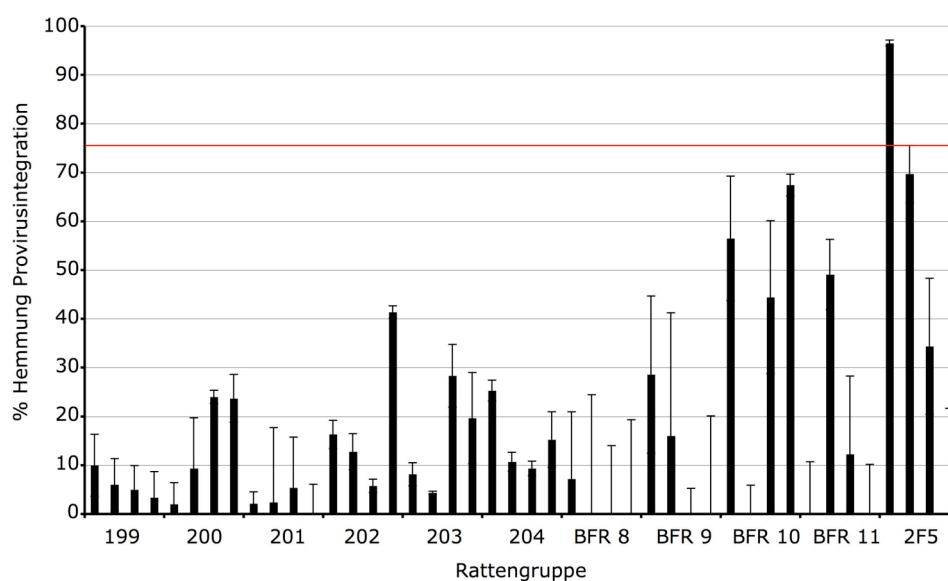


Abbildung 3.39: Neutralisationstest der DNA-Immunisierungsstudie. Alle Seren wurden bei einer Verdünnung von 1:10 auf neutralisierende Aktivität gegen HIV-1 Ba-L getestet. Innerhalb einer Gruppe sind von links nach rechts die Ergebnisse der Tiere 1-4 dargestellt. Die applizierten Hybridantigene können Tabelle 3.7 entnommen werden. 2F5 wurde von links nach rechts in den Konzentrationen 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,25 µg/ml und 0,6125 µg/ml eingesetzt. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus Triplikaten mit der Standardabweichung. Die rote Gerade zeigt den Schwellenwert bei 75 % Neutralisation an.

In der durchgeführten DNA-Immunisierungsstudie konnten ausschließlich gp41 bindenden Antikörper induziert werden.

3.2.3 Reproduktion der Immunisierungsstudien

Die im Abschnitt 3.2.1.2 und 3.2.2.1 dargestellten Ergebnisse wurden in Folge der unerwarteten Ergebnisse der Immunisierungsstudien in den Abschnitten 3.2.1.4 und 3.2.2.2 ein weiteres Mal überprüft. Hierzu wurden Immunisierungsstudien am RKI und Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) in Berlin Marienfelde durchgeführt. Für diese Studien wurden nur zuvor positiv getestete Antigene und deren entsprechende Kontrollen verwendet.

Die durch Immunisierung mit den in *E. coli* exprimierten Hybridproteinen UR002, UR004, und UR010 generierten Antiseren zeigten wiederum eine stärkere Reaktion gegen das E1 als gegen das E2 Peptid. Die Immunantwort gegen rekombinantes gp41 fiel schwächer aus als bei vorangegangenen Studien. Erwartungsgemäß konnte keins der durch UR002 induzierten Antiseren die Integrationsrate von HIV-1 Ba-L bei einer Verdünnung von 1:10 signifikant reduzieren. Auch die gegen UR004 und UR010 erzeugten Antiseren waren nicht in der Lage, im *in vitro* Neutralisationstest die Infektion durch HIV-1 Ba-L zu unterbinden. Alle Seren wurden wiederum in einem unabhängigen Neutralisationstest (p24Gag-Capture ELISA) am RKI von Dr. Steve Norley überprüft und auch dort als nicht neutralisierend klassifiziert (Tabelle 3.7).

Die Ergebnisse der parallel am BfR durchgeführten Immunisierungsstudie mit den Antigenen UR002, UR004 und UR010 deckten sich mit den Ergebnissen der am RKI durchgeführten Studie. Alle Immunseren zeigten eine stärkere Bindung an das E1 als gegen das E2 Peptid und insgesamt nur eine schwache Bindung an rekombinantes gp41. Im Neutralisationstest waren alle Seren bei einer Verdünnung von 1:10 negativ. Am BfR

wurde ebenfalls eine Wiederholung der DNA-Immunisierungsstudie durchgeführt. Diese bestätigte die in der vorangegangenen Studie erzielten negativen Ergebnisse. Alle Seren zeigten nur eine moderate Bindung an gp41 im ELISA, keines der Seren, die aus der Immunisierung mit der DNA der Hybridproteine UR007 und UR004 hervorgingen konnte HIV-1 Ba-L neutralisieren (Tabelle 3.7).

Rattengruppe/ Institut	Antigen	Protein- o. DNA-Menge	E1	E2	rgp41	NT PCR	NT ELISA
234 / RKI	UR002	je Tier 250 µg Protein	-	+	+	-	-
235 / RKI	UR004	je Tier 250 µg Protein	++	+	++	-	-
1 / BfR	UR002	je Tier 250 µg Protein	+	+	+	-	-
2 / BfR	UR004	je Tier 250 µg Protein	+	+	+	-	-
3 / BfR	UR004	je Tier 250 µg Protein	++	+	+	-	-
4 / BfR	UR010	je Tier 250 µg Protein	+	+	+	-	-
5 / BfR	UR006	je Tier 3 µg DNA/Applikation	++	++	++	-	-
6 / BfR	UR007	je Tier 3 µg DNA/Applikation	+	+	+	-	-
7 / BfR	UR014	je Tier 3 µg DNA/Applikation	+	+	+	-	-

Tabelle 3.7 : Die Charakterisierung der induzierten humoralen Immunantworten mittels ELISA. E1 und E2 zeigen die durchschnittliche Immunantwort der Rattengruppe im Peptid-ELISA gegen das jeweilige Peptid bei einer Verdünnung von 1:300, rpg41 zeigt die Immunantwort gegen das rekombinante gp41 von HIV-1 bei einer Verdünnung von 1:500 (- = keine Reaktion, + = $OD_{562} < 0,1$, ++ = $0,1 < OD_{562} < 0,4$). NT-PCR: Neutralisation gegen HIV-1 Ba-L bei einer Serumverdünnung von 1:10 im real time PCR basierten Assay. NT-ELISA: Neutralisation gegen HIV-1 IIIB gemessen über p24Gag-Capture ELISA.

Da es in den neuen Versuchen nicht gelang, die zuvor erzielten Ergebnisse zu reproduzieren, sollten die Bindungsspezifitäten ausgewählter Rattenserum genauer untersucht werden. Hierzu wurde eine Pepsotmembran verwendet, welche die Aminosäuresequenz des Hybridantigens UR004 (Anhang A-V) umfasst. Damit wurde die Verteilung der induzierten Antikörperpopulationen gegen den KoRV-p15E-Anteil bzw. die gp41-Sequenzen im Hybridprotein bestimmt. Die Epitopkartierung des alten Serums 104/2 zeigte wiederum eine Bindung der induzierten Antikörper im E1 und im E2 Bereich des Hybridproteins (Abbildung 3.40 A). Da sich dort die Sequenzbereiche des gp41 von HIV-1 befanden, war das eine Bestätigung der zuvor auf der Pepsotmembran von HIV-1 gp41 durchgeführten Epitopkartierungen und der gp41 ELISA Daten (Abschnitt 3.2.1.2). Die Epitopverteilung der im Reproduktionsversuch immunisierten Ratten stellte im Vergleich zu den ersten Immunisierungsergebnissen anders dar. Es konnten in der Reproduktionsstudie einige Cluster nicht als distinkte Epitope aufgelöst werden. Obwohl sich wiederum Antikörper gegen den E1 und E2 Bereich nachweisen ließen, traten hier auch bindende Antikörper gegen die immundominante Schleife (IDO), sowie gegen die Bereiche der CHR auf (Abbildung 3.40 B). Die Induktion von Antikörpern gegen den immundominanten Bereich transmembraner Hüllproteine von Retroviren geschieht im Allgemeinen während der Infektion mit einem Retrovirus. Durch Immunisierung mit rekombinanten transmembranen Hüllproteinen wurden bisher nur Antikörper gegen die E1 und E2 Bereiche von KoRV, PERV oder FeLV induziert (Fiebig et al., 2003, 2006, Langhammer et al., 2005). Als Vergleich wurde daher das Serum der Ratte 231/1 aus einem KoRV-Infektionsversuch (zur Verfügung gestellt von Uwe Fiebig) hinsichtlich der Epitopverteilung charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass sich im Serum der Infektionsratte Antikörper befinden, welche an die Helices nahe der IDO von p15E binden. Im E1 und E2 Bereich des Hybridproteins konnten erwartungsgemäß keine bindenden Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 3.40 C).

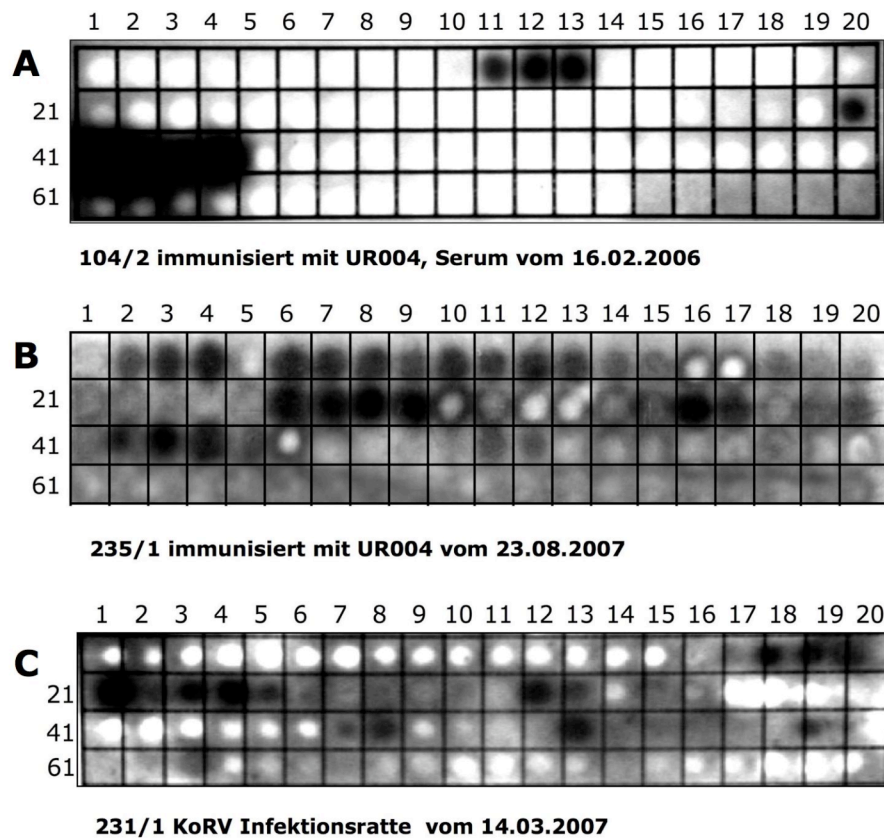


Abbildung 3.40.: Epitopkartierungen von Rattenserum verschiedener Immunisierungsstudien mit UR004 zu einer mit KoRV infizierten Ratte auf der Pepsotmembran von UR004. Alle Seren wurden bei einer Verdünnung von 1:750 getestet. (A) Serum der Ratten 104/2 (B) Serum der Ratte 235/1 (C) Serum der Ratte 231/1 von Uwe Fiebig. Die erkannten Epitope sind im Anhang A-VI aufgeführt.

Ein Test der Seren im *in vitro* Neutralisationstest gegen das Koala Retrovirus zeigte, dass die aus der Rattengruppe 234, 235, 2 BfR, 5 BfR und 6 BfR gewonnen Immunsereen das Virus neutralisieren konnten, während die mitgeführten Seren der 104/1, 104/2, 128/1 und 130/1 dazu nicht in der Lage waren (Abbildung 3.41).

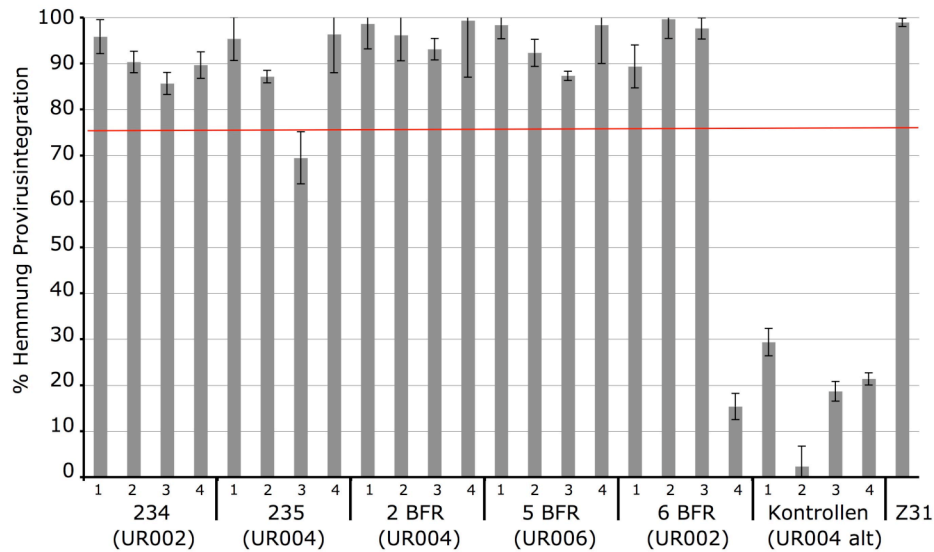


Abbildung 3.41.: Neutralisationstest der Rattenserum gegen KoRV. Alle Seren wurden bei einer Verdünnung von 1:10 auf Neutralisation des Koala Retrovirus getestet. Die Kontrollen waren 1:Serum 104/1, 2:Serum 104/2, 3:Serum 128/1, 4:Serum 130/1. Z31, immunisiert mit KoRV-p15E (Uwe Fiebig, 2006), wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus Triplikaten mit der Standardabweichung. Die rote Gerade zeigt den Schwellenwert bei 75 % Neutralisation an.

Zusätzlich zeigten die Seren von Tieren, die in der DNA Immunisierungsstudie nur den Leervektor (199) oder gp41 (200, 5 BFR) appliziert bekamen eine Reaktion im Western Blot gegen KoRV-p15E. Auch die Seren der unbehandelten Sentinellen hatten bindende Antikörper gegen das p15E von KoRV, womit ein Immunisierungseffekt ausgeschlossen werden konnte (Abbildung 3.42).

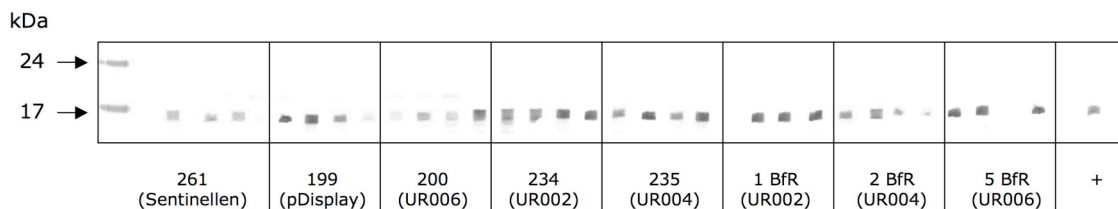


Abbildung 3.42.: Western Blot ausgewählter Rattenserum auf KoRV-p15E. Alle Seren wurden bei einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. +=Positivkontrolle hier: Ziegen Serum 31 (1:1000), sAK: anti-Ratte HRP (1:4000).

Da eine Verwechslung der Gruppen während der Immunisierungsstudien ausgeschlossen werden konnte, wurde vermutet, ob die Western Blot Ergebnisse eine Kreuzreaktion darstellen. Als Ursache wurde auch aufgrund der Epitopkartierungen (Abbildung 3.40) eine Infektion in den Ratten diskutiert. Eine Blast-Analyse der Sequenz des p15E von KoRV mit der Datenbank von NCBI zeigte eine Homologie des KoRV-p15E zum transmembranen Hüllprotein des endogenen Rattenleukämievirus (RaLV). Das transmembrane Hüllprotein hat ebenfalls homologe Bereiche zum PERV-p15E (Abbildung 3.43).

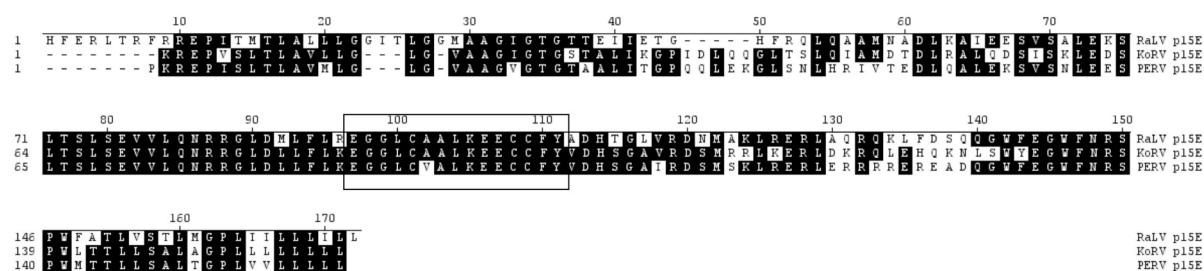


Abbildung 3.43: Vergleich der Aminosäuresequenzen der Ektodomänen von RaLV-p15E, KoRV-p15E und PERV-p15E. Mit RaLV-p15E übereinstimmende Aminosäuren sind schwarz unterlegt. Es wurde der Cysteinloop/Immundominanter Bereich markiert.

3.2.3.1 Untersuchungen zur Aktivierung des endogenen Rattenleukämievirus (RaLV)

Ein Studium der Gesundheitszeugnisse der verwendeten Versuchstiere zeigte, dass Ratten ab dem Lieferdatum 04/2006 durchgehend mit dem Bakterium *Pasteurella pneumotropica* infiziert waren. Pasteurelleninfektionen sind ein häufiges Problem in der Tierzucht. Infolge dieser Erkenntnis wurden für alle Versuchstiere Pasteurellentests durchgeführt. Für die am RKI gehaltenen Ratten wurde ein serologischer Test bei der Firma Biodoc (Hannover, Deutschland) durchgeführt. Am BfR wurde eine hausinterne PCR zum Nachweis von Pasteurellen angewendet. Alle Versuchstiere, sowohl im RKI, als auch am BfR waren positiv für Pasteurellen.

Bisher wurde keine Interferenz einer Pasteurelleninfektion mit Tierversuchen beschrieben. Durch eine Literaturrecherche konnten Arbeiten gefunden werden, die belegen, dass das von den Pasteurellen produzierte Toxin zu einer Aktivierung der Genexpression in Zellen des Wirtsorganismus führen kann (Orth et al., 2007).

Es wurde der Vermutung nachgegangen, ob es infolge der Pasteurelleninfektion zu einer Aktivierung eines endogenen Rattenretrovirus kam. Hierbei wurde insbesondere die Expression der env-Gene des Ratten Leukämie Virus (RaLV) untersucht. Zum Test dieser Hypothese wurde das *Pateurella multocida* Toxin (PMT), einem mit *P. pneumotropica* verwandten Stamm in Zellkultur mit verschiedenen hauseigenen Rattentumor-Zelllinien und der bekannten Rat1 Zelllinie inkubiert. Durch eine Two-Step-RT SYBR-Green real time PCR mit RaLV-env spezifischen Primern (Nr. 53+53, Abschnitt 2.1.5) wurde eine Quantifizierung der RaLV-env-Transkription in den Zellen durchgeführt. Es zeigte sich, dass die RaLV-env-Transkription spezifisch durch PMT und Bromdesoxyuridin (BrdU), einem chemischen Aktivator endogener Retroviren gesteigert wurde. Unspezifische Zellaktivierung durch Phytohämagglutinin oder die Inkubation mit BSA in äquimolaren Mengen zeigte keine Steigerung der Transkription (Abbildung 3.44).

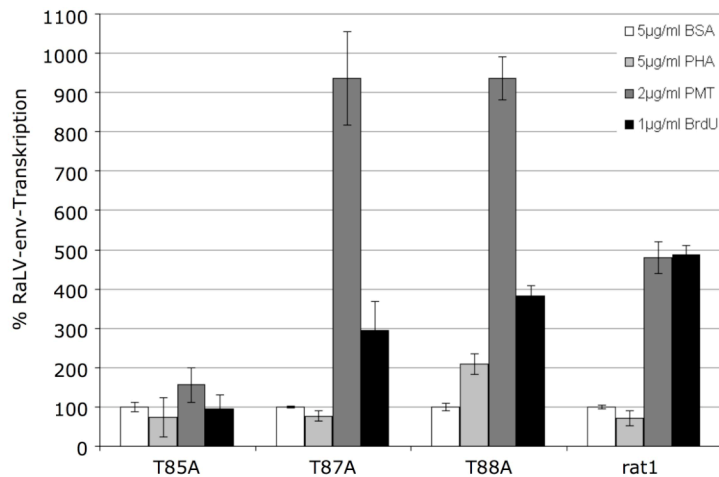


Abbildung 3.44: Quantifizierung von RaLV-Transkripten mittels Two-Step-RT SYBR-Green real-time PCR in Lysaten verschiedener Rattenzelllinien nach Inkubation mit BSA (5 µg/ml), PHA (5 µg/ml), PMT (2 µg/ml) oder BrdU (1 µg/ml). Die Berechnung bezieht sich auf die Kontrolle (5 µg/ml BSA), die als Basal-Transkription (100 %) gesetzt wurde. Es wurden alle Werte auf GAPDH-RNA nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode normalisiert. Die Zelllinien T85A, T87A und T88A wurden innerhalb des Labors von Uwe Fiebig aus Wistar Ratten generiert und hier für die Tests zur Verfügung gestellt. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus Triplikaten mit der Standardabweichung.

Um zu testen, ob Primärmaterial aus den Versuchstieren ebenfalls in der Lage war *in vitro* die RaLV-env-Transkription zu stimulieren, wurden Rachenabstriche aller Ratten genommen. Mit den Abstrichen wurde eine Nährbouillon beimpft, welche für 16 h bei 37°C schüttelnd inkubiert wurde. Die entstanden Bakterienkulturen wurde mittels PCR auf Pasteurellen überprüft. Zusätzlich wurden aus allen Kulturen durch eine Acetonfällung die Proteine extrahiert. Die in PBS aufgenommenen Proteinpellets wurden daraufhin mit verschiedenen Rattenzelllinien für 18 h inkubiert. Es konnte ein starker Anstieg der RaLV-env-Transkription in den Rattenzellen gezeigt werden, die mit PMT oder Proteinextrakt aus zuvor positiv auf Pasteurellen getesteten Kulturen inkubiert wurden. Proteinextrakt aus negativen Kulturen, BSA, PHA oder Proteinextrakt aus der verwendeten Nährbouillon hatten keinen Effekt auf die RaLV-env-Transkription (Abbildung 3.45).

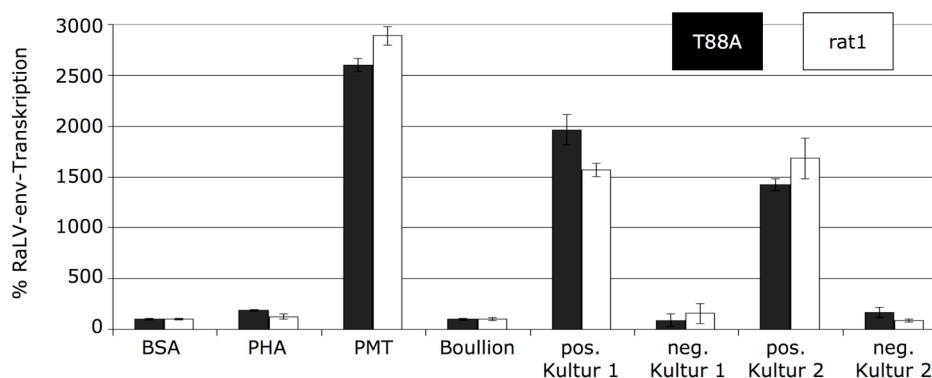


Abbildung 3.45.: RaLV-Expression in T88A (schwarz) und Rat1 Zellen (weiß) nach 18 h Inkubation mit 10 µg/ml BSA, 10 µg/ml PHA, 2 µg/ml PMT, sowie der nach Proteinfällung von Bakterienkulturen in PBS aufgenommenen Proteinpellets (30 µg/ml Gesamtprotein). Die Kultur wurde durch Rachenabstriche angelegt und ü.N. bei 37°C inkubiert. Pasteurellen positive und negative Kulturen wurden durch RaLV-spezifische PCR unterschieden. Die Werte wurden gegen GAPDH-RNA normalisiert. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus Triplikaten mit der Standardabweichung.

Es konnte gezeigt werden, dass es *in vitro* zu einer Aktivierung der RaLV-env Expression durch das PMT von *Pasteurella pneumotropica* kommt. Weiterhin konnte gezeigt werden,

dass gefällte Proteine aus Pasteurellen positiven Bakterienkulturen ebenfalls in der Lage sind die RaLV-env Expression *in vitro* zu stimulieren, während Proteine gefällte aus Pasteurellen negativen Bakterienkulturen diesen Effekt nicht zeigten.

3.2.3.2 Immunisierungsstudie bei der Firma Eurogentec

Es gab aufgrund der Ergebnisse in Abschnitt 3.2.3.1 die Vermutung, dass eine Interferenz der Pasteurelleninfektion die veränderten Immunantworten im Rattenmodell verursachte. Daher sollten neue Immunisierungsstudien unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen durchgeführt werden. Es bestand weder am BfR noch am RKI die Möglichkeit zur SPF-Haltung der Ratten. Daher wurde die Firma Eurogentec (Belgien) mit der Immunisierung von Ratten beauftragt. Die Studie wurde so angelegt, dass die Firma einen Versuch nach dem firmeneigenen Protokoll durchführt und parallel eine Studie nach dem am RKI verwendeten Standardimmunisierungsprotokoll (Abschnitt 2.2.7.2). Es sollte nur das rekombinante Hybridprotein UR004 getestet werden. Das Ergebnis dieses Versuches deckte sich mit den am RKI durchgeführten Immunisierungsstudien. Keines der induzierten Seren zeigte eine starke Reaktion gegen das E2 Peptid, und keines der Seren war in der Lage im *in vitro* Neutralisationstest die Provirusintegration von HIV-1 Ba-L zu hemmen (Tabelle 3.8).

Tier	Protokoll	Applikationen	Antigenmenge/Applikation	E1	E2	NT
63	Eurogentec	6	100 µg	++	+	-
64	Eurogentec	6	100 µg	+	-	-
78	RKI	2	250 µg	+	+	-
79	RKI	2	250 µg	+	+	-

Tabelle 3.8.: Zusammenfassung und Ergebnisse der Immunisierungsstudie mit UR004 der Firma Eurogentec. E1/E2= Reaktivität der Immunsereen im Peptid-ELISA gegen das jeweilige HIV-gp41-Peptid bei einer Verdünnung von 1:300. NT= Ergebnis des *in vitro* Neutralisationstests der Immunsereen gegen HIV-1 Ba-L bei einer Verdünnung von 1:10; - = keine Reaktion, + = $OD_{562} < 0,1$, ++ = $0,1 < OD_{562} < 0,4$.

Obwohl mehrmals mit der Firma besprochen, stellte sich kurz vor der Endblutung der Tiere heraus, dass kein Pasteurellentest durchgeführt worden war. Ein nachträglicher, serologischer Test zeigte, dass auch diese Tiere mit Pasteurellen infiziert waren und somit keine SPF-Bedingungen nach internationalem Standard eingehalten worden waren. Dadurch konnte auch in diesen Versuchen ein Einfluss der Infektion der Versuchstiere auf die Versuchsergebnisse nicht ausgeschlossen werden. Diese Studie kann daher nicht eindeutig bewertet werden.

3.2.3.3 Immunisierung mit gp36 von HIV-2, einem nicht mit p15E verwandten transmembranen Hüllprotein

Im Rahmen der Etablierung des HIV-2 Kontrollsystems für den *in vitro* Neutralisationstest (Abschnitt 3.1.3) wurde die Ektodomäne des gp36 von HIV-2_{7312A} kloniert und als rekombinantes Protein in *E. coli* exprimiert (Primer 19+20, Abschnitt 2.1.5). Es wurden durch Immunisierung gp36 spezifische Antiseren generiert. Diese wurden hinsichtlich ihrer Neutralisation und Bindungsspezifität charakterisiert.

Durch die Immunisierung mit der Ektodomäne von gp36 konnten in allen Ratten gp36 spezifische Antikörper induziert werden. Die Epitope der induzierten Antikörper clusterten ausschließlich in der MPER des gp36 von HIV-2 (Abbildung 3.46 A und B). Im *in vitro* Neutralisationstest konnten keines der Seren bei einer Verdünnung von 1:10 die Provirusintegration von HIV-2_{7312A} oder HIV-2_{60415K} signifikant reduzieren (Abbildung 3.46 C).

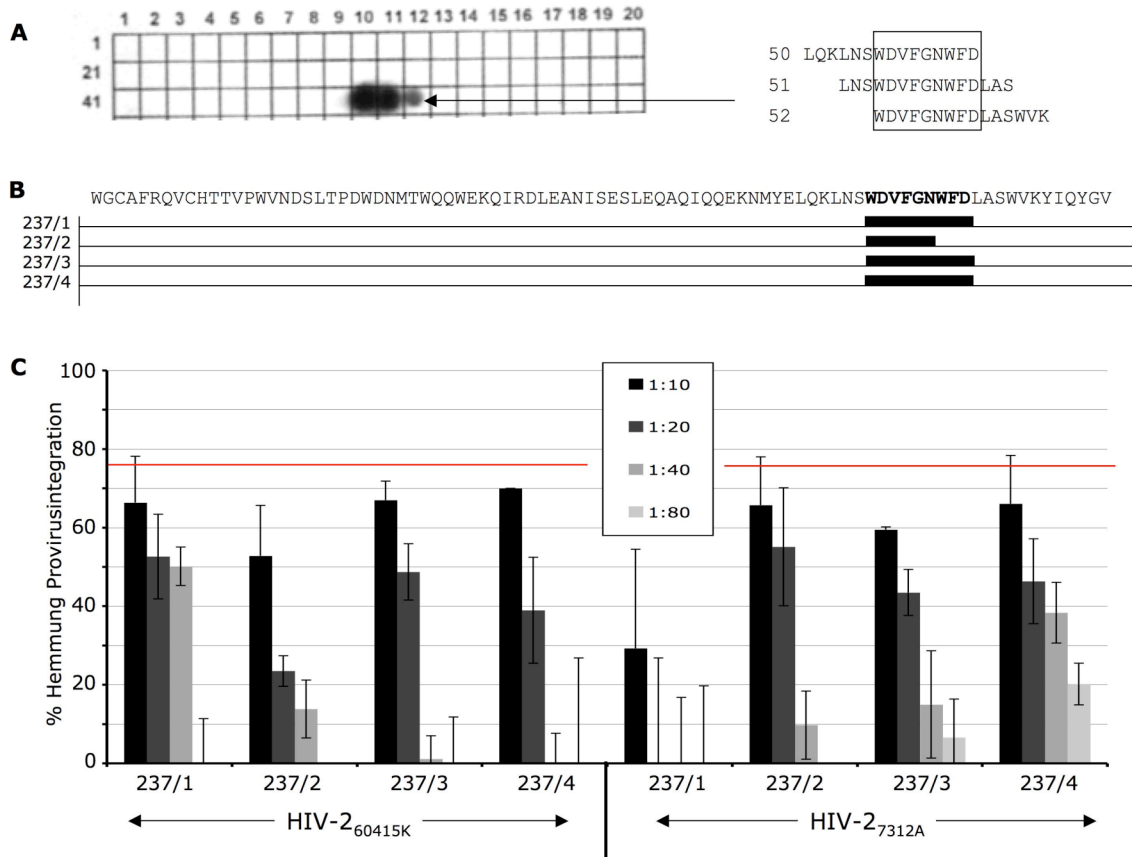


Abbildung 3.46: Ergebnisse der Immunisierung von Ratten mit rgp36. (A) Epitopmapping der Ratte 237/1 auf der Pepsotmembran des gp36 von HIV-2_{7312A} bei einer Serumverdünnung von 1 : 1000. (B) Schematische Zusammenfassung aller Epitopkartierungen der Rattengruppe 237 auf der gp36 Pepsotmembran bei einer Verdünnung von 1 : 1000. (C) Titration der gp36 spezifischen Rattenserum im *in vitro* Neutralisationstest gegen die Isolate HIV-2_{60415K} (Nr. 20 in Tabelle 3.1) und HIV-2_{7312A} (Nr. 21 in Tabelle 3.1). Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus Triplikaten mit der Standardabweichung. Die rote Gerade zeigt den Schwellenwert bei 75 % Neutralisation an.

In dieser Studie war es gelungen E2 spezifische Antikörper zu induzieren, obwohl die Ratten ebenfalls positiv im Pasteurellentest waren. Allerdings konnte keines der Seren die getesteten HIV-2 Isolate neutralisieren.

4. Diskussion

4.1 Schutz vor der HIV-Infektion

Der Schutz vor der HIV-Infektion könnte auf drei Wegen erfolgen: durch Benutzung eines Kondoms, durch den Einsatz von Mikrobiziden oder durch ein Vakzin. Die Frequenz des Gebrauchs von Präservativen ist das Resultat der Aufklärungsarbeit im Bereich HIV/AIDS. Da die Entwicklung eines HIV-Impfstoffes bisher nicht gelang (Burton et al., 2007, Day et al. 2007), wurde in den letzten Jahren auch die Entwicklung von Mikrobiziden gefördert (Paulus 2006, Bouschbacher et al., 2008). Gerade auf dem afrikanischen Kontinent, wo die Zahl der Neuinfektionen bei Frauen rasant ansteigt (UNAIDS, 2007), soll ihnen damit die Möglichkeit des Schutzes aus eigener Entscheidung gegeben werden. Die Verfügbarkeit eines HIV-Impfstoffes würde aber der wichtigste Schritt zu Eindämmung der HIV-Pandemie sein. Heute wird die Auffassung vertreten, dass ein effektives HIV-Vakzin sowohl humorale, als auch zelluläre Immunität vermitteln muss (Hinkula et al., 2007, Fauci et al., 2007). In dieser Arbeit wurden Strategien zur epitopgerichteten Induktion einer gp41 spezifischen HIV-neutralisierenden humoralen Immunantwort getestet.

4.2 Neuartige Neutralisationstests zur Evaluierung von retroviralen Vakzinen

Für HIV gibt es eine Reihe verschiedener Ansätze, Virusneutralisation nachzuweisen. Alle Tests unterschieden sich hauptsächlich in den Reportersystemen. In dem hier verwendeten Neutralisationstest wurde die Virusneutralisation über die Quantifizierung der Reduktion von Provirusintegration mittels real time PCR bestimmt (Abschnitt 2.2.2.2). Die real time PCR Primer 68i und 69i amplifizierten nur Isolate der Gruppe M (Abbildung 3.1). Die Arbeitshypothese der Beteiligung der E1 und der E2 Domäne an der Induktion HIV-1 breit neutralisierender Antikörper sollte auch für die HIV-1 Gruppen N und O überprüft werden. Deshalb wurde ein zur HIV-1 Gruppe M analoges real time PCR System zur Quantifizierung der Provirusintegration der verwendeten Isolate HIV-1 YBF-30 (Gruppe N) und HIV-1 MVP5180 (Gruppe O) etabliert (Abschnitt 3.1.2). Zusätzlich sollten die induzierten Seren mit der Verwendung von Viren verschiedener HIV-Gruppen auf Viruspezifität untersucht werden. Um die HIV-1 Spezifität der induzierten Antiseren zu charakterisieren, wurde ebenfalls eine real time PCR etabliert, die es ermöglicht spezifisch HIV-2 Proviren zu quantifizieren (Abschnitt 3.1.3).

Die real time PCR ist in der Virusdiagnostik bereits unabhömmlich (Shutten et al., 2000, Damond et al., 2002, Planiter et al., 2004). Trotzdem wurde sie bisher nicht im Zusammenhang mit Neutralisationstests verwendet. Obwohl in einer klinischen Studie bereits eine real time PCR zur Quantifizierung der Proviruslast in HIV Infizierten verwendet wurde, kam diese nicht bei der Bestimmung von Virusneutralisation zum Einsatz (Gueudin et al., 2008). Für Retroviren eignet sich der Nachweis der Proviren besonders als Maß für die Infektion. Die provirale DNA ist im Vergleich zum episomalen DNA Genom oder RNA Genom anderer Virusfamilien das stabilste Intermediat und deshalb experimentell am leichtesten zugänglich.

Durch den Einsatz der sondenbasierten real time PCR zur Detektion ist die simultane Messung mehrerer Parameter im selben Reaktionsansatz möglich. In dieser Arbeit wurden alle verwendeten und neu entwickelten real time PCRs auch als Duplex-PCR etabliert. Durch die Koamplifikation des zellulären Gens GAPDH sollte ein Parameter für die Zellteilung und damit Zellvitalität erfasst werden. Die Vitalität der Zellen kann durch toxische Faktoren in den getesteten Seren beeinflusst werden (Trkola et al., 1999). Cytotoxische oder cytostatische Effekte haben einen Einfluss auf die Virusreplikation, da diese von der zellulären Maschinerie abhängt. Es kann aufgrund verringerter Zellaktivität zu verminderter Virusreplikation kommen, welche dann falsch positiv als Virusneutralisation gewertet werden könnte. Die PCR amplifiziert aufgrund der Primerwahl ausschließlich GAPDH-DNA (Abschnitt 3.1.4). Der erhaltene Wert konnte als Maß für eine bestimmte Zellzahl genommen werden, auf die sich dann die Proviruszahl in einem Well bezieht. Bei konstanten Zellzahlen in den verglichenen Reaktionsansätzen konnte über die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode der Einfluss der Zellteilungsaktivität auf die Berechnung der Neutralisation minimiert werden. Die Effizienzen der etablierten real time PCRs lagen zwischen 97,8 und 99,4% (Abbildung 3.4, 3.9, 3.11), wodurch diese Berechnungsmethode angewendet werden konnte. Intrazelluläre, serumvermittelte Replikationsrestriktionen oder schwach cytostatische Effekte konnten mit der GAPDH-PCR nicht erfasst werden.

Eine Erweiterung des Testsystems wäre denkbar, wenn in einem Ansatz ein Virusgemisch in den Neutralisationstest eingesetzt werden würde. Über die Spezifität der Primer ergaben sich schon in den Einzelansätzen detaillierte Diskriminierungsmöglichkeiten: Die für die Detektion von HIV-1 verwendeten Primer 68i und 69i amplifizierten alle Isolate des Subtyps B der Gruppe M (Abbildung 3.1), aber nicht die der Gruppen N und O. Für die Gruppen N und O konnte wiederum dieselbe Sonde verwendet werden, da diese Gruppen durch die Wahl der Primer unterschieden werden konnten (Abbildung 3.3). Es könnte anhand der simultanen spezifischen Detektion jedes eingesetzten Virus durch unterschiedlich markierte real time PCR Sonden die neutralisierende Aktivität des getesteten Agens sehr genau differenziert werden. Damit wären Parameter wie Neutralisationspotential, Virusspezifität und Toxizität im selben Reaktionsansatz messbar.

Neutralisationstests sind oft zeit- und materialaufwendig. Während PBMC basierte Assays bedingt durch die Vorstimulation und das aufwendige Protokoll des Mediumwechsels bis zu 10 Tage dauern (Trkola et al., 1999), erscheint der p24-Capture ELISA basierte Neutralisationstest (Kuate et al., 2006) mit einer Dauer von 7 Tagen kurz. Der hier optimierte *in vitro* Neutralisationstest benötigt 68 h bis zu einem Ergebnis. Ein Grund für die Zeitersparnis ist die Verwendung der PCR, welche für die Amplifikation des Virussignals verwendet wird. Bei allen anderen Tests muss diese Amplifikation auf natürlichem Wege durch Virusreplikation erfolgen. Die Inkubationszeit könnte durch höhere Ausgangstitern der Viren noch verkürzt werden, wodurch sich aber die Sensitivität des Tests verringern würde (Mascola et al., 2000). Im Umkehrschluss könnte die Sensitivität auf Kosten der kurzen Inkubationszeit durch geringere Virustiter erhöht werden. Die kurze Inkubationszeit ist ein Vorteil des real time PCR basierten gegenüber anderen Neutralisationstests. Der Test wurde daher zugunsten der Stabilität bewusst nicht an der Nachweisgrenze der Neutralisation oder der Infektion durchgeführt.

Ein weiterer Vorteil dieses Testsystems ist die Verwendung von standardisierten Zelllinien, hier C8166 oder GHOST-R5⁺. Das Reproduzieren von PBMC-Assays scheitert oft an Faktoren wie Spendervariabilität oder nicht einheitlich stimulierter Zellen eines Spenders (Trkola et al., 1999). Da die PCR universell einsetzbar ist, könnten viel versprechende Kandidaten auch in einem Test mit primären Zellen, wie PBMCs im Nachhinein evaluiert werden. Durch die Verwendung der PCR ist eine Adaptation des Protokolls an jedes Retrovirus möglich.

Da durch die Immunisierung mit den Hybridantigenen breit neutralisierenden Antikörper induziert werden sollten, musste ein breites Spektrum an HIV Isolaten für die Tests zur Verfügung stehen. Es gelang 20 verschiedene HIV-Isolate unterschiedlicher Subtypen, Stämme und Gruppen für den Einsatz im *in vitro* Neutralisationstest zu kultivieren und zu charakterisieren (Abbildung 3.1, Tabelle 3.1). Damit stand eine repräsentative Auswahl an HIV Isolaten zur Verfügung. Eine vergleichbare, aber umfangreichere Selektion wurden auch für die Charakterisierung des Neutralisationsspektrums der HIV-1 breit neutralisierenden monoklonalen Antikörper 4E10 und 2F5 verwendet (Binley et al., 2004).

Der hier optimierte real time PCR basierte *in vitro* Neutralisationstest ist durch die Erweiterung der Kontrollen zur Virusspezifität und Serumtoxizität ein spezifischer aber universell adaptierbarer Test. Er ermöglicht durch die Verwendung des 96-Well-Maßstabes einen hohen Probendurchsatz bei halbiertem Laufzeit im Vergleich zu bisher beschriebenen Verfahren.

4.3 Kritische Betrachtung der Definition von Neutralisation

Potentielle HIV Impfstoffkandidaten können präklinisch nur durch *in vitro* Neutralisationstests und später im Primatenmodell funktionell evaluiert werden. Aufgrund der verschiedenen angewandten Tests in den Laboren weltweit, kommt es zu Differenzen bei der Bestimmung neutralisierender Aktivitäten von Immunseren. Selbst bei der Quantifizierung viraler RNA in standardisierten Proben konnten nur zwei von neun teilnehmenden Laboren die entsprechende Kopienzahl akkurat bestimmen (Damond et al., 2008). Die Quantifizierung eines Virussignals ist die Grundlage für die Bewertung von Neutralisation. Bei vergleichenden Studien ist es daher wichtig, einheitliche Kriterien für die Bewertung von Ergebnissen zu verwenden, ganz besonders, wenn diese mittels unterschiedlicher Tests generiert wurden. In dem hier optimierten *in vitro* Neutralisationstest wurde die Reduktion der Provirusintegration als Maß für die Virusneutralisation herangezogen. Seren galten als positiv, wenn 75 % ($\Delta Ct=2$, weil PCR Effizienz=100 %, Abschnitt 2.2.2.2) weniger Proviren als in der Vergleichsprobe detektiert wurden. In einigen anderen Assays wurden Seren nur als positiv bewertet, wenn nach Ablauf der Inkubationszeit kein virusspezifisches Signal zu messen war (Kuate et al., 2006). Daher muss die Zielstellung des durchgeführten Tests vorher festgelegt und bis zur Beurteilung der Ergebnisse beibehalten werden. Der hier verwendete *in vitro* Neutralisationstest bezieht sich mit der Aussage zur Neutralisation auf den stets mitgeführten HIV-1 bnAK 2F5. Es wurden immer 5 µg/ml oder 10 µg/ml dieses Antikörpers eingesetzt, um einen internen Referenzwert zu erzeugen. Es sollte am Ende des Tests die Aussage getroffen werden, dass ein induziertes Immunserum in einer

bestimmten Verdünnung eine schlechtere, vergleichbare oder bessere Neutralisation als 5 µg/ml des Standards bewirkt. Die Neutralisation wurde durch den Vergleich der Provirusintegration zweier Proben bestimmt. Da diese Aussage auf einer Relation beruht, ist es, anders als bei diagnostischen PCRs, nicht notwendig eine minimale Anzahl an Genomkopien nachzuweisen.

Auch andere Tests betrachten eine partielle Infektionshemmung als positives Ergebnis (Muster et al., 1994, Coeffier et al., 2000, Devito et al., 2004; Luo et al., 2006). Der Schwellenwerte dieser Tests lag bei 50 %, während die hier verwendete Signifikanzgrenze bei stringenteren 75 % Neutralisation lag.

Ein möglicher Schritt zur Standardisierung von Neutralisationstests kann der Bezug auf definierte Mengen monoklonaler neutralisierender Antikörper sein. Für HIV-1 würde sich der Antikörper 2F5 anbieten, da dieser in entsprechender Menge für jedes Labor über das Aidsreagent Programm des NIH verfügbar ist (www.aidsreagent.org). Ein Relation neutralisierender Aktivität zu dem in jedem Test mitgeführten Antikörper, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, würde die laborübergreifende Bewertung vereinfachen. Die führenden Institute und Organisationen der HIV-Impfstoffentwicklung wie das NIH oder IAVI sollten Richtlinien für die Bewertung von Ergebnissen der Neutralisationstests, bessere messbare Standards und „*Standard Operation Protocols*“ (SOP) bereitstellen, um die vergleichbare, akkurate und reproduzierbare Evaluierung von Impfstoffkandidaten in Zukunft zu erleichtern.

4.4 Epitopgerichtete Vakzinierung durch die Verwendung von Hybridantigenen

Die Induktion von breit neutralisierenden Antikörpern gegen das E2 von HIV-1 gilt noch immer als wichtiger Schritt zur Entwicklung einer HIV-Vakzine. Dabei stelle sich heraus, dass die Art der Präsentation des Epitopes entscheidend für den Erfolg eines solchen Ansatzes ist. In dieser Arbeit wurden die Epitope der beiden HIV-1 bnAK 2F5 und 4E10 in ein verwandtes transmembranes Hüllprotein (KoRV-p15E) eingebaut und so dem Immunsystem präsentiert. Im KoRV-p15E wurden zuvor neutralisierende Epitope identifiziert (Fiebig et al., 2006). Diese befanden sich im p15E in analoger Position zum den HIV-1 breit neutralisierenden Epitopen von 2F5 und 4E10 im gp41. Einige Aminosäuren waren im p15E an homologer Position wie im gp41, so dass die HIV-E2-Sequenz von gp41 rudimentär zu identifizieren war (Tabelle 3.2). Eine Substitution nicht passenden Aminosäuren im E2 von KoRV-p15E führte zur Vervollständigung der HIV-E2-Sequenz im KoRV-p15E. Das war die Grundlage der Herstellung aller KoRV-basierten Hybridantigene.

Die in Abschnitt 3.2.1.1 hergestellten Hybridproteine UR001 und UR002 (Abbildung 3.13) beinhalten nur die E2 Sequenz der gp41 von HIV-1. Die Immunisierung mit diesen Proteinen induzierte nur gp41 bindende E2-spezifische (Abbildung 3.14, 3.16), aber keine neutralisierenden Antikörper (Abbildung 3.15). Liang et al. haben die Sequenz LLELDKWASL in die V1, V2, V3 oder V4 Region eines rekombinanten gp120 kloniert. Sie immunisierten Mäuse und Meerschweinchen und konnten so Seren gewinnen, die eine Hemmung der HIV Infektion im Syncytiuminhibitionsassay bewirkten (Liang et al., 1999). Immunisierungen mit einem rekombinanten Maltose-Bindungsprotein, welches Wiederholungen der LLELDKWASL Sequenz enthielt, konnten

keine neutralisierenden Antikörper induzieren (Coeffier et al., 2000). Beide Versuche beinhalteten nur das Epitop von 2F5 (ELDKWAS), womit sie entfernt mit dem Antigen UR001 vergleichbar wären. Trotz der Verwendung fast identischer Sequenzen in allen Versuchen waren die Ergebnisse bezüglich der Neutralisation unterschiedlich. Damit wurde gezeigt, dass die reproduzierbare Induktion breit neutralisierender Antikörper durch die Präsentation des linearen Epitopes E2 allein nicht gelingt.

Eine weitere Grundlage für die Klonierung der E1 und E2 substituierten Hybridantigene war der erstmals von Fiebig et al. (2005, 2009) beschriebene Befund, dass sich die Avidität der Bindung des Antikörpers 2F5 an sein Epitop „ELDKWAS“ im ELISA durch die Zugabe genau eines aus dem N-terminalen Bereich von gp41 abgeleiteten Peptids steigern ließ. Die Sequenz des Peptides Nr. 6342 aus dem NIH Peptidset (HIV-1 MN Env (15-mer) Peptideset: NIH-6451) diente als Basis für die E1-Bereiche der Hybridproteine und sollte das Ausbilden eines Konformationsepitopes am B-Zell-Rezeptor begünstigen. Der zusätzliche Einbau von HIV-E1-Sequenzen in die Hybridproteine UR001 und UR002 führte zu den Hybridantigenen UR003, UR004 und UR010 (Abschnitt 3.2.1.2, Abbildung 3.17). Die gegen UR004 und UR010 induzierten Immunsereen konnten im *in vitro* Neutralisationstest die Poyrusintegration von HIV-1 Ba-L signifikant hemmen (Abbildung 3.18, 3.19). Die Epitopspezifität der induzierten Antikörper konnte durch ELISA (Tabelle 3.3) und Neutralisationshemmversuche mit freiem HIV-E2 Peptid (Abbildung 3.21) bestätigt werden. Außerdem konnte für die gegen UR004 induzierten Antiseren eine subtypenübergreifende Neutralisation von HIV gemessen werden (Abbildung 3.22). Diese Ergebnisse wurden in einem externen Labor gegen das Isolat HIV-1 IIIB bestätigt (Abbildung 3.24), obgleich in dem dort verwendeten Neutralisationstest Cytotoxizität der getesteten Seren ausschließlich durch optische Kontrolle der Zellmorphologie überprüft werden konnte. Auch zwei weitere Immunisierungsstudien mit UR004 konnten eine HIV-1 neutralisierende Immunantwort induzieren (Abbildung 3.23). Damit gelang es erstmals HIV-1 breit neutralisierende gp41-MPER spezifische Antikörper zu induzieren. Diese Ergebnisse wurden als weitere Bestätigung gesehen, dass der E1-Bereich von gp41 an der Induktion von gp41 spezifischen HIV-1 bnAK beteiligt ist.

Auch andere Arbeitsgruppen zeigten nach dem von Fiebig et al. (2005) beschriebenen Mechanismus eine Interaktion von N-terminalen Bereichen des gp41, sowohl für 2F5 als auch für 4E10 (Lorizate et al., 2006, Hager-Braun et al., 2006). Lorizate et al. beschrieben eine Interaktion von einer näher im FP von gp41 befindlichen Sequenz mit der MPER. 2F5 erkennt diese Hybridstruktur ähnlich wie bei Fiebig et al. (2005) mit höherer Affinität. Dadurch ist der Antikörper ihrer Meinung nach in der Lage, die Ausbildung einer Fusionspore und damit den Viruseintritt zu verhindern. Analoge Untersuchungen mit 4E10 zeigten, dass der Antikörper ebenfalls mit einer im FP gelegenen Sequenz (512-AVGIGAVFLGFLGAAGSTMGAASMTLVQAR-542) interagieren soll (Hager-Braun et al., 2006). In dieser Studie wurde zum Interaktionsscreening ebenfalls das NIH-HIV-1 MN Peptidset verwendet. Leider wurde genau das bei Fiebig et al. als aviditätssteigernd für 2F5 beschriebene Peptid 6342 nicht getestet. Auf diese Theorie wird in Abschnitt 4.5 noch einmal detaillierter eingegangen.

Die hier generierten Hybridantigene wurden in Analogie zu den für γ -Retroviren beschriebenen Versuchen (Fiebig et al., 2003, 2006, Langhammer et al., 2005, 2006)

nur auf Basis der transmembranen Hüllproteine hergestellt. Das korrespondierende Oberflächenprotein gp70 wurde nicht verwendet, womit eine mögliche Maskierung von Epitopen ausgeschlossen werden konnte. Auch auf die Verwendung von Trimerisierungsdomänen wurde verzichtet. In früheren Immunisierungsstudien mit verschiedenen 5-Helixbündeln, in welchen die Präfusionsstruktur des gp41-Timers fixiert wurde, konnten zwar bindende, aber keine neutralisierenden Antikörper induziert werden (Kim et al., 2007). Ein Vorteil der hier generierten Hybridantigene ist, dass sie auf den transmembranen Hüllprotein KoRV-p15E basieren. Das native Protein besitzt nur ca. ein Drittel der Größe des gp41 und ist zudem nicht glycosyliert. Da die eingebrachten gp41-spezifischen Epitope keine genutzten Glycosylierungsstellen enthalten (Doria-Rose et al., 2005), können diese Antigene in Bakterien exprimiert werden. Trotzdem birgt das Umgehen der Glycosylierung eine Ambivalanz, da einerseits der Maskierung von Epitopen vorgebeugt wird, aber andererseits die Glycosylierungen einen Einfluss auf die Struktur des Proteins bzw. dessen Klappmechanismus zum Sechs-Helix-Bündel haben können. Es ist nicht ausgeschlossen, dass die Zuckerreste des gp41 eine sterische Behinderung während des Zusammenfaltens des Proteins ausüben und somit nur bestimmte Freiheitsgrade für diesen Prozess zur Verfügung stehen. Die dadurch temporär an der Virusoberfläche auftretenden Koformationsepitope könnten mit dem Hybridantigen-Ansatz nicht rekonstruiert werden. Auch die DNA-Immunisierung und membranständige Exposition der Hybridantigene kann dieses Problem nicht adressieren, da es sich ebenfalls um KoRV bzw. PERV-p15E basierte Proteine handelt.

Einen zu den hier beschriebenen Studien vergleichbaren Ansatz veröffentlichten Luo et al. (2006). Sie fusionierten die E2 Domäne an das PERV-p15E. Das Hybridprotein wurde auf der Oberfläche von VSV-Partikeln präsentiert. Es beinhaltete keine E1-Sequenz. Immunisierung von Kaninchen mit den rekombinanten VSV-Partikeln oder dem Hybridprotein allein resultierte in Seren, die bei einer Verdünnung von 1:20 HIV-1 HXB2 und JRFL neutralisieren konnten. Die induzierten Epitope wurden nicht kartiert und wiederum wurde nur auf Neutralisation von laboradaptierten Stämmen des Subtyps B getestet. Der Neutralisationstiter war ebenfalls geringer, als der hier initial durch Immunisierung mit UR004 erreichte Neutralisationstiter (Abschnitt 3.2.1.2). Die Ergebnisse von Luo et al. stehen im Gegensatz zu den hier beschriebenen Studien mit dem Protein UR001 und UR002 (Abschnitt 3.2.1.1). Beide KoRV-p15E basierten Proteine und das PERV-HIV-Fusionskonstrukt von Luo et al. (2006) beinhalten ausschließlich die MPER von gp41. Neutralisierende Aktivität gegen HIV-1 IIIIB konnte in den hier durchgeführten Studien nicht nachgewiesen werden (Abbildung 3.15). In einer früheren Studie mit einem PERV-Hybridprotein, welche aber zusätzlich die E1 Domäne von gp41 enthielt, konnten in 50 % aller Versuchstiere HIV-1 neutralisierende Seren induziert werden (Schmolke, 2004). Mit Konstrukten, die nur den E2 Bereich beinhalteten, gelang dies nicht.

Auch bei Luo et al. (2006) fokussierten sich die Versuche MPER spezifische nAK zu induzieren, wie bei vielen anderen Ansätzen allein auf die Verwendung der linearen E2 Sequenz (Liang et al., 1999, Coeffier et al., 2000, Marusic et al., 2001, Lou et al., 2006). Keiner dieser Versuche berücksichtigte Notwendigkeit der Nähe von NHR und CHR zur Ausbildung eines Konformationsepitopes, welches die Induktion 2F5/4E10 ähnlicher Antikörper ermöglichen könnte (Fiebig et al., 2005, Bellamy-McIntyre et al., 2007).

Berücksichtigt man, dass der Konformation der MPER oder des gesamten gp41 eine Schlüsselrolle bei der Induktion der bnAK vom Typ 2F5 oder 4E10 zukommt, sind diese Versuche nicht in der Lage die Situation an der Virusoberfläche während der Infektion optimal zu rekonstruieren. Der Ansatz, neutralisierende Epitope verwandter Proteine gegeneinander auszutauschen, um strukturelle Einflüsse zu minimieren, sollte der Vorteil der KoRV basierten Hybridproteine sein.

In allen Studien konnte unabhängig vom Neutralisationspotential der induzierten Antisera ein gp41 spezifische Immunantwort induziert werden. Hierbei lagen die Titer der durch Proteinimmunisierung induzierten Sera erwartungsgemäß höher, als die durch DNA-Immunsierung erreichten Titer. Obwohl die HIV-1 neutralisierende Immunantwort nicht reproduzierbar induziert werden konnte, wurden mit der angewandten Strategie erste Hinweise auf das Potential dieser Hybridantigene zur epitopgerichteten Induktion von HIV spezifischen neutralisierenden Antikörpern gewonnen.

4.5 Der Wirkmechanismus von 2F5 und 4E10 als Schlüssel zur Induktion von HIV-1 bnAK

Neben dem Verständnis der Funktionsweise von gp41 ist Aufklärung der Wirkmechanismen der HIV-1 bnAK 2F5 und 4E10 eine wichtige Grundlage zur Induktion von Antikörpern dieser Art. Nachdem die Aviditätssteigerung der Bindung des bnAK 2F5 an sein Epitope durch eine N-terminale Sequenz von gp41 beschrieben wurde (Fiebig et al., 2005), postulierten weitere Arbeitsgruppen eine Involvierung der N-terminalen gp41 Sequenz bei der Bindung und Neutralisation von HIV-1 durch 2F5 (Lorizate et al., 2006) bzw. 4E10 (Hager-Braun et al., 2006). Daraufhin wurden die KoRV-p15E basierten Hybridproteine schrittweise N-Terminal verlängert, um den Einfluss des Fusionspeptides von gp41 auf die Induktion von neutralisierenden Antikörpern zu charakterisieren (Abschnitt 3.2.1.4, Abbildung 3.28). Es konnten mit diesen Antigenen sowohl durch Proteinimmunisierung (Abbildung 3.30), als auch durch DNA-Immunsierung (Tabelle 3.6) nur gp41 bindende, aber keine HIV-1 neutralisierenden Antikörper induziert werden. Eine Bewertung dieser Studien erfolgt in Abschnitt 4.7. Die von Lorizate et al. (2006) und Hager-Braun et al. (2006) postulierten Bindungsmechanismen scheinen auch grundsätzlich im Gegensatz zu den von Fiebig et al. (2005) veröffentlichten Ergebnissen zu stehen, welche die Grundlage der Generierung der Hybridproteine in dieser Arbeit waren.

Hager-Braun et al. postulierten, dass 4E10 zuerst an das FP von gp41 bindet (Hager-Braun, 2006, Abbildung 4.2C). Im Gegensatz zu ihrem Mechanismus steht außerdem, dass die Bindung von 4E10 in der Epitopkartierung ausschließlich an sein C-terminales Epitop (WFNIT) stattfindet (Abbildung 4.1 B). Auch frühere Kartierungen des Epitopes konnten die primäre Bindung von 4E10 an das FP von gp41 nicht zeigen (Zwick et al., 2005, Cardoso et al., 2005, Brunnel et al., 2006). In einem von Lorizate et al. (2006) vorgeschlagenen Mechanismus für 2F5, bindet der Antikörper zwar an sein Epitop in der MPER, doch postulieren die Autoren, dass sich das gp41 bereits vor der Fusion zusammengeklappt unter dem gp120 befindet. Diese Struktur wird von der Interaktion des FP mit MPER (im Artikel als AIS „*amphiphatic at-interface sequence*“ bezeichnet) stabilisiert. Die Interaktionskräfte sollen zugleich die Selbstinsertion des FP in die virale

Membran verhindern. Das FP und die MPER bilden das Konformationsepitop, welches 2F5 bindet und dadurch die zusammengeklappte gp41-Präfusions-Struktur arretiert (Lorizate et al., 2006, Abbildung 4.2 B).

Ein Schwachpunkt dieser Theorie ist, dass die NHRs der gp41-Monomere innerhalb des Trimers interagieren sollen. Alle anderen Modelle gehen von einer Trimerisierung des gp41 durch die Interaktion der CHRs aus (Chan, 1998, Gallo et al., 2003). Die Interaktionskräfte der CHRs sind dabei so stark, dass sie während der Konformationsänderungen des Fusionsprozesses nicht aufgehoben werden und das Trimer nicht auseinanderdriftet. Deshalb müssten ähnlich starke Interaktionen auch für die NHRs angenommen werden. Damit wäre ein temporäres Auseinanderklappen der NHRs während der Ausrichtung des FP zur Zielzellmembran thermodynamisch unwahrscheinlich. Außerdem würde es während der Ausrichtung zur Destabilisierung der Trimers kommen, da es temporär keine Interaktionsstellen der Monomere geben könnte. Das widerspricht der Bildung der 6-Helix-Bundles nach erfolgreicher Fusion (Gallo et al., 2003, Jacobs et al., 2008).

Die Epitopkartierungen beider Antikörper zeigten keine direkte Bindung an das Fusionspeptid von gp41 (Abbildung 4.1). Daher muss man von einer primären Bindung von 2F5 und 4E10 an ihr jeweiliges in der MPER gelegenes Epitop ausgehen. Der dadurch mögliche Neutralisationsmechanismus verhindert die Ausbildung der Fusionspore an der viralen Membran während der späten Phase der Fusion (Rosny et al., 2004). In dem hier vorgeschlagenen Modell interagiert die CDR3-Schleife des Antikörpers sowohl mit der viralen Membran, als auch mit der MPER des gp41 (Abbildung 4.2 A). Kristallstrukturanalysen der an gp41 gebundenen Fab-Fragmente von 2F5 und 4E10 haben gezeigt, dass diese mit der Basis der CDR3-Schleife an ihr Epitop binden, während die distalen Bereiche der CDR3-Helix frei bleiben (Pai et al., 2000, Ofek et al., 2004, Cardoso et al., 2005). Somit wäre eine Interaktion der freien Spitze der CDR-3-Schleife mit der viralen Membran denkbar (Montero et al., 2008). Eine Folge dieser Membraninteraktion des Antikörpers in der Nähe der Transmembrandomäne von gp41 könnten die beschriebenen bindungsabhängigen Konformationsänderungen der MPER sein (Sun et al., 2008).

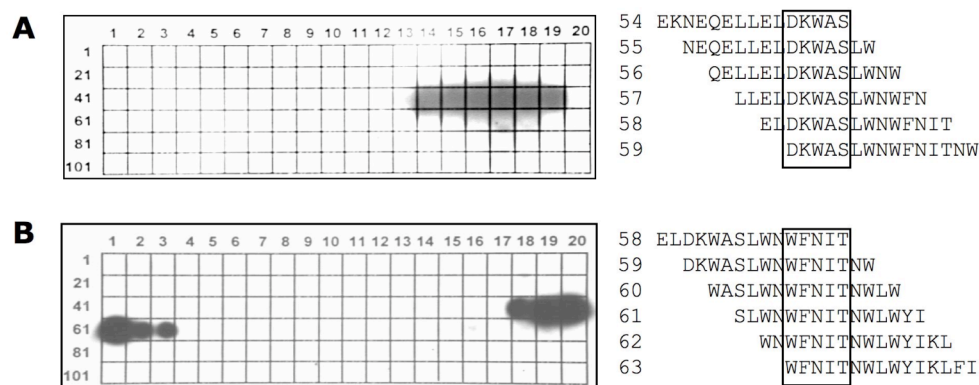


Abbildung 4.1: Epitopkartierungen der monoklonalen Antikörper 2F5 und 4E10. Es ist ausschließlich eine Bindung an die MPER von gp41 nachweisbar (Fiebig et al., 2009).

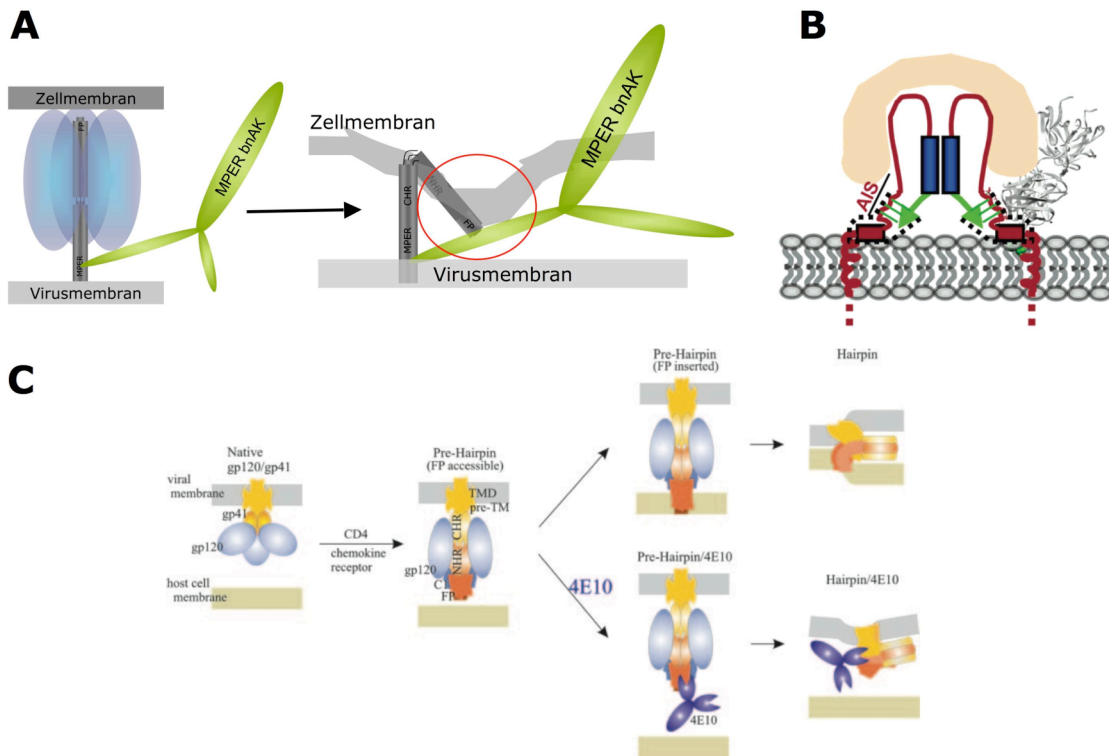


Abbildung 4.2: Vergleich der postulierten Bindungsmechanismen für 4E10 und 2F5. (A) Bindungs- und Neutralisationsmechanismus für beide MPER bnAK postuliert basierend auf ELISA-Bindungsstudien (Fiebig et al., 2005) und Epitommappings (Abbildung 4.1). Der Antikörper (grün) erkennt sein MPER-Epitop bevor sich gp120 (blau) aus dem Verband löst. Durch das anschließende Kollabieren der gp41 Struktur nach der Insertion des FP in die Zielmembran gelangt der E1 Bereich an das an die MPER gebundene Fab-Fragment des Antikörpers, welches zwischen beiden Membranen arretiert wird. Die Interaktion des Fab-Fragmentes mit den Membranen wird durch die lange, hydrophobe CD3-Schleife des Antikörpers begünstigt. Die Ausbildung des 6-Helix-Bundles kann nicht stattfinden und die Initiation der Fusionspore auf viraler Seite ist verhindert. (B) Bindungs- und Neutralisationsmechanismus von 2F5 postuliert von Lorizate et al., (2006), bei dem 2F5 an ein gp41 bindet, das bereits geklappt unter dem gp120 verborgen wird. Dabei interagiert das FP mit der AIS (=MPER). Der Antikörper arretiert dieses Intermediat und verhindert so die Insertion des FP in die Zielmembran. (C) Von Hager-Braun postulierter Bindungs- und Neutralisationsmechanismus für 4E10, bei dem der Antikörper erst an das FP von gp41 bindet, welches dadurch nicht in die Membran der Zielzelle inserieren kann (Hager-Braun et al., 2006). Erst durch das Kollabieren der gespannten gp41-Struktur bindet der Antikörper sekundär an das für ihn ursprünglich postulierte MPER-Epitop. Der CD4-Rezeptor wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

Für 2F5 und 4E10 konnte gezeigt werden, dass sie polyspezifisch mit Lipiden, insbesondere Phospholipiden reagieren (Haynes et al., 2005). Außerdem besitzen beide Antikörper die bereits erwähnte lange CDR3-Schleife, wie sie für Autoimmunantikörper charakteristisch ist. Diese Autoreaktivität der Antikörper veranlasste die Autoren zu der Annahme, dass T-Zellen, welche die vermeintlichen autoreaktiven Peptide erkennen, der klonalen Deletion (Abschnitt 1.5.2.1) unterliegen würden (Haynes et al., 2005). Antikörper von Typ 2F5 und 4E10 könnten im Organismus so nicht entstehen, bzw. deren Auftreten wäre eine Folge der Unvollkommenheit der klonalen Selektion im Thymus. Der Argumentation folgend, müsste man annehmen, dass diese Antikörper durch Immunisierung nicht zu induzieren sind. Der Test von 2F5 und 4E10 in einem klinisch zugelassenen Cardiolipin-ELISA konnte diese Daten nicht bestätigen (Scherer et al., 2007, Vcelar et al., 2007). Die Autoren zeigten unspezifische Lipidreaktionen von 4E10, argumentierten aber, dass diese nicht die Voraussetzung für die Bindung der Antikörper an ihr Epitope war. Eine neue Studie beschreibt zudem einen Antikörper, der gegen die MPER gerichtet ist und keine Polyspezifität für Autoantigene besaß (Zhang et al., 2008).

Der Antikörper m44 erkannte ein Konformationsepitop und war in der Lage 22 HIV-1 Isolate subtypenübergreifend zu neutralisieren (Zhang et al., 2008). Eine weitere Ursache für die Unterdrückung der B-Zellproliferation könnte die lokale Ausschüttung von IL-10 durch T-Zellen sein. Für Peptide abgeleitet aus der immunsuppressiven Domäne (ISU) von gp41 (Denner et al., 1996) konnte gezeigt werden, dass diese *in vitro* zu einer erhöhten Sekretion von IL-10 durch T-Lymphocyten führen. Die Präsenz von gp41 auf der Oberfläche von HIV infizierten Zellen könnte diesen Prozess auslösen und somit die Proliferation der B-Zellen IL-10 vermittelt unterbinden.

Die hier durchgeführten Versuche zur DNA-Immunisierung sollten die Hybridantigene in Zusammenhang mit der zellulären Membran, also lipidassoziiert, präsentieren (Abschnitt 3.2.2). Für das Hybridantigen UR007 wurde zunächst ein positives Ergebnis erzielt (Abbildung 3.36 A). Eine Möglichkeit den Ansatz weiter zu nutzen, wäre die Verabreichung der Hybridantigene in Liposomen. Für 2F5 und 4E10 konnte gezeigt werden, dass sie besser an ihr Epitop binden, wenn es in Liposomen präsentiert wird (Alam et al., 2008). Für 4E10 konnte eine Interaktion mit der Virusmembran nachgewiesen werden. Infolge der Arretierung des Antikörpers in der Membran, soll er die MPER in der Virusmembran drehen und sich sein Epitop so zugänglich machen (Sun et al., 2008).

Durch diese neuen Daten ergibt sich eine weitere Variable für das Antigenesdesign zur Induktion MPER-spezifischer bnAK: die Struktur der MPER selbst. Während ältere Modelle die MPER als lineares, starres β -Faltblatt proximal zur Virusmembran charakterisierten (Chan et al., 1997, Chan und Kim 1998, Gallo et al., 2003), gehen neue Modelle von einer eher dynamischen Struktur der MPER aus (Sun et al., 2008). Diese Daten wiesen sogar auf eine Umlagerung der MPER zu einer α -Helix infolge einer der Antikörperbindung hin. Die Dynamik dieses Bereiches von gp41 verkleinert das Zeitfenster zur Präsentation einer bestimmten Konformation abermals und dürfte dadurch auch zur Seltenheit der natürlichen Induktion dieser Antikörper beitragen.

Immunologisch betrachtet ist die Induktion von IgG Antikörpern gegen ein Konformationsepitop fraglich. Die einzige Möglichkeit zur direkten B-Zellaktivierung gelingt über die Stimulation der IgM-Rezeptoren unreifer B-Zellen auf dem T-zellunabhängigem Weg. Hierbei führt die Antigenbindung zur Vernetzung der B-Zellrezeptoren und zur Differenzierung der B-Zelle. Dazu sind häufig redundante Strukturen, wie die Polysachcharide auf der Oberfläche von Bakterien in der Lage. Die dadurch gereifte B-Zelle produziert nur IgM-Antikörper, macht aber keinen Wechsel der Antikörperklassen durch. Es kann sich somit auch kein immunologisches Gedächtnis (IgG) ausbilden. IgM sind eine relativ schnelle Reaktion der B-Zelle und werden in der Frühphase einer Infektion gebildet. Die T-Zellabhängige Aktivierung geschieht ebenfalls nach der Kreuzvernetzung der B-Zellrezeptoren einer jetzt reifen B-Zelle mit IgG Rezeptor durch das Antigen. Zusätzlich werden Antigene mit dem B-Zellrezeptor internalisiert. Im Proteasomen werden die aufgenommenen Antigene zu 14-15 AS kurzen Peptiden verdaut, die dann über den MHC-II Komplex auf der Oberfläche des B-Lymphocyten präsentiert werden. Eine passende T-Zelle bindet mit ihrem TZR an den MHC-II-Komplex und beginnt Cytokine zu sezernieren, welche die klonale Expansion induzieren. Es kann zur Bildung von Plasma und Gedächtniszellen kommen (Janeway, 2002). Die Differenzierung ist ein T-Zellabhängiger Prozess, welcher durch kurze lineare

Epitope in den MHC-II-Komplexen initiiert wird. Damit wäre die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses gegen Konformationsepitope nur schwer vorstellbar.

4.6 DNA Impfstoffe zur Induktion einer humoralen Immunantwort

Klassischerweise werden DNA Impfstoffe zur Induktion einer zellulären Immunantwort verwendet. Um eine humorale Immunantwort durch diese Technik zu induzieren, müssen HIV-Env-Konstrukte oder aus dem Env von HIV abgeleitete Epitope neutralisierende Antikörper dem Immunsystem präsentiert werden. In den hier durchgeführten Studien wurden Hybridproteine als DNA mittels GeneGun[®] immunisiert. Die Antigene beinhalteten die E2-Sequenz (gp41-MPER-Sequenz) und die E1-Sequenz in analoger Position im transmembranen Hüllprotein KoRV-p15E (Antigene UR013, UR014, UR015, UR030, UR031, UR032, UR036) oder PERV-p15E (UR007). Alle Hybridproteine wurden auf der Oberfläche von Zellen präsentiert. Dazu wurde die Transmembrandomäne von gp41 an alle Antigene kloniert, um den E2-Bereich mit einer möglichst nativen Dynamik (Abschnitt 4.5) und in einem nativen Abstand zur Zellmembran zu platzieren. Mittels Durchflusszytometrie (Abbildungen 3.35 und 3.38) konnte die Zugänglichkeit der Epitope *in vitro* gezeigt werden. Die erste Studie mit dem PERV-p15E basierten UR007 Hybrid lieferte viel versprechende Ergebnisse bezüglich der Virusneutralisation (Abbildung 3.36). Diese konnten in späteren Versuchen nicht reproduziert werden (Abbildung 3.39). Eine mögliche Ursache hierfür wird in Abschnitt 4.7 diskutiert.

Auch alle anderen Hybridproteine induzierten nur gp41 bindende, aber keine neutralisierenden Antikörper nach Immunisierung mit der GeneGun[®] (Abbildung 3.39, Tabelle 3.6). Das Ergebnis deckt sich mit dem Resultat einer Studie, bei der das 2F5 Epitop (genaue Sequenz LLELDKWASL) in ein gp140 Konstrukt eingebracht wurden. Immunisierungen von BALB/c Mäusen und Meerschweinchen durch Injektion zeigten zwar bindende aber keine neutralisierenden Antikörper (Liang et al., 1999). In einem Prime Boost Schema mit einem gp160/CCR5 Prime und gp41-Protein/ELDKWA-Peptid Boost konnten Devito et al. (2004) bei einer Verdünnung von 1:100 50% Neutralisation im p24-basierten Neutralisationstest messen. Reine DNA-Vakzinierung wurde in diesem Ansatz nicht getestet. In einem zu Muster et al. (1995) ähnlichem Versuchansatz, wurde das Influenza HA-Protein mit der ELDKWA Sequenz fusioniert. Es konnte durch DNA in Liposomen appliziert eine neutralisierende Immunantwort gegen den HIV-1 SF162 Pseudovirus in BALB/c Mäusen induziert werden (Ye et al., 2006). Eine subtypenübergreifende Neutralisation wurde nicht berichtet.

Alle zitierten DNA-Immunisierungsversuche wurden mittels Injektion der DNA durchgeführt oder verpackt in Liposomen appliziert. Studien zur Induktion einer protektiven humoralen Immunantwort gegen HIV mittels GeneGun[®] waren die Ausnahme. Durch die Versuche im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Applikation von DNA, trotz im Vergleich zur Proteinimmunisierung verringerter Immunogenität zur Induktion von gp41 spezifischen Antikörpern, eignet. Die fehlende Induktion neutralisierender Antikörper ist nicht der Technik geschuldet, sondern steht im Einklang mit den durch Proteinimmunisierung erzielten Ergebnissen (Abschnitt 4.4). Für die in Afrika am schlimmsten grassierende HIV-Pandemie sollte die DNA Vakzinierung als

Alternative zu herkömmlichen temperatursensitiven Impfstoffen nicht unterschätzt werden.

4.7 Mögliche Ursache für die Veränderungen der Immunantwort in Wistar Ratten

Durch Epitopkartierungen konnte gezeigt werden, dass sich die Immunantwort in den Versuchstieren während der Versuche geändert hatte (vgl. Abbildung 3.20 mit 3.40). Die ersten Epitopkartierungen zeigten ein Clustern der Epitope im E1 und im E2 Bereiche des gp41 von HIV-1 (Abbildung 3.20). ELISA-Daten der als neutralisierend klassifizierten Rattengruppen 104, 128, 130 (Abschnitt 3.2.1.2) und 126 (Abschnitt 3.2.2.1) zeigten eine im Vergleich zu E1 starke oder zumindest äquivalente Immunantwort gegen den E2 Bereich von gp41 (Tabelle 3.3). Die Seren der Reproduktionsgruppen zeigten dagegen im ELISA nur eine sehr schwache E2-Reaktion und keine Neutralisation von HIV-1 Ba-L (Tabelle 3.7). Durch Epitopkartierungen konnte gezeigt werden, dass sich die Hauptimmunantwort auf die IDO der KoRV-p15E-Backbones und den E1 Bereich von HIV-1 verschoben hat (Abbildung 3.40, Anhang A-VI). Naive Ratten aus diesen Studien reagierten ebenfalls im Western Blot mit KoRV-p15E (Abbildung 3.42). Nachdem die Überprüfung der Gesundheitszeugnisse eine Infektion der Tiere mit *Pasteurella pneumotropica* ergab, wurde getestet, ob die Infektion zur Aktivierung endogener Sequenzen in den Ratten führen konnte. Für das Toxin der Pasteurellen ist beschrieben, dass es verschiedene Signalwege in der Zelle anschalten kann (Orth et al., 2007).

Hier konnte erstmals gezeigt werden, dass es *in vitro* zu einer spezifischen Aktivierung des endogenen Ratten Leukämievirus (RaLV) in primären Tumorzellen aus Ratten oder Rattenzelllinien durch Inkubation mit dem Toxin von Pasteurellen (PMT) kommt (Abbildung 3.44). Zusätzlich wurde gezeigt, dass gefällte Proteine aus den im Versuch verwendeten Ratten isolierter Pasteurellenkulturen ebenfalls zur Aktivierung der RaLV-Env Expression *in vitro* führen (Abbildung 3.45). Die Kreuzreaktivität der eigentlich naiven Seren (Abbildung 3.42) könnte durch die enge Verwandtschaft der Aminosäuresequenzen erklärt werden (Abbildung 3.43), da die Ratten nach der Aktivierung von RaLV Antikörper gegen das RaLV-p15E gebildet haben könnten. Ein weiteres Indiz für die Aktivierung einen endogenen Retrovirus ist die zusätzliche Clusterung der Antikörper aus den mit KoRV Hybrid immunisierten Tieren in der IDO des p15E. IDO bindende Antikörper treten hauptsächlich während der Infektion auf (Abbildung 3.35 C für KoRV Infektion), nicht aber durch Immunisierung mit TM-Proteinen in naiven Tieren (Abbildung 3.40 A). Diese Clusterung der Antikörper ist auch für die HIV-Infektion bekannt. Cluster I Antikörper richten sich gegen die IDO von gp41 und sind im Vergleich zu den gegen die NHR bzw. CHR gerichteten Cluster II Antikörpern überrepräsentiert (Cotropia et al., 1996). Antikörper gegen das FP oder die MPER sind die Ausnahme (Montero et al., 2008).

Ein möglicher Einfluss auf die durchgeführten Versuche könnte wie folgt skizziert werden: In den Ratten könnte es durch die Infektion mit Pasteurellen und der sich daraus ergebenden RaLV-Env Expression zur Induktion von kreuzreagierenden Antikörpern gegen das KoRV-Hybridbackbone gekommen sein. Daraus würden sich zwei mögliche Interferenzen mit den zuletzt durchgeführten Immunisierungsstudien ergeben:

1. Bereits gegen die IDO gerichtete B-Zellen sind in den Ratten vorhanden und werden durch die Immunisierung nur geboostet. Die Hauptantikörperantwort des Organismus richtet sich daher gegen die IDO, um das fremde Agens abzuwehren. Es kommt nur noch zu einer schwachen Antwort gegen die flankierenden N- und C-terminalen Bereiche. Der N-terminale Bereich trägt durch die höhere Hydrophobizität des Fuionspeptides eher zur Vernetzung von B-Zell-Rezeptoren bei. Somit entstehen mehr E1 Antikörper als E2 Antikörper. Die gp41 spezifische Immunantwort fiel dadurch insgesamt schwächer aus als in den ersten Versuchen (Tabelle 3.7 und Tabelle 3.8). Ein weiteres Indiz dafür sind die im Abschnitt 3.2.1.5 durchgeführten Versuche. Hier wurden die Positionen der E1 und E2 Epitope im Hybridprotein vertauscht. Trotzdem war E1-spezifische Reaktion der Rattenserum im ELISA stärker als die E2-spezifische Reaktion (Abbildung 3.32).

2. Als Folge des Boosts der kreuzreaktiven Antikörper kommt es zu Bildung von Immunkomplexen, in welchen die Epitope E1 und E2 nicht mehr voll zugänglich sind. Ein Hinweis auf eine Interferenz mit der Prädominanz der kreuzreagierenden IDO Antikörper lieferte die Immunisierung mit gp36 von HIV-2 (Abschnitt 3.2.3.3). Das gp36 zeigt keine Verwandtschaft mit der Aminosäuresequenz von KoRV-p15 oder RaLV-p15E. Eine Interferenz der humoralen Immunantworten dieser Proteine ist deshalb unwahrscheinlich. Eine Epitopkartierung der durch Immunisierung mit gp36 generierten Antiseren zeigte hier die Induktion von MPER spezifischen Antikörpern in allen vier Ratten (Abbildung 3.46 B). Weder HIV-2 60415K noch HIV-2 7312A konnte durch die induzierten gp36 spezifischen Immunsereen neutralisiert werden (Abbildung 3.46 C). Es konnte hier ebenfalls keine Reaktion dieser Seren gegen den E1 Bereich des gp36 von HIV-2 detektiert werden. Die Kartierung dieses Antiserums gleicht der Kartierung der Epitope der Antikörper 2F5 und 4E10 auf der korrespondierenden gp41 Membran (Abbildung 4.1). Dass trotz fast analoger Epitope die gp36-spezifischen Rattenserum kein Neutralisationspotential besitzen, unterstreicht die Komplexität der Vorgänge bei der Induktion von MPER spezifischen neutralisierenden Antikörpern.

Eine weitere RaLV-unabhängige Ursache für die Veränderung der Immunantwort können die ungeklärten Konformationsverhältnisse der Antigene sein. Kristallisationsversuche von Kooperationspartnern scheiterten bisher aufgrund der starken Hydrophobizität der Hybridantigene. Selbst das mit einem 6xHis-Tag versehene UR038 Antigen war nur unter der Verwendung von 8 M Harnstoff in Lösung zu bringen und affinitätschromatographisch zu reinigen (Abschnitt 3.2.1.6). Bei der Entwicklung der Hybridantigene konnte nicht auf eine ganzheitliche Kristallstruktur von gp41 zurückgegriffen werden. Bisher veröffentlichte Strukturen der Ektodomäne wurden ohne FP oder IDO erstellt, bzw. haben Deletionen in der MPER (Chan et al., 1997, Tan et al., 1997, Weissenhorn et al., 1997). Daher ist die Ausrichtung der an der Neutralisation beteiligten Epitope zueinander nicht eindeutig geklärt. Eine zufällige Induktion der neutralisierenden Antikörper durch UR004 (Abschnitt 3.2.1.2) oder UR007 (Abschnitt 3.2.2.1) kann somit nicht ausgeschlossen werden. Solange die Struktur von gp41 nicht vollständig geklärt ist, werden diese „Try and Error“ Studien der einzige Weg zur Induktion von gp41 MPER spezifischen bnAK bleiben (Montero et al., 2008).

4.8 Die Herausforderung: HIV-Impfstoffentwicklung

Alle klassischen Versuche ein HIV-Vakzin zu entwickeln sind bisher gescheitert. Es ist immer noch nicht geklärt, welche Komponenten ein möglicher Impfstoff enthalten muss, um gegen die Variabilität des HI-Virus zu bestehen. Eine der vielversprechendsten Studien, die bereits in der klinischen Phase 2b war, wurde 2007 von der Firma Merck & Co Inc. und dem NIH abgebrochen. Der an 3000 Personen getestete trivalente, nicht replizierende Impfstoff MRKAd5 basierte auf dem Humanen Adenovirus 5 und sollte eine CTL-Antwort gegen die HIV-Proteine Gag, Pol und Nef induzieren (Bayés et al., 2005). Nachdem in der Impfgruppe die Zahl an HIV-Neuinfektionen die der Placebogruppe überstieg, musste die Studie beendet werden. Ein Grund hierfür war die Reaktion des Immunsystems auf das eindringende Vektorvirus, was eine Rekrutierung von CD4⁺-Zellen an die Schleimhäute zur Folge hatte (Ledford H, 2007, 2008). Dadurch waren in den Geimpften lokal mehr HIV-Zielzellen vorhanden, als in der Placebogruppe. Neben der bekannten Präimmunität gegen Adenoviren in der Bevölkerung (Vlachaki et al., 2002), muss auch dieser Fakt bei der Wahl von Vektoren zum Gen- bzw. Vakzintransfer berücksichtigt werden.

Trotzdem könnte nach sorgfältiger Überprüfung und Rekonstruktion der Ereignisse dieser Studie auf Adenovirusisolate zurückgegriffen werden, gegen die nur eine geringe Präimmunität in der Bevölkerung herrscht. Das hAD35 wäre eine mögliche Option (Nakashima et al., 2008, Sakurai et al., 2008). Eine effektiven Prävention und Kontrolle der HIV Infektion erfordert sowohl eine humorale als auch ein zelluläre Immunantwort (Moore und Hutchings, 2007, Hinkula et al., 2007, Fauci et al., 2007). Aus diesem Grund sollten in zukünftigen klinischen Studien beide Immunantworten berücksichtigt werden. Da es eine negative Korrelation zwischen Effektivität und Sicherheit eines Impfstoffes gibt (Abbildung 4.3) und klassische, sichere Ansätze nicht greifen, muss vor allem die Diskussion über die Verschiebung von Sicherheitsrichtlinien für einen HIV-Impfstoff neu geführt werden.

Ein möglicher Ansatz wäre der Einsatz von replizierenden bzw. persistierenden Viren zum Transfer therapeutischer Gene oder von Impfstoffen. Ein Dialog zwischen Wissenschaft und Gesellschaft muss zu Stande kommen, um Aufklärungsarbeit in beide Richtungen zu leisten. Angesichts von 20 Jahren, gemessen am Ergebnis, erfolgloser Impfstoffentwicklung für HIV wird eine gemeinsame Anstrengung erforderlich sein, die zur Verfügung stehenden Möglichkeiten zur Eindämmung der HIV-Pandemie zu nutzen.

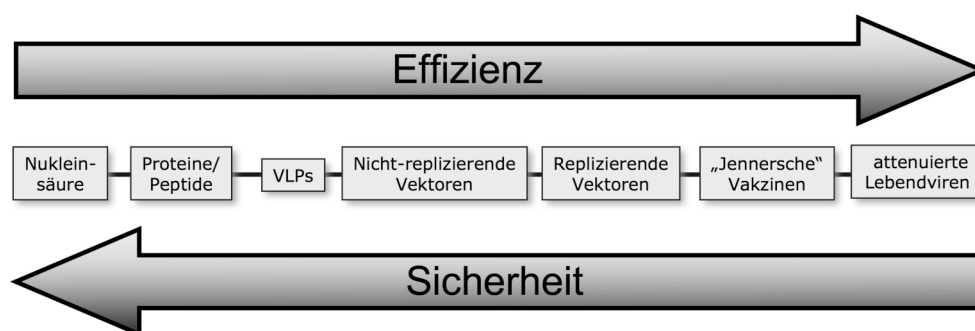


Abbildung 4.3: Negativer Zusammenhang zwischen Effektivität und Sicherheit einer möglichen HIV-Vakzine (Steve Norley, RKI Berlin)

5. Zusammenfassung

Die Entwicklung eines effektiven HIV-Impfstoffes ist bis heute nicht gelungen. Konventionelle Immunisierungsstrategien mit rekombinant hergestellten Hüllproteinen des Virus sowie deren Präsentation in verschiedensten Formen induzierten keine subtypenübergreifende, protektive Immunantwort gegen HIV.

Die Gewinnung und Charakterisierung der gp41-spezifischen breit neutralisierenden monoklonalen Antikörper 2F5 und 4E10 bildete die Grundlage einer Reihe neuer epitopgerichteter Ansätze für die HIV-Impfstoffentwicklung. Bisherige Immunisierungsstudien basierten auf der Verwendung des linearen Hauptepitopes (E2) der beiden Antikörper aus dem C-terminalen Teil der Ektodomäne von gp41. Nach neueren Erkenntnissen, reicht für eine effektive Neutralisation durch 2F5 oder 4E10 die Bindung dieser Antikörper an ihr lineares Epitop in der membranahen externen Region (MPER) von gp41 allein nicht aus. Vielmehr wurde die Beteiligung einer N-terminalen Domäne (E1) von gp41 an der neutralisationsaktiven Bindung von 2F5 bzw. 4E10 postuliert.

In dieser Arbeit wurden die beiden an der Neutralisation durch 2F5 und 4E10 beteiligten Epitopbereiche E1 und E2 des gp41 erstmals in das strukturell verwandte transmembrane Hüllprotein des Koala Retrovirus (KoRV) eingebracht. Die Applikation der hergestellten Antigene erfolgte sowohl in Form der codierenden DNA mittels ballistischer Immunisierung (GeneGun®) als auch durch bakteriell exprimierte Proteine. Mit beiden Strategien konnten für drei Hybridproteine in den ersten Studien eine HIV-1 gp41 spezifische, breit neutralisierende humorale Immunantwort im Rattenmodell induziert werden.

Diese Ergebnisse konnten jedoch in späteren Studien weder durch Proteinimmunisierung, noch durch die DNA-Immunisierung mit der GeneGun® reproduziert werden. Die Analyse der induzierten Immunantworten beider Versuchsreihen zeigte eine Verlagerung der Hauptimmunantwort auf die nicht HIV-1 spezifischen Bereiche des Trägerproteins. Es wurde eine bakterielle Fremdinfection der Versuchstiere als eine Ursache dieses Phänomens festgestellt.

Dennoch stellen die generierten Hybridproteine einen wertvollen und innovativen Ansatz eines epitopgerichteten HIV-Vakzins dar. Die DNA-Immunisierung mittels GeneGun® konnte als geeignete Methode zur Präsentation membranständiger Antigene und zur epitopgerichteten Induktion einer humoralen Immunantwort etabliert werden.

Zur Evaluierung der Immunisierungsstudien wurde ein neuartiger real time PCR basierter *in vitro* Neutralisationstest um Kontrollen zur Virusspezifität und Cytotoxizität erweitert.

6. Literatur

Adachi A, Gendelman HE, Koenig S, Folks T, Willey R, Rabson A, Martin MA. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol* 59:284-291, 1986

Alam SM, Scarce RM, Parks RJ, Plonk K, Plonk SG, Sutherland LL, Gorny MK, Zolla-Pazner S, Vanleeuwen S, Moody MA, Xia SM, Montefiori DC, Tomaras GD, Weinhold KJ, Karim SA, Hicks CB, Liao HX, Robinson J, Shaw GM, Haynes BF. Human immunodeficiency virus type 1 gp41 antibodies that mask membrane proximal region epitopes: antibody binding kinetics, induction, and potential for regulation in acute infection. *J Virol*. 2008 Jan;82(1):115-25.

Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science*. 1996 Jun 28;272(5270):1955-8

Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*. 1996 Oct 4;274(5284):94-6. Erratum in: *Science* 1998 Jun19; 280(5371):1821

Anand AR, Ganju RK. HIV-1 gp120-mediated apoptosis of T cells is regulated by the membrane tyrosine phosphatase CD45. *J Biol Chem*. 2006 May 5;281(18):12289-99.

Andersson J, Boasso A, Nilsson J, Zhang R, Shire NJ, Lindback S, Shearer GM, Chougnet CA. The prevalence of regulatory T cells in lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients. *J Immunol*. 2005 Mar 15;174(6):3143-7.

Antons AK, Wang R, Oswald-Richter K, Tseng M, Arendt CW, Kalams SA, Unutmaz D. Naive precursors of human regulatory T cells require FoxP3 for suppression and are susceptible to HIV infection. *J Immunol*. 2008 Jan 15;180(2):764-73

Armbruster C, Stiegler GM, Vcelar BA, Jäger W, Köller U, Jilch R, Ammann CG, Pruenster M, Stoiber H, Katinger HW. Passive immunization with the anti-HIV-1 human monoclonal antibody (hMAb) 4E10 and the hMAb combination 4E10/2F5/2G12. *J Antimicrob Chemother*. 2004 Nov;54(5):915-20. Epub 2004 Sep 29.

Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983 May 20;220(4599):868-71

- Bayés M, Rabasseda X, Prous JR.
Gateways to clinical trials.
Methods Find Exp Clin Pharmacol. 2005 Jun;27(5):331-72.
- Behrendt R.
Immunsuppressive Eigenschaften transmembraner Hüllproteine von Retroviren.
2005
- Bellamy-McIntyre AK, Lay CS, Baär S, Maerz AL, Talbo GH, Drummer HE, Pombourios P.
Functional links between the fusion peptide-proximal polar segment and membrane-proximal region of human immunodeficiency virus gp41 in distinct phases of membrane fusion.
J Biol Chem. 2007 Aug 10;282(32):23104-16.
- Beneduce F, Kusov Y, Klinger M, Gauss-Muller V, Morace G.
Chimeric hepatitis A virus particles presenting a foreign epitope (HIV gp41) at their surface.
Antiviral Res. 2002 Aug;55(2):369-77
- Benit L, Dessen P, Heidmann T.
Identification, phylogeny, and evolution of retroviral elements based on their envelope genes.
J Virol. 2001 Dec;75(23):11709-19
- Berger EA, Murphy PM, Farber JM.
Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease.
Annu Rev Immunol. 1999;17:657-700
- Binley JM, Cayanan CS, Wiley C, Schülke N, Olson WC, Burton DR.
Redox-triggered infection by disulfide-shackled human immunodeficiency virus type 1 pseudovirions.
J Virol. 2003 May;77(10):5678-84
- Binley JM, Wrin T, Korber B, Zwick MB, Wang M, Chappey C, Stiegler G, Kunert R, Zolla-Pazner S, Katinger H, Petropoulos CJ, Burton DR.
Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies.
J Virol. 2004 Dec;78(23):13232-52.
- Blond JL, Lavillette D, Cheynet V, Bouton O, Oriol G, Chapel-Fernandes S, Mandrand B, Mallet F, Cosset FL.
An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor.
J Virol. 2000 Apr;74(7):3321-9
- Bouschbacher M, Bomsel M, Verronèse E, Gofflo S, Ganor Y, Dezutter-Dambuyant C, Valladeau J.
Early events in HIV transmission through a human reconstructed vaginal mucosa.
AIDS. 2008 Jul 11;22(11):1257-66.
- Broliden PA, von Gegerfelt A, Clapham P, Rosen J, Fenyö EM, Wahren B, Broliden K.
Identification of human neutralization-inducing regions of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Jan 15;89(2):461-5.

- Brown F.
Human immunodeficiency virus.
Science. 1986 Jun 20;232(4757):1486
- Brunel FM, Zwick MB, Cardoso RM, Nelson JD, Wilson IA, Burton DR, Dawson PE.
Structure-function analysis of the epitope for 4E10, a broadly neutralizing human immunodeficiency virus type 1 antibody.
J Virol. 2006 Feb;80(4):1680-7.
- Buchacher A, Predl R, Strutzenberger K, Steinfellner W, Trkola A, Purtscher M, Gruber G, Tauer C, Steindl F, Jungbauer A, et al.
Generation of human monoclonal antibodies against HIV-1 proteins; electrofusion and Epstein-Barr virus transformation for peripheral blood lymphocyte immortalization.
AIDS Res Hum Retroviruses. 1994 Apr;10(4):359-69
- Bures R, Gaitan A, Zhu T, Graziosi C, McGrath KM, Tartaglia J, Caudrelier P, El Habib R, Klein M, Lazzarin A, Stablein DM, Deers M, Corey L, Greenberg ML, Schwartz DH, Montefiori DC.
Immunization with recombinant canarypox vectors expressing membrane-anchored glycoprotein 120 followed by glycoprotein 160 boosting fails to generate antibodies that neutralize R5 primary isolates of human immunodeficiency virus type 1.
AIDS Res Hum Retroviruses. 2000 Dec 10;16(18):2019-35.
- Calarese DA, Scanlan CN, Zwick MB, Deechongkit S, Mimura Y, Kunert R, Zhu P, Wormald MR, Stanfield RL, Roux KH, Kelly JW, Rudd PM, Dwek RA, Katinger H, Burton DR, Wilson IA.
Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition.
Science. 2003 Jun 27;300(5628):2065-71
- Cardoso RM, Zwick MB, Stanfield RL, Kunert R, Binley JM, Katinger H, Burton DR, Wilson IA.
Broadly neutralizing anti-HIV antibody 4E10 recognizes a helical conformation of a highly conserved fusion-associated motif in gp41.
Immunity. 2005 Feb;22(2):163-73.
- Cecilia D, KewalRamani VN, O'Leary J, Volsky B, Nyambi P, Burda S, Xu S, Littman DR, Zolla-Pazner S.
Neutralization profiles of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates in the context of coreceptor usage.
J Virol. 1998 Sep;72(9):6988-96.
- Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS.
Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein.
Cell. 1997 Apr 18;89(2):263-73.
- Chan DC, Kim PS.
HIV entry and its inhibition.
Cell. 1998 May 29;93(5):681-4. Review.
- Chen YH, Wu W, Yang J, Sui SF, Sun J, Dierich MP.
Antibodies against human IFN-alpha and -beta recognized the immunosuppressive domain of HIV-1 gp41 and inhibit gp41-binding to the putative cellular receptor protein p45.
Immunol Lett. 1999 Aug 3;69(2):253-7.

Cianciolo G.J., Copeland T.D., Oroszlan S., Snyderman R.: Inhibition of lymphocyte proliferation by a synthetic peptide homologous to retroviral envelope proteins.
Science. 1985 Oct 25;230(4724):453-5.

Clerici M., Stocks N.I., Zajac R.A., Boswell R.N., Lucey D.R., Via C.S., Shearer G.M.
Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive patients. Independence of CD4+ cell numbers and clinical staging.
J Clin Invest. 1989 Dec;84(6):1892-9.

Cobbold S., Waldmann H.
Infectious tolerance.
Curr Opin Immunol. 1998 Oct;10(5):518-24.

Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P.
Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells.
Science. 1995 Dec 15;270(5243):1811-5

Coëffier E, Clément JM, Cussac V, Khodaei-Boorane N, Jehanno M, Rojas M, Dridi A, Latour M, El Habib R, Barré-Sinoussi F, Hofnung M, Leclerc C.
Antigenicity and immunogenicity of the HIV-1 gp41 epitope ELDKWA inserted into permissive sites of the MalE protein.
Vaccine. 2000 Nov 22;19(7-8):684-93.

Collette Y, Chang HL, Cerdan C, Chambost H, Algarte M, Mawas C, Imbert J, Burny A, Olive D.
Specific Th1 cytokine down-regulation associated with primary clinically derived human immunodeficiency virus type 1 Nef gene-induced expression.
J Immunol. 1996 Jan 1;156(1):360-70.

Conley AJ, Kessler JA 2nd, Boots LJ, Tung JS, Arnold BA, Keller PM, Shaw AR, Emini EA.
Neutralization of divergent human immunodeficiency virus type 1 variants and primary isolates by IAM-41-2F5, an anti-gp41 human monoclonal antibody.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Apr 12;91(8):3348-52

Copeland KF, McKay PJ, Rosenthal KL.
Suppression of activation of the human immunodeficiency virus long terminal repeat by CD8+ T cells is not lentivirus specific.
AIDS Res Hum Retroviruses. 1995 Nov;11(11):1321-6

Cotropia J, Ugen KE, Kliks S, Broliden K, Broliden PA, Hoxie JA, Srikantan V, Williams WV, Weiner DB.
A human monoclonal antibody to HIV-1 gp41 with neutralizing activity against diverse laboratory isolates.
J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 1996 Jul;12(3):221-32.

Crooks ET, Moore PL, Richman D, Robinson J, Crooks JA, Franti M, Schülke N, Binley JM.
Characterizing anti-HIV monoclonal antibodies and immune sera by defining the mechanism of neutralization.
Hum Antibodies. 2005;14(3-4):101-13.

- Daar ES, Li XL, Moudgil T, Ho DD.
High concentrations of recombinant soluble CD4 are required to neutralize primary human immunodeficiency virus type 1 isolates.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Sep;87(17):6574-8
- De Rocquigny H, Gabus C, Vincent A, Fournié-Zaluski MC, Roques B, Darlix JL.
Viral RNA annealing activities of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein require only peptide domains outside the zinc fingers.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Jul 15;89(14):6472-6.
- de Rosny E, Vassell R, Jiang S, Kunert R, Weiss CD.
Binding of the 2F5 monoclonal antibody to native and fusion-intermediate forms of human immunodeficiency virus type 1 gp41: implications for fusion-inducing conformational changes.
J Virol. 2004 Mar;78(5):2627-31.
- Decroix N, Hocini H, Quan CP, Bellon B, Kazatchkine MD, Bouvet JP.
Induction in mucosa of IgG and IgA antibodies against parenterally administered soluble immunogens.
Scand J Immunol. 2001 Apr;53(4):401-9.
- Denner J, Norley S, Kurth R.
The immunosuppressive peptide of HIV-1: functional domains and immune response in AIDS patients.
AIDS. 1994 Aug;8(8):1063-72.
- Denner J, Persin C, Vogel T, Hausteiner D, Norley S, Kurth R.
The immunosuppressive peptide of HIV-1 inhibits T and B lymphocyte stimulation.
J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 1996 Aug 15;12(5):442-50.
- Devito C, Hejdeman B, Albert J, Broliden K, Hinkula J.
Antiretroviral therapy does not induce HIV type 1-specific neutralizing activity against autologous HIV type 1 isolates.
AIDS Res Hum Retroviruses. 2006 Sep;22(9):908-11.
- Devito C, Zuber B, Schröder U, Benthin R, Okuda K, Broliden K, Wahren B, Hinkula J.
Intranasal HIV-1-gp160-DNA/gp41 peptide prime-boost immunization regimen in mice results in long-term HIV-1 neutralizing humoral mucosal and systemic immunity.
J Immunol. 2004 Dec 1;173(11):7078-89.
- Dianzani F, Antonelli G, Riva E, Turriziani O, Antonelli L, Tyring S, Carrasco DA, Lee H, Nguyen D, Pan J, Poast J, Cloyd M, Baron S.
Is human immunodeficiency virus RNA load composed of neutralized immune complexes?
J Infect Dis. 2002 Apr 15;185(8):1051-4.
- DiMartino SJ, Yuan W, Redecha P, Ivashkiv LB, Salmon JE.
Insoluble immune complexes are most effective at triggering IL-10 production in human monocytes and synergize with TLR ligands and C5a.
Clin Immunol. 2008 Apr;127(1):56-65.

Doria-Rose NA, Learn GH, Rodrigo AG, Nickle DC, Li F, Mahalanabis M, Hensel MT, McLaughlin S, Edmonson PF, Montefiori D, Barnett SW, Haigwood NL, Mullins JI. Human immunodeficiency virus type 1 subtype B ancestral envelope protein is functional and elicits neutralizing antibodies in rabbits similar to those elicited by a circulating subtype B envelope.

J Virol. 2005 Sep;79(17):11214-24.

Dubay JW, Roberts SJ, Hahn BH, Hunter E.

Truncation of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein cytoplasmic domain blocks virus infectivity.

J Virol. 1992 Nov;66(11):6616-25

Eckhart L, Raffelsberger W, Ferko B, Klima A, Purtscher M, Katinger H, R ker F. Immunogenic presentation of a conserved gp41 epitope of human immunodeficiency virus type 1 on recombinant surface antigen of hepatitis B virus.

J Gen Virol. 1996 Sep;77 (Pt 9):2001-8.

Eick A., Larned J., Jason J.: Effects of HIV-1 peptides on T-cell receptor variable beta chain families.

Hum Immunol. 2000 Oct;61(10):993-1000.

Ernst W, Grabherr R, Wegner D, Borth N, Grassauer A, Katinger H.

Baculovirus surface display: construction and screening of a eukaryotic epitope library.

Nucleic Acids Res. 1998 Apr 1;26(7):1718-23

Evans DT, Desrosiers RC.

Immune evasion strategies of the primate lentiviruses.

Immunol Rev. 2001 Oct;183:141-58

Faith A, O'Hehir RE, Malkovsky M, Lamb JR.

Analysis of the basis of resistance and susceptibility of CD4+ T cells to human immunodeficiency virus (HIV)-gp120 induced anergy.

Immunology. 1992 Jun;76(2):177-84.

Fauci AS.

25 years of HIV/AIDS science: reaching the poor with research advances.

Cell. 2007 Nov 2;131(3):429-32.

Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA.

HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor.

Science. 1996 May 10;272(5263):872-7

Ferns RB, Garson JA.

Development and evaluation of a real-time RT-PCR assay for quantification of cell-free human immunodeficiency virus type 2 using a Brome Mosaic Virus internal control.

J Virol Methods. 2006 Jul;135(1):102-8.

Ferrantelli F, Kitabwalla M, Rasmussen RA, Cao C, Chou TC, Katinger H, Stiegler G, Cavacini LA, Bai Y, Cotropia J, Ugen KE, Ruprecht RM.

Potent cross-group neutralization of primary human immunodeficiency virus isolates with monoclonal antibodies--implications for acquired immunodeficiency syndrome vaccine.

J Infect Dis. 2004 Jan 1;189(1):71-4.

- Fiebig U, Eschricht M, Schmolke M, Kurth R, Denner J. Mode of interaction between the HIV-1 neutralizing monoclonal antibody 2F5 and its epitope. *AIDS*, 2009, in press
- Fiebig U, Hartmann MG, Bannert N, Kurth R, Denner J. Transspecies transmission of the endogenous koala retrovirus. *J Virol*. 2006 Jun;80(11):5651-4.
- Fiebig U, Schmolke M, Karlas A, Kurth R, Denner J. Induction of antiviral neutralizing antibodies in humans and animals. 2005, WO2005021574
- Fiebig U, Stephan O, Kurth R, Denner J. Neutralizing antibodies against conserved domains of p15E of porcine endogenous retroviruses: basis for a vaccine for xenotransplantation? *Virology*. 2003 Mar 15;307(2):406-13.
- Fiebig U. Induktion neutralisierender Antikörper gegen transmembrane Hüllproteine von Retroviren. 2008
- Finnegan CM, Berg W, Lewis GK, DeVico AL. Antigenic properties of the human immunodeficiency virus envelope during cell-cell fusion. *J Virol*. 2001 Nov;75(22):11096-105.
- Freed EO, Martin MA. The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection. *J Biol Chem*. 1995 Oct 13;270(41):23883-6
- 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 Jun;87(12):4650-4
- Furuta RA, Wild CT, Weng Y, Weiss CD. Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41. *Nat Struct Biol*. 1998 Apr;5(4):276-9. Erratum in: *Nat Struct Biol* 1998 Jul;5(7):612
- Gallagher WR, Ball JM, Garry RF, Griffin MC, Montelaro RC. A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1989 Aug;5(4):431-40
- Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*. 1984 May 4;224(4648):500-3.
- Gallo SA, Finnegan CM, Viard M, Raviv Y, Dimitrov A, Rawat SS, Puri A, Durell S, Blumenthal R. The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Jul 11;1614(1):36-50. Review.

- Garba M.L., Pilcher C.D., Bingham A.L., Eron J., Frelinger J.A.
HIV antigens can induce TGF-beta(1)-producing immunoregulatory CD8+ T cells.
J Immunol. 2002 Mar 1;168(5):2247-54.
- Garred P, Madsen HO, Balslev U, Hofmann B, Pedersen C, Gerstoft J, Svejgaard A.
Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles
of mannose-binding lectin.
Lancet. 1997 Jan 25;349(9047):236-40.
- Garrity RR, Rimmelzwaan G, Minassian A, Tsai WP, Lin G, de Jong JJ, Goudsmit J,
Nara PL.
Refocusing neutralizing antibody response by targeted dampening of an
immunodominant epitope.
J Immunol. 1997 Jul 1;159(1):279-89.
- Gaschen B, Taylor J, Yusim K, Foley B, Gao F, Lang D, Novitsky V, Haynes B,
Hahn BH, Bhattacharya T, Korber B. Diversity considerations in HIV-1 vaccine
selection. *Science.* 2002 Jun 28;296(5577):2354-60.
- Gheysen D, Jacobs E, de Foresta F, Thiriart C, Francotte M, Thines D, De Wilde M.
Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from
recombinant baculovirus-infected insect cells.
Cell. 1989 Oct 6;59(1):103-12
- Greenough TC, Brettler DB, Somasundaran M, Panicali DL, Sullivan JL.
Human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL),
virus load, and CD4 T cell loss: evidence supporting a protective role for CTL in
vivo.
J Infect Dis. 1997 Jul;176(1):118-25
- Gueudin M, Damond F, Braun J, Taïeb A, Lemée V, Plantier JC, Chêne G, Matheron
S, Brun-Vézinet F, Simon F.
Differences in proviral DNA load between HIV-1- and HIV-2-infected patients.
AIDS. 2008 Jan 11;22(2):211-5.
- Hager-Braun C, Katinger H, Tomer KB.
The HIV-neutralizing monoclonal antibody 4E10 recognizes N-terminal sequences
on the native antigen.
J Immunol. 2006 Jun 15;176(12):7471-81.
- Harada S, Purtilo DT, Koyanagi Y, Sonnabend J, Yamamoto N.
Sensitive assay for neutralizing antibodies against AIDS-related viruses (HTLV-
III/LAV).
J Immunol Methods. 1986 Sep 27;92(2):177-81.
- Harada S, Yamamoto N.
Quantitative analysis of AIDS-related virus-carrying cells by plaque-forming assay
using an HTLV-I-positive MT-4 cell line.
Jpn J Cancer Res. 1985 Jun;76(6):432-5.
- Harrer T, Harrer E, Kalams SA, Elbeik T, Staprans SI, Feinberg MB, Cao Y, Ho DD,
Yilma T, Caliendo AM, Johnson RP, Buchbinder SP, Walker BD.
Strong cytotoxic T cell and weak neutralizing antibody responses in a subset of
persons with stable nonprogressing HIV type 1 infection.
AIDS Res Hum Retroviruses. 1996 May 1;12(7):585-92

Hartley O, Klasse PJ, Sattentau QJ, Moore JP.

V3: HIV's switch-hitter.

AIDS Res Hum Retroviruses. 2005 Feb;21(2):171-89. Review.

Haynes BF, Fleming J, St Clair EW, Katinger H, Stiegler G, Kunert R, Robinson J,

Scarce RM, Plonk K, Staats HF, Ortel TL, Liao HX, Alam SM.

Cardiolipin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies.

Science. 2005 Jun 24;308(5730):1906-8.

Hazenberg MD, Hamann D, Schuitemaker H, Miedema F.

T cell depletion in HIV-1 infection: how CD4+ T cells go out of stock.

Nat Immunol. 2000 Oct;1(4):285-9. Review.

Hinkula J.

Clarification of how HIV-1 DNA and protein immunizations may be better used to obtain HIV-1-specific mucosal and systemic immunity.

Expert Rev Vaccines. 2007 Apr;6(2):203-12. Review.

Hunter E, 1997

gp41, A Multifunctional Protein Involved in HIV Entry and Pathogenesis

Hwang SS, Boyle TJ, Lyerly HK, Cullen BR.

Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1.

Science. 1991 Jul 5;253(5015):71-4

Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M, Immunologie. 5. Auflage,

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2002, ISBN 3-82-741079-7

Jones PL, Korte T, Blumenthal R.

Conformational changes in cell surface HIV-1 envelope glycoproteins are triggered by cooperation between cell

surface CD4 and co-receptors.

J Biol Chem. 1998 Jan 2;273(1):404-9

Kim M, Qiao Z, Yu J, Montefiori D, Reinherz EL.

Immunogenicity of recombinant human immunodeficiency virus type 1-like particles expressing gp41 derivatives in a pre-fusion state.

Vaccine. 2007 Jun 28;25(27):5102-14.

Kitabwalla M, Ferrantelli F, Wang T, Chalmers A, Katinger H, Stiegler G, Cavacini LA, Chou TC, Ruprecht RM.

Primary African HIV clade A and D isolates: effective cross-clade neutralization with a quadruple combination of human monoclonal antibodies raised against clade B.

AIDS Res Hum Retroviruses. 2003 Feb;19(2):125-31

Kliger Y, Gallo SA, Peisajovich SG, Munoz-Barroso I, Avkin S, Blumenthal R, Shai Y.

Mode of action of an antiviral peptide from HIV-1. Inhibition at a post-lipid mixing stage.

J Biol Chem. 2001 Jan 12;276(2):1391-7

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.

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

Virology. 2006 Jul 20;351(1):133-44.

Kusov YY, Zamjatina NA, Poleschuk VF, Michailov MI, Morace G, Eberle J, Gauss-Müller V.

Immunogenicity of a chimeric hepatitis A virus (HAV) carrying the HIV gp41 epitope 2F5.

Antiviral Res. 2007 Feb;73(2):101-11.

Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA
Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody.

Nature. 1998 Jun 18;393(6686):648-59

Langhammer S, Fiebig U, Kurth R, Denner J.

Neutralising antibodies against the transmembrane protein of feline leukaemia virus (FeLV).

Vaccine. 2005 May 9;23(25):3341-8.

Law M, Cardoso RM, Wilson IA, Burton DR.

Antigenic and immunogenic study of membrane-proximal external region-grafted gp120 antigens by a DNA prime-protein boost immunization strategy.

J Virol. 2007 Apr;81(8):4272-85.

Lawless MK, Barney S, Guthrie KI, Bucy TB, Petteway SR Jr, Merutka G.

HIV-1 membrane fusion mechanism: structural studies of the interactions between biologically-active peptides from gp41.

Biochemistry. 1996 Oct 22;35(42):13697-708.

Ledford H.

Merck's HIV vaccine flop brings vectors under closer scrutiny.

Nat Biotechnol. 2008 Jan;26(1):3-4.

Ledford H.

HIV vaccine may raise risk.

Nature. 2007 Nov 15;450(7168):325.

Leonard CK, Spellman MW, Riddle L, Harris RJ, Thomas JN, Gregory TJ.

Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells.

J Biol Chem. 1990 Jun 25;265(18):10373-82

Levine AJ,

Viren – Diebe, Mörder und Piraten, Band 35, Spektrum Verlag, Heidelberg, 1993

Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, Oshiro LS.

Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS.

Science. 1984 Aug 24;225(4664):840-2

Levy JA, Mackewicz CE, Barker E.

Controlling HIV pathogenesis: the role of the noncytotoxic anti-HIV response of CD8+ T cells.

Immunol Today. 1996 May;17(5):217-24

Levy JA, Scott I, Mackewicz C.

Protection from HIV/AIDS: the importance of innate immunity.

Clin Immunol. 2003a Sep;108(3):167-74

- Levy JA.
Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection.
Ann N Y Acad Sci. 1989;567:58-68
- Li A, Baba TW, Sodroski J, Zolla-Pazner S, Gorny MK, Robinson J, Posner MR, Katinger H, Barbas CF 3rd, Burton DR, Chou TC, Ruprecht RM.
Synergistic neutralization of a chimeric SIV/HIV type 1 virus with combinations of human anti-HIV type 1 envelope monoclonal antibodies or hyperimmune globulins.
AIDS Res Hum Retroviruses. 1997 May 20;13(8):647-56
- Liang X, Munshi S, Shendure J, Mark G 3rd, Davies ME, Freed DC, Montefiori DC, Shiver JW.
Epitope insertion into variable loops of HIV-1 gp120 as a potential means to improve immunogenicity of viral envelope protein.
Vaccine. 1999 Jul 16;17(22):2862-72
- Liao M, Lu Y, Xiao Y, Dierich MP, Chen Y.
Induction of high level of specific antibody response to the neutralizing epitope ELDKWA on HIV-1 gp41 by peptide-vaccine.
Peptides. 2000 Apr;21(4):463-8
- Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR.
Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection.
Cell. 1996 Aug 9;86(3):367-77
- Lorizate M, de la Arada I, Huarte N, Sánchez-Martínez S, de la Torre BG, Andreu D, Arondo JL, Nieva JL.
Structural analysis and assembly of the HIV-1 Gp41 amino-terminal fusion peptide and the pretransmembrane amphipathic-at-interface sequence.
Biochemistry. 2006 Dec 5;45(48):14337-46.
- Luo M, Yuan F, Liu Y, Jiang S, Song X, Jiang P, Yin X, Ding M, Deng H.
Induction of neutralizing antibody against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by immunization with gp41 membrane-proximal external region (MPER) fused with porcine endogenous retrovirus (PERV) p15E fragment.
Vaccine. 2006 Jan 23;24(4):435-42. Epub 2005 Aug 18.
- Mackewicz CE, Barker E, Levy JA.
Role of beta-chemokines in suppressing HIV replication.
Science. 1996 Nov 22;274(5291):1393-5
- Mangeney M, Heidmann T.
Tumor cells expressing a retroviral envelope escape immune rejection in vivo.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Dec 8;95(25):14920-5.
- Mangeney M, Pothlichet J, Renard M, Ducos B, Heidmann T.
Endogenous retrovirus expression is required for murine melanoma tumor growth in vivo.
Cancer Res. 2005 Apr 1;65(7):2588-91.

Mangeney M, Renard M, Schlecht-Louf G, Bouallaga I, Heidmann O, Letzelter C, Richaud A, Ducos B, Heidmann T.

Placental syncytins: Genetic disjunction between the fusogenic and immunosuppressive activity of retroviral envelope proteins.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Dec 18;104(51):20534-9.

Marusic C, Rizza P, Lattanzi L, Mancini C, Spada M, Belardelli F, Benvenuto E, Capone I.

Chimeric plant virus particles as immunogens for inducing murine and human immune responses against human immunodeficiency virus type 1.

J Virol. 2001 Sep;75(18):8434-9.

Mascola JR, Stiegler G, VanCott TC, Katinger H, Carpenter CB, Hanson CE, Beary H, Hayes D, Frankel SS, Birx DL, Lewis MG.

Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies.

Nat Med. 2000 Feb;6(2):207-10

Mascola JR.

Passive transfer studies to elucidate the role of antibody-mediated protection against HIV-1.

Vaccine. 2002 May 6;20(15):1922-5

McDougal JS, Maddon PJ, Dalgleish AG, Clapham PR, Littman DR, Godfrey M, Maddon DE, Chess L, Weiss RA, Axel R.

The T4 glycoprotein is a cell-surface receptor for the AIDS virus.

Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1986;51 Pt 2:703-11

McGaughey GB, Citron M, Danzeisen RC, Freidinger RM, Garsky VM, Hurni WM, Joyce JG, Liang X, Miller M, Shiver J, Bogusky MJ.

HIV-1 vaccine development: constrained peptide immunogens show improved binding to the anti-HIV-1 gp41 MAb.

Biochemistry. 2003 Mar 25;42(11):3214-23.

Medzhitov R, Janeway C Jr.

Innate immune recognition: mechanisms and pathways.

Immunol Rev. 2000 Feb;173:89-97. Review.

Mehle A, Strack B, Ancuta P, Zhang C, McPike M, Gabuzda D.

Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway.

J Biol Chem. 2003 Dec 13

Mitani M., Cianciolo G.J., Snyderman R., Yasuda M., Good R.A., Day N.K. :

Suppressive effect on polyclonal B-cell activation of a synthetic peptide homologous to a transmembrane component of oncogenic retroviruses.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Jan;84(1):237-40.

Mitsui T, Miyake Y, Takeya H, Hayashi Y, Osada H, Kataoka T.

RKTS-33, an epoxycyclohexenone derivative that specifically inhibits Fas ligand-dependent apoptosis in CTL-mediated cytotoxicity.

Biosci Biotechnol Biochem. 2005 Oct;69(10):1923-8.

Modrow S, Falke D, Tuyen U.

Molekulare Virologie. (2. Auflage)

Spektrum Akademischer Verlag. 2003

- Monell CR, Strand M.
Structural and functional similarities between synthetic HIV gp41 peptides and defensins.
Clin Immunol Immunopathol. 1994 Jun;71(3):315-24.
- Montero M, van Houten NE, Wang X, Scott JK.
The membrane-proximal external region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope: dominant site of antibody neutralization and target for vaccine design.
Microbiol Mol Biol Rev. 2008 Mar;72(1):54-84
- Moog C, Spenlehauer C, Fleury H, Heshmati F, Saragosti S, Letourneur F, Kirn A, Aubertin AM.
Neutralization of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates: a study of parameters implicated in neutralization in vitro.
AIDS Res Hum Retroviruses. 1997 Jan 1;13(1):19-27
- Moore AC, Hutchings CL.
Combination vaccines: synergistic simultaneous induction of antibody and T-cell immunity.
Expert Rev Vaccines. 2007 Feb;6(1):111-21. Review.
- Moore JP, Cao Y, Qing L, Sattentau QJ, Pyati J, Koduri R, Robinson J, Barbas CF 3rd, Burton DR, Ho DD.
Primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 are relatively resistant to neutralization by monoclonal antibodies to gp120, and their neutralization is not predicted by studies with monomeric gp120.
J Virol. 1995 Jan;69(1):101-9
- Moore JP, Trkola A, Dragic T
Co-receptors for HIV-1 entry.
Curr Opin Immunol. 1997 Aug;9(4):551-62
- Moulard M, Phogat SK, Shu Y, Labrijn AF, Xiao X, Binley JM, Zhang MY, Sidorov IA, Broder CC, Robinson J, Parren PW, Burton DR, Dimitrov DS.
Broadly cross-reactive HIV-1-neutralizing human monoclonal Fab selected for binding to gp120-CD4-CCR5 complexes.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 May 14;99(10):6913-8.
- Müller WE, Schröder HC, Ushijima H, Dapper J, Bormann J.
gp120 of HIV-1 induces apoptosis in rat cortical cell cultures: prevention by memantine.
Eur J Pharmacol. 1992 Jul 1;226(3):209-14.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H.
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.
1986.
Biotechnology. 1992;24:17-27
- Muster T, Ferko B, Klima A, Purtscher M, Trkola A, Schulz P, Grassauer A, Engelhardt OG, García-Sástre A, Palese P, et al.
Mucosal model of immunization against human immunodeficiency virus type 1 with a chimeric influenza virus.
J Virol. 1995 Nov;69(11):6678-86.

- Muster T, Guinea R, Trkola A, Purtscher M, Klima A, Steindl F, Palese P, Katinger H.
Cross-neutralizing activity against divergent human immunodeficiency virus type 1 isolates induced by the gp41 sequence ELDKWAS.
J Virol. 1994 Jun;68(6):4031-4
- Muster T, Steindl F, Purtscher M, Trkola A, Klima A, Himmler G, Ruker F, Katinger H.
A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1.
J Virol. 1993 Nov;67(11):6642-7
- Nakashima K, Sakurai F, Kawabata K, Mizuguchi H.
Efficient gene delivery in human and rodent mast cells using adenovirus vectors.
J Control Release. 2008 May 6.
- Nara PL, Smit L, Dunlop N, Hatch W, Merges M, Waters D, Kelliher J, Gallo RC, Fischinger PJ, Goudsmit J.
Emergence of viruses resistant to neutralization by V3-specific antibodies in experimental human immunodeficiency virus type 1 IIIB infection of chimpanzees.
J Virol. 1990 Aug;64(8):3779-91
- Nermut MV, Hockley DJ, Jowett JB, Jones IM, Garreau M, Thomas D.
Fullerene-like organization of HIV gag-protein shell in virus-like particles produced by recombinant baculovirus.
Virology. 1994 Jan;198(1):288-96
- Ni J, Powell R, Baskakov IV, DeVico A, Lewis GK, Wang LX.
Synthesis, conformation, and immunogenicity of monosaccharide-centered multivalent HIV-1 gp41 peptides containing the sequence of DP178.
Bioorg Med Chem. 2004 Jun 15;12(12):3141-8
- Ofek G, Tang M, Sambor A, Katinger H, Mascola JR, Wyatt R, Kwong PD.
Structure and mechanistic analysis of the anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2F5 in complex with its gp41 epitope.
J Virol. 2004 Oct;78(19):10724-37.
- Orth JH, Aktories K, Kubatzky KF.
Modulation of host cell gene expression through activation of STAT transcription factors by *Pasteurella multocida* toxin.
J Biol Chem. 2007 Feb 2;282(5):3050-7.
- Oswald-Richter K, Grill SM, Shariat N, Leelawong M, Sundrud MS, Haas DW, Unutmaz D.
HIV infection of naturally occurring and genetically reprogrammed human regulatory T-cells.
PLoS Biol. 2004 Jul;2(7):E198. Epub 2004 Jul 13.
- Pai, E. F., Klein, M. H., Chong, P., and Pedyczak, A. (2000) World Intellectual Property Organization Patent WO-00/61618
- Pantophlet R, Burton DR.
Immunofocusing: antigen engineering to promote the induction of HIV-neutralizing antibodies.
Trends Mol Med. 2003 Nov;9(11):468-73

- Parmentier M.
Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene.
Nature. 1996 Aug 22;382(6593):722
- Parren PW, Moore JP, Burton DR, Sattentau QJ.
The neutralizing antibody response to HIV-1: viral evasion and escape from humoral immunity.
AIDS. 1999;13 Suppl A:S137-62
- Parren PW, Wang M, Trkola A, Binley JM, Purtscher M, Katinger H, Moore JP, Burton DR.
Antibody neutralization-resistant primary isolates of human immunodeficiency virus type 1.
J Virol. 1998 Dec;72(12):10270-4
- Paulus W.
Directory of Microbicides for the Protection of Materials and Processes. Springer Netherland, Berlin 2006, ISBN 1-402-04861-0
- Peeters M, Sharp PM.
Genetic diversity of HIV-1: the moving target.
AIDS. 2000;14 Suppl 3:S129-40
- Pereira FB, Goni FM, Muga A, Nieva JL.
Permeabilization and fusion of uncharged lipid vesicles induced by the HIV-1 fusion peptide adopting an extended conformation: dose and sequence effects.
Biophys J. 1997 Oct;73(4):1977-86
- Polzer S, Dittmar MT, Schmitz H, Schreiber M.
The N-linked glycan g15 within the V3 loop of the HIV-1 external glycoprotein gp120 affects coreceptor usage, cellular tropism, and neutralization.
Virology. 2002 Dec 5;304(1):70-80.
- Popovic M, Read-Connole E, Gallo RC.
T4 positive human neoplastic cell lines susceptible to and permissive for HTLV-III.
Lancet. 1984 Dec 22;2(8417-18):1472-3.
- Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC
Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS.
Science. 1984 May 4;224(4648):497-500
- Popper SJ, Sarr AD, Travers KU, Guèye-Ndiaye A, Mboup S, Essex ME, Kanki PJ.
Lower human immunodeficiency virus (HIV) type 2 viral load reflects the difference in pathogenicity of HIV-1 and HIV-2.
J Infect Dis. 1999 Oct;180(4):1116-21.
- Preston BD, Poiesz BJ, Loeb LA.
Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase.
Science. 1988 Nov 25;242(4882):1168-71
- Purtscher M, Trkola A, Grassauer A, Schulz PM, Klima A, Doppler S, Gruber G, Buchacher A, Muster T, Katinger H.
Restricted antigenic variability of the epitope recognized by the neutralizing gp41 antibody 2F5.
AIDS. 1996 Jun;10(6):587-93

- Raviv Y, Viard M, Bess J Jr, Blumenthal R.
Quantitative measurement of fusion of HIV-1 and SIV with cultured cells using photosensitized labeling.
Virology. 2002 Feb 15;293(2):243-51
- Reitz MS Jr, Wilson C, Naugle C, Gallo RC, Robert-Guroff M.
Generation of a neutralization-resistant variant of HIV-1 is due to selection for a point mutation in the envelope gene.
Cell. 1988 Jul 1;54(1):57-63
- Rinaldo C, Huang XL, Fan ZF, Ding M, Beltz L, Logar A, Panicali D, Mazzara G, Liebmann J, Cottrill M.
High levels of anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) memory cytotoxic T-lymphocyte activity and low viral load are associated with lack of disease in HIV-1-infected long-term nonprogressors.
J Virol. 1995 Sep;69(9):5838-42
- Roberts JD, Bebenek K, Kunkel TA.
The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1.
Science. 1988 Nov 25;242(4882):1171-3
- Ruegg C.L., Monell C.R., Strand M.: Identification, using synthetic peptides, of the minimum amino acid sequence from the retroviral transmembrane protein p15E required for inhibition of lymphoproliferation and its similarity to gp21 of human T-lymphotropic virus types I and II.
J Virol. 1989 Aug;63(8):3250-6.
- Ruegg C.L., Monell C.R., Strand M.: Inhibition of lymphoproliferation by a synthetic peptide with sequence identity to gp41 of human immunodeficiency virus type 1.
J Virol. 1989 Aug;63(8):3257-60.
- Ruprecht RM, Hofmann-Lehmann R, Smith-Franklin BA, Rasmussen RA, Liska V, Vlasak J, Xu W, Baba TW, Chenine AL, Cavacini LA, Posner MR, Katinger H, Stiegler G, Bernacky BJ, Rizvi TA, Schmidt R, Hill LR, Keeling ME, Montefiori DC, McClure HM.
Protection of neonatal macaques against experimental SHIV infection by human neutralizing monoclonal antibodies.
Transfus Clin Biol. 2001 Aug;8(4):350-8. Review.
- Sabeti PC, Walsh E, Schaffner SF, Varilly P, Fry B, Hutcheson HB, Cullen M, Mikkelsen TS, Roy J, Patterson N, Cooper R, Reich D, Altshuler D, O'Brien S, Lander ES.
The case for selection at CCR5-Delta32.
PLoS Biol. 2005 Nov;3(11):e378. Epub 2005 Nov 1.
- Sackett K, Shai Y.
How structure correlates to function for membrane associated HIV-1 gp41 constructs corresponding to the N-terminal half of the ectodomain.
J Mol Biol. 2003 Oct 10;333(1):47-58
- Sakurai F, Nakamura S, Akitomo K, Shibata H, Terao K, Kawabata K, Hayakawa T, Mizuguchi H.
Transduction properties of adenovirus serotype 35 vectors after intravenous administration into nonhuman primates.
Mol Ther. 2008 Apr;16(4):726-33.

Salzwedel K, Berger EA.

Cooperative subunit interactions within the oligomeric envelope glycoprotein of HIV-1: functional complementation of specific defects in gp120 and gp41. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Nov 7;97(23):12794-9.

Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cognaux J, Forceille C, Muyldermans G, Verhofstede C, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Doms RW, Vassart G, Parmentier M.

Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature.* 1996 Aug 22;382(6593):722-5.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Dec;74(12):5463-7

Santos NC, Prieto M, Castanho MA.

Interaction of the major epitope region of HIV protein gp41 with membrane model systems. A fluorescence spectroscopy study. *Biochemistry.* 1998 Jun 16;37(24):8674-82

Sattentau QJ, Zolla-Pazner S, Poignard P.

Epitope exposure on functional, oligomeric HIV-1 gp41 molecules. *Virology.* 1995 Jan 10;206(1):713-7.

Scanlan CN, Pantophlet R, Wormald MR, Ollmann Saphire E, Stanfield R, Wilson IA, Katinger H, Dwek RA, Rudd PM, Burton DR.

The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 recognizes a cluster of alpha1-->2 mannose residues on the outer face of gp120. *J Virol.* 2002 Jul;76(14):7306-21

Scherer EM, Zwick MB, Teyton L, Burton DR.

Difficulties in eliciting broadly neutralizing anti-HIV antibodies are not explained by cardiolipin autoreactivity. *AIDS.* 2007 Oct 18;21(16):2131-9.

Schibli DJ, Montelaro RC, Vogel HJ.

The membrane-proximal tryptophan-rich region of the HIV glycoprotein, gp41, forms a well-defined helix in dodecylphosphocholine micelles. *Biochemistry.* 2001 Aug 14;40(32):9570-8

Schmolke M.,

Wirkmechanismus und Induktion neutralisierender Antikörper gegen das transmembrane Hüllprotein gp41 von HIV-1, 2004

Schols D, De Clercq E.

Human immunodeficiency virus type 1 gp120 induces anergy in human peripheral blood lymphocytes by inducing interleukin-10 production. *J Virol.* 1996 Aug;70(8):4953-60.

Schröder AR, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F.

HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell.* 2002 Aug 23;110(4):521-9.

- Sempere JM, Soriano V, Benito JM.
T regulatory cells and HIV infection.
AIDS Rev. 2007 Jan-Mar;9(1):54-60. Review.
- Shanmugam V, Switzer WM, Nkengasong JN, García-Lerma G, Green TA, Ekpini E, Sassan-Morokro M, Antunes F, Manshino K, Soriano V, Wiktor SZ, Heneine W.
Lower HIV-2 plasma viral loads may explain differences between the natural histories of HIV-1 and HIV-2 infections.
J Acquir Immune Defic Syndr. 2000 Jul 1;24(3):257-63.
- Sodroski JG, Rosen CA, Haseltine WA.
Trans-acting transcriptional activation of the long terminal repeat of human T lymphotropic viruses in infected cells.
Science. 1984 Jul 27;225(4660):381-5.
- Spencehauer C, Gordon CA, Trkola A, Moore JP.
A luciferase-reporter gene-expressing T-cell line facilitates neutralization and drug-sensitivity assays that use either R5 or X4 strains of human immunodeficiency virus type 1.
Virology. 2001 Feb 15;280(2):292-300.
- Srisurapanon S, Louisirirochanakul S, Sumransurp K, Ratanasrithong M, Chuenchitra T, Jintakatkorn S, Wasi C.
Binding antibody to neutralizing epitope gp41 in HIV-1 subtype CRF 01_AE infection related to stage of disease.
Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2005 Jan;36(1):221-7.
- Stiegler G, Armbruster C, Vcelar B, Stoiber H, Kunert R, Michael NL, Jagodzinski LL, Ammann C, Jäger W, Jacobson J, Vetter N, Katinger H.
Antiviral activity of the neutralizing antibodies 2F5 and 2G12 in asymptomatic HIV-1-infected humans: a phase I evaluation.
AIDS. 2002 Oct 18;16(15):2019-25.
- Stiegler G, Kunert R, Purtscher M, Wolbank S, Voglauer R, Steindl F, Katinger H.
A potent cross-clade neutralizing human monoclonal antibody against a novel epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1.
AIDS Res Hum Retroviruses. 2001 Dec 10;17(18):1757-65.
- Stranford SA, Skurnick J, Louria D, Osmond D, Chang SY, Sninsky J, Ferrari G, Weinhold K, Lindquist C, Levy JA.
Lack of infection in HIV-exposed individuals is associated with a strong CD8(+) cell noncytotoxic anti-HIV response.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Feb 2;96(3):1030-5
- Sun ZY, Oh KJ, Kim M, Yu J, Brusica V, Song L, Qiao Z, Wang JH, Wagner G, Reinherz EL.
HIV-1 broadly neutralizing antibody extracts its epitope from a kinked gp41 ectodomain region on the viral membrane.
Immunity. 2008 Jan;28(1):52-63.
- Takeshita, S., et al., Induction of IL-6 and IL-10 production by recombinant HIV-1 envelope glycoprotein 41 (gp41) in the THP-1 human monocytic cell line.
Cell Immunol, 1995. 165(2): p. 234-42.
- Tan K, Liu J, Wang J, Shen S, Lu M.
Atomic structure of a thermostable subdomain of HIV-1 gp41.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Nov 11;94(23):12303-8.

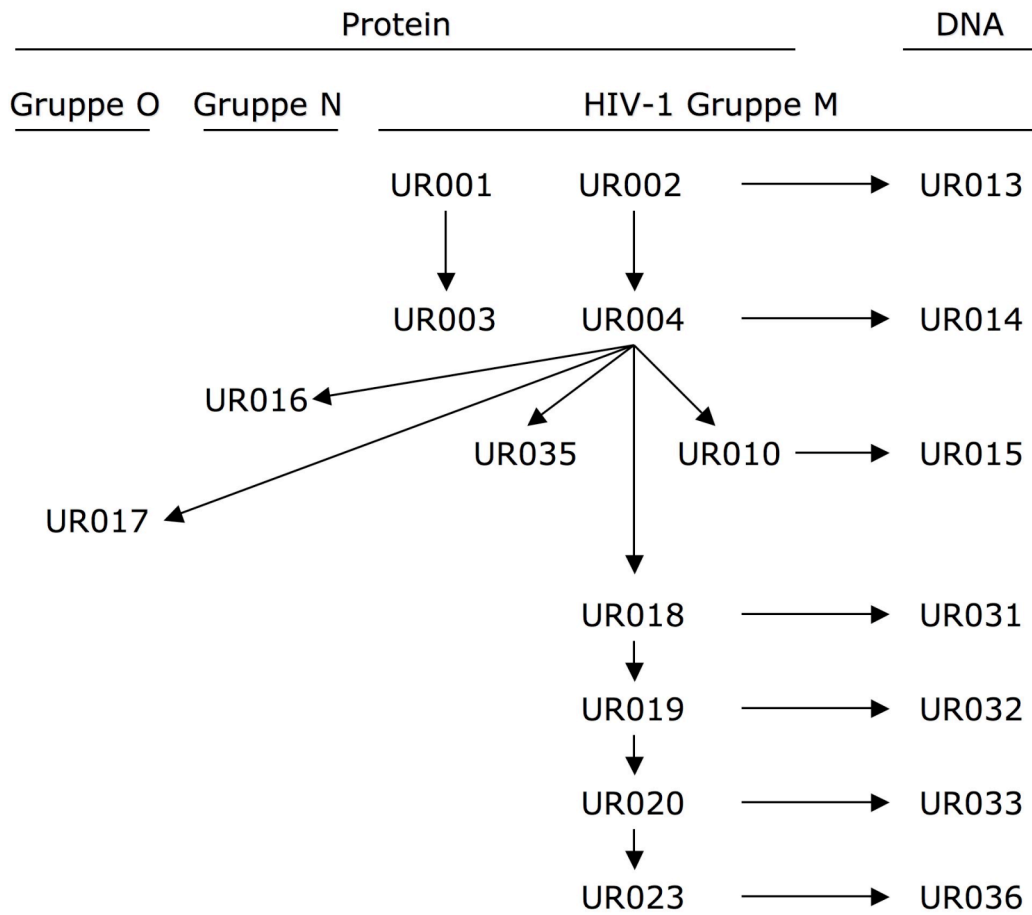
- Thali M, Moore JP, Furman C, Charles M, Ho DD, Robinson J, Sodroski J.
Characterization of conserved human immunodeficiency virus type 1 gp120 neutralization epitopes exposed upon gp120-CD4 binding.
J Virol. 1993 Jul;67(7):3978-88.
- Thorstensson R, Walther L, Putkonen P, Albert J, Biberfeld G.
A capture enzyme immunoassay for detection of HIV-2/SIV antigen.
J Acquir Immune Defic Syndr. 1991;4(4):374-9.
- Trkola A, Kuster H, Rusert P, Joos B, Fischer M, Leemann C, Manrique A, Huber M, Rehr M, Oxenius A, Weber R, Stiegler G, Vcelar B, Katinger H, Aceto L, Günthard HF.
Delay of HIV-1 rebound after cessation of antiretroviral therapy through passive transfer of human neutralizing antibodies.
Nat Med. 2005 Jun;11(6):615-22. Epub 2005 May 8.
- Trkola A, Matthews J, Gordon C, Ketas T, Moore JP.
A cell line-based neutralization assay for primary human immunodeficiency virus type 1 isolates that use either the CCR5 or the CXCR4 coreceptor.
J Virol. 1999 Nov;73(11):8966-74.
- Trkola A, Pomales AB, Yuan H, Korber B, Maddon PJ, Allaway GP, Katinger H, Barbas CF 3rd, Burton DR, Ho DD, et al.
Cross-clade neutralization of primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 by human monoclonal antibodies and tetrameric CD4-IgG.
J Virol. 1995 Nov;69(11):6609-17
- Turner BG, Summers MF
Structural biology of HIV.
J Mol Biol. 1999 Jan 8;285(1):1-32
- Ugen KE, Goedert JJ, Boyer J, Refaeli Y, Frank I, Williams WV, Willoughby A, Landesman S, Mendez H, Rubinstein A, et al.
Vertical transmission of human immunodeficiency virus (HIV) infection. Reactivity of maternal sera with glycoprotein 120 and 41 peptides from HIV type 1.
J Clin Invest. 1992 Jun;89(6):1923-30.
- Vahlenkamp T.W., Tompkins M.B., Tompkins W.A.
Feline immunodeficiency virus infection phenotypically and functionally activates immunosuppressive CD4+CD25+ T regulatory cells.
J Immunol. 2004 Apr 15;172(8):4752-61.
- Vcelar B, Stiegler G, Wolf HM, Muntean W, Leschnik B, Mehandru S, Markowitz M, Armbruster C, Kunert R, Eibl MM, Katinger H.
Reassessment of autoreactivity of the broadly neutralizing HIV antibodies 4E10 and 2F5 and retrospective analysis of clinical safety data.
AIDS. 2007 Oct 18;21(16):2161-70.
- Vlachaki MT, Hernandez-Garcia A, Ittmann M, Chhikara M, Aguilar LK, Zhu X, Teh BS, Butler EB, Woo S, Thompson TC, Barrera-Saldana H, Aguilar-Cordova E.
Impact of preimmunization on adenoviral vector expression and toxicity in a subcutaneous mouse cancer model.
Mol Ther. 2002 Sep;6(3):342-8.
- Walker CM.
How do CD8+ T lymphocytes control HIV replication in vivo? *Res Immunol.* 1989 Jan;140(1):115-8; discussion 122-3

- Weber J.
The pathogenesis of HIV-1 infection.
Br Med Bull. 2001;58:61-72
- Weber T, Paesold G, Galli C, Mischler R, Semenza G, Brunner J.
Evidence for H(+)-induced insertion of influenza hemagglutinin HA2 N-terminal segment into viral membrane.
J Biol Chem. 1994 Jul 15;269(28):18353-8.
- Weiner H.L.
Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells.
Microbes Infect. 2001 Sep;3(11):947-54.
- Weiss L., Donkova-Petrini V., Caccavelli L., Balbo M., Carbonneil C., Levy Y.
Human immunodeficiency virus-driven expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells, which suppress HIV-specific CD4 T-cell responses in HIV-infected patients.
Blood. 2004 Nov 15;104(10):3249-56. Epub 2004 Jul 22.
- Weissenhorn W, Dessen A, Harrison SC, Skehel JJ, Wiley DC.
Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41.
Nature. 1997 May 22;387(6631):426-30.
- Wexler-Cohen Y, Johnson BT, Puri A, Blumenthal R, Shai Y.
Structurally altered peptides reveal an important role for N-terminal heptad repeat binding and stability in the inhibitory action of HIV-1 peptide DP178.
J Biol Chem. 2006 Apr 7;281(14):9005-10. Epub 2006 Feb 1.
- Wharton SA, Calder LJ, Ruigrok RW, Skehel JJ, Steinhauer DA, Wiley DC.
Electron microscopy of antibody complexes of influenza virus haemagglutinin in the fusion pH conformation.
EMBO J. 1995 Jan 16;14(2):240-6.
- Wieggers K, Rutter G, Kottler H, Tessmer U, Hohenberg H, Krausslich HG.
Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polyprotein cleavage sites.
J Virol. 1998 Apr;72(4):2846-54
- Wild CT, Shugars DC, Greenwell TK, McDanal CB, Matthews TJ.
Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Oct 11;91(21):9770-4
- Wilson IA, Skehel JJ, Wiley DC.
Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 A resolution.
Nature. 1981 Jan 29;289(5796):366-73.
- Wolbank S, Kunert R, Stiegler G, Katinger H.
Characterization of human class-switched polymeric (immunoglobulin M [IgM] and IgA) anti-human immunodeficiency virus type 1 antibodies 2F5 and 2G12.
J Virol. 2003 Apr;77(7):4095-103
- Xiao Y, Liao M, Lu Y, Dierich MP, Chen YH.
Epitope-vaccines: a new strategy to induce high levels of neutralizing antibodies against HIV-1.
Immunobiology. 2000a Jan;201(3-4):323-31

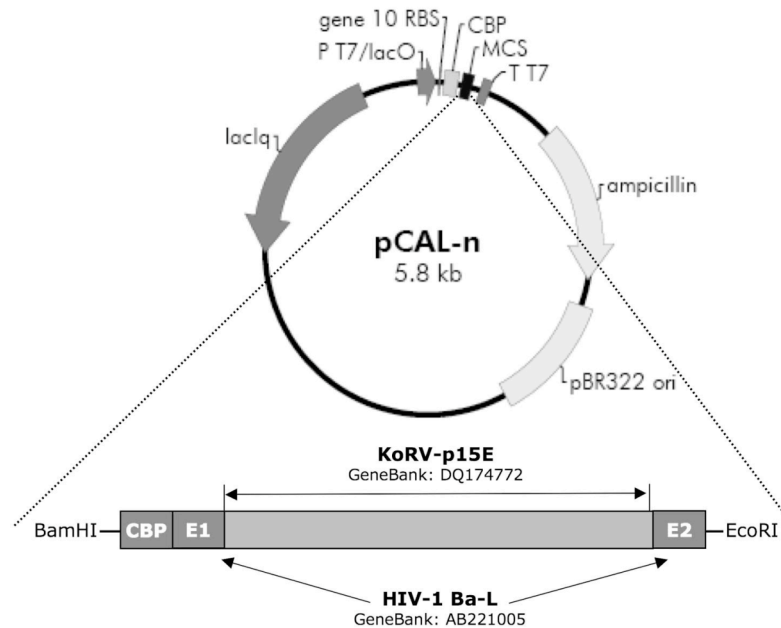
- Ye L, Sun Y, Lin J, Bu Z, Wu Q, Jiang S, Steinhauer DA, Compans RW, Yang C. Antigenic properties of a transport-competent influenza HA/HIV Env chimeric protein. *Virology*. 2006 Aug 15;352(1):74-85.
- Zeisig R, Ress A, Fichtner I, Walther W. Lipoplexes with alkylphospholipid as new helper lipid for efficient in vitro and in vivo gene transfer in tumor therapy. *Cancer Gene Ther*. 2003 Apr;10(4):302-11.
- Zhang MY, Vu BK, Choudhary A, Lu H, Humbert M, Ong H, Alam M, Ruprecht RM, Quinnan G, Jiang S, Montefiori DC, Mascola JR, Broder CC, Haynes BF, Dimitrov DS. Cross-Reactive Human Immunodeficiency Virus Type 1- Neutralizing Human Monoclonal Antibody which Recognizes A Novel Conformational Epitope on gp41 and Lacks Reactivity against Self Antigens. *J Virol*. 2008 May 14.
- Zhu X, Borchers C, Bienstock RJ, Tomer KB. spectrometric characterization of the glycosylation pattern of HIV-gp120 expressed in CHO cells. *Biochemistry*. 2000 Sep 19;39(37):11194-204
- Zwick MB, Jensen R, Church S, Wang M, Stiegler G, Kunert R, Katinger H, Burton DR. Anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) antibodies 2F5 and 4E10 require surprisingly few crucial residues in the membrane-proximal external region of glycoprotein gp41 to neutralize HIV-1. *J Virol*. 2005 Jan;79(2):1252-61.
- Zwick MB, Kelleher R, Jensen R, Labrijn AF, Wang M, Quinnan GV Jr, Parren PW, Burton DR. A novel human antibody against human immunodeficiency virus type 1 gp120 is V1, V2, and V3 loop dependent and helps delimit the epitope of the broadly neutralizing antibody immunoglobulin G1 b12. *J Virol*. 2003 Jun;77(12):6965-78.
- Zwick MB, Labrijn AF, Wang M, Spenlehauer C, Sapphire EO, Binley JM, Moore JP, Stiegler G, Katinger H, Burton DR, Parren PW. Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *J Virol*. 2001b Nov;75(22):10892-905.
- Zwick MB, Parren PW, Sapphire EO, Church S, Wang M, Scott JK, Dawson PE, Wilson IA, Burton DR. Molecular features of the broadly neutralizing immunoglobulin G1 b12 required for recognition of human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J Virol*. 2003 May;77(10):5863-76.
- Zwick MB, Wang M, Pognard P, Stiegler G, Katinger H, Burton DR, Parren PW. Neutralization synergy of human immunodeficiency virus type 1 primary isolates by cocktails of broadly neutralizing antibodies. *J Virol*. 2001a Dec;75(24):12198-208

7. Anhang

A-I. Verwandtschaft der KoRV-p15E basierten Hybridproteine



A-II. Vektorkarten der in *E. coli* BL21 exprimierten Hybridantigene



UR001

MKRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGALLVPRGSLIKGPIDLQQGLTSLQIAMD
 TDLRALQDSISKLEDSLTSLSSEVVLQNRRLDILLFLKEGGLCAALKEECCFYV
 DHSGAVRDSMRRLKEELDKWASELDKWAS .

UR002

MKRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGALLVPRGSLIKGPIDLQQGLTSLQIAMD
 TDLRALQDSISKLEDSLTSLSSEVVLQNRRLDILLFLKEGGLCAALKEECCFYV
 DHSGAVRDSMRRLKEELDKWASELDKWASWYEGWFNIT .

UR003

MKRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGALLVPRGSTSMTLTVQARQLLSLTSLQI
 AMDTDLRALQDSISKLEDSLTSLSSEVVLQNRRLDILLFLKEGGLCAALKEECC
 FYVDHSGAVRDSMRRLKEELDKWASELDKWAS .

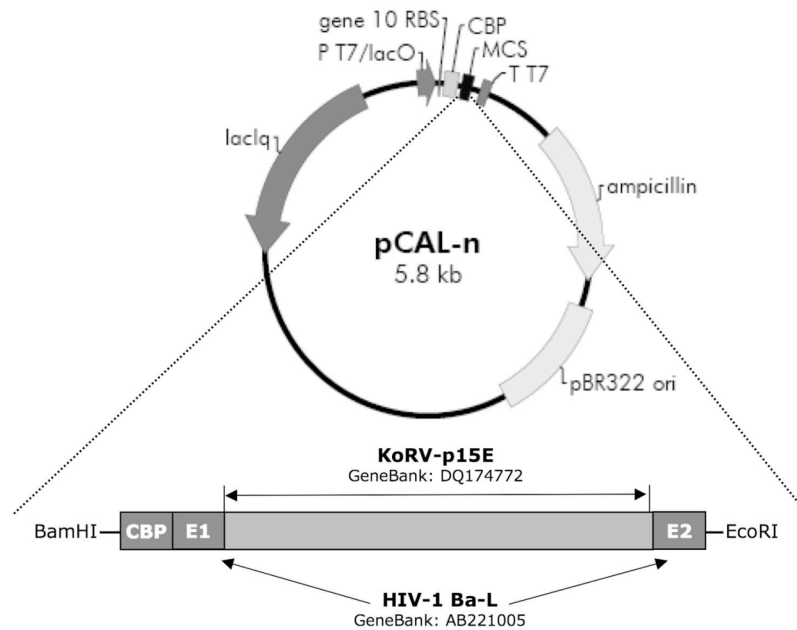
UR004

MKRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGALLVPRGSTSMTLTVQARQLLSLTSLQI
 AMDTDLRALQDSISKLEDSLTSLSSEVVLQNRRLDILLFLKEGGLCAALKEECC
 FYVDHSGAVRDSMRRLKEELDKWASELDKWASWYEGWFNIT .

UR010

MKRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGALLVPRGSTSMTLTVQARQLLSLTSLQI
 AMDTDLRALQDSISKLEDSLTSLSSEVVLQNRRLDILLFLKEGGLCAALKEECC
 FYVDHSGAVRDSMRRLKERLDKRQLELDKWASWYEGWFNIT .

Vektorsequenz HIV-Sequenz Backbone-Sequenz

**UR018**

MKRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGALLVPRGS STMGAASVTLTVQARQLLSL
TSLQIAMDTDLRALQDSISKLEDSLTSLSEVVLQNRRLDLLFLKEGGLCAAL
KEECCFYVDHSGAVRDSMRRLKEELDKWASELDKWASWYEGWFNIT .

UR019

MKRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGALLVPRGS LGAAGSTMGAASVTLTVQAR
QLLSLTSLQIAMDTDLRALQDSISKLEDSLTSLSEVVLQNRRLDLLFLKEGG
LCAALKEECCFYVDHSGAVRDSMRRLKEELDKWASELDKWASWYEGWFNIT .

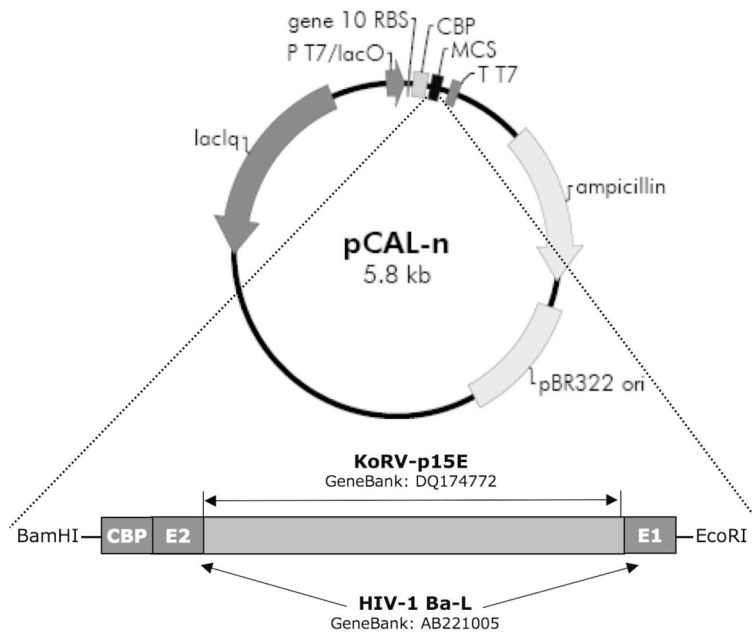
UR020

MKRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGALLVPRGS LFLGFLGAAGSTMGAASVTL
TVQARQLLSLTSLQIAMDTDLRALQDSISKLEDSLTSLSEVVLQNRRLDLLF
LKEGGLCAALKEECCFYVDHSGAVRDSMRRLKEELDKWASELDKWASWYEGWF
NIT .

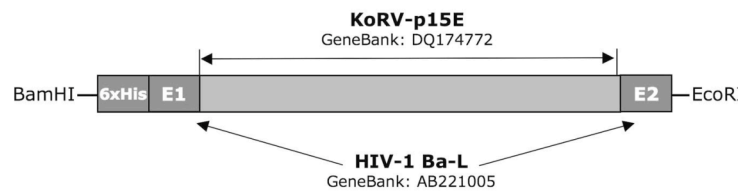
UR023

MKRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGALLVPRGS AAIGALFLGFLGAAGSTMGA
ASVTLTVQARQLLSLTSLQIAMDTDLRALQDSISKLEDSLTSLSEVVLQNRRL
LDLLFLKEGGLCAALKEECCFYVDHSGAVRDSMRRLKEELDKWASELDKWASW
YEGWFNIT .

Vektorsequenz HIV-Sequenz Backbone-Sequenz

**UR035**

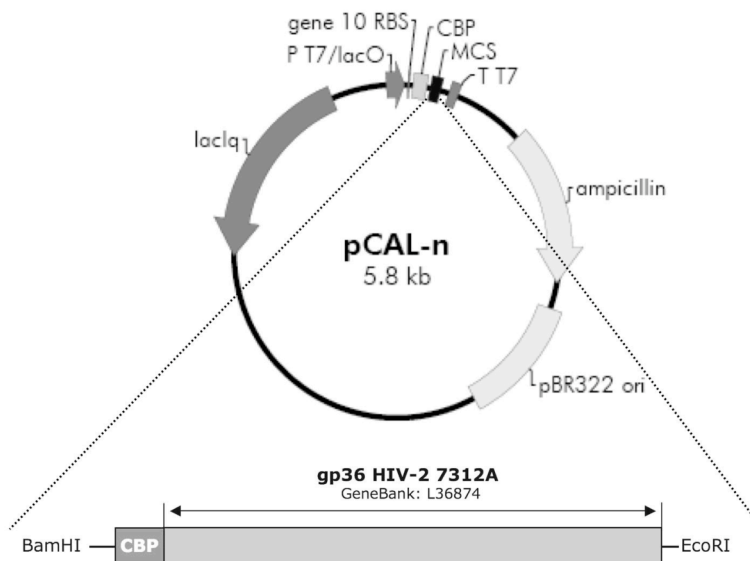
MKRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGALLVPRGSELDKWASELDKASWYEGWF
NITLTSLQIAMDTDLRALQDSISKLEDSLTSLSEVVLQNRRLDLLFLKEGGL
 CAALKEECCFYVDHSGAVRDSMRRLKETTSMTLTVQARQLLS .

**UR038**

MHHHHHGSTSMTLTVQARQLLSLTSLQIAMDTDLRALQDSISKLEDSLTSLS
 EVVLQNRRLDLLFLKEGGLCAALKEECCFYVDHSGAVRDSMRRLKEELDKWA
SELDKASWYEGWFNIT .

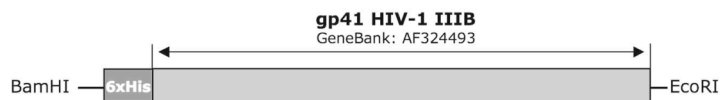
Vektorsequenz **HIV-Sequenz** Backbone-Sequenz

A-III. Vektorkarten der in *E. coli* BL21 rekombinanten TM-Proteine



UR037

MKRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGALLVPRGSGAASLTLSAQSRLLAGIVQ
 QQQQLLDVVKRQEQEMLRLTVWGTKNLQARVTAIEKYLKDQAQLNSWGCAFRQV
 CHTTVPWVNDSLTPDWDNMTWQQWEKQIRDLEANISESLEQAQIQQEKMYEL
 QKLNSWDVFGNWFDLASWVKY.

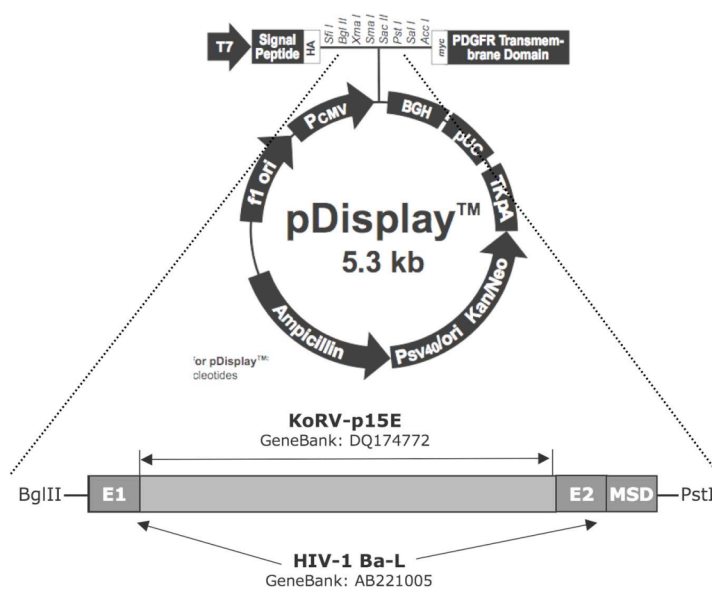


UR040

MHHHHHHGSGASVTLTVQARQLLSDIVQQNNLLRAIEAQHLLQLTVWGIKQ
 LQARILAVERYLKDQQLLGIWGC SGKLICTTAVPWNASWSNKSLEQIWNMTW
 MEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWFNITNWLWY.

Vektorsequenz **HIV-Sequenz** Backbone-Sequenz

A-IV. Vektorkarten der euakryontisch exprimierten Hybridantigene



UR013

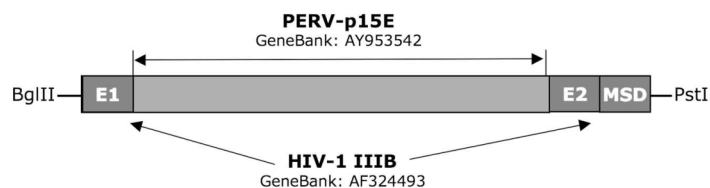
METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYPYDVPDYAGAQPARSSLIKGPIDLQQGLTSLQ
IAMDTDLRALQDSISKLEDSLTSLSEVVLQNRRLDLLFLKEGGLCAALKEEC
 CFYVDHSGAVRDSMRRLKEELDKWASELDKwasWYEGWFNITNWLWYIKLFIM
 IVGGLVGLRIVFAVLSIVN.

UR014

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYPYDVPDYAGAQPARSTSMTLTVQARQLLSLT
SLQIAMTDLRALQDSISKLEDSLTSLSEVVLQNRRLDLLFLKEGGLCAALK
 EECCFYVDHSGAVRDSMRRLKEELDKWASELDKwasWYEGWFNITNWLWYIKL
 FIMIVGGLVGLRIVFAVLSIVN.

UR015

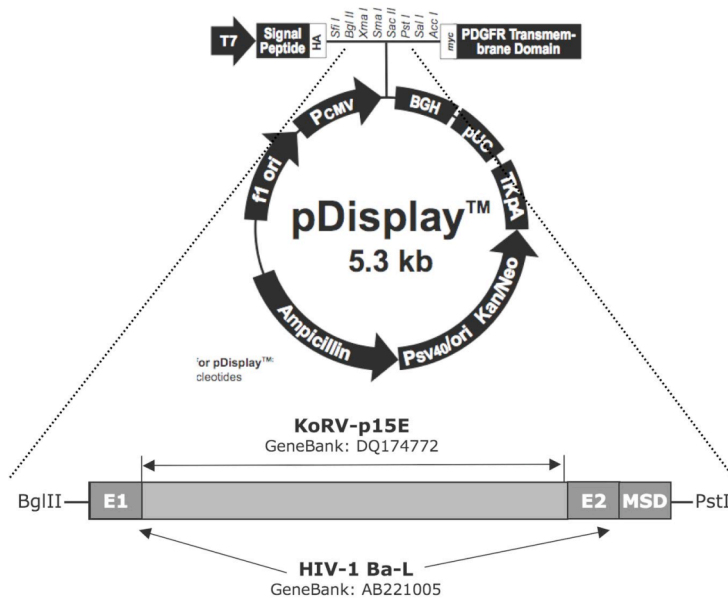
METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYPYDVPDYAGAQPARSTSMTLTVQARQLLSLT
SLQIAMTDLRALQDSISKLEDSLTSLSEVVLQNRRLDLLFLKEGGLCAALK
 EECCFYVDHSGAVRDSMRRLKERLDKRQLELDKwasWYEGWFNITNWLWYIKL
 FITIVGGLVGLRIVFAVLSIVN.



UR007

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYPYDVPDYAGAQPARSGASVTLTVQARQLLSD
IVQQQRIVTEDLQALEKSVSNLEESLTSLSEVVLQNRRLDLLFLKEGGLCVA
 LKEECCFYVDHSGAIRDMSKLRERLERRRREELDKwasLWNWFNITNWLWYI
 KLFIMIVGGLVGLRIVFAVLSIVN.

Vektorsequenz **HIV-Sequenz** Backbone-Sequenz

**UR031**

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYPYDVPDYAGAQPARS **STMGAASVTLTVOARO**
LLSLTSLQIAMDTDLRALQDSISKLEDSLTSLSEVVLQNRRLDLLFLKEGGL
CAALKEECCFYVDHSGAVRDSMRRLKEELDKWASELDKWASWYEGWFNITNWL
WYIKLFIMIVGGLVGLRIVFAGLSIVN .

UR032

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYPYDVPDYAGAQPARS **LGAAGSTMGAASVTLT**
VOARQLLSLTSLQIAMDTDLRALQDSISKLEDSLTSLSEVVLQNRRLDLLFL
KEGGLCAALKEECCFYVDHSGAVRDSMRRLKEELDKWASELDKWASWYEGWFN
ITNWLWYIKLFIMIVGGLVGLRIVFAGLSIVN .

UR033

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYPYDVPDYAGAQPARS **LFLGFLGAAGSTMGAA**
SVTLTVOARQLLSLTSLQIAMDTDLRALQDSISKLEDSLTSLSEVVLQNRRL
DLLFLKEGGLCAALKEECCFYVDHSGAVRDSMRRLKEELDKWASELDKWASWY
EGWFNITNWLWYIKLFIMIVGGLVGLRIVFAGLSIVN .

UR036

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYPYDVPDYAGAQPARS **AAIGALFLGFLGAAGS**
TMGAASVTLTVOARQLLSLTSLQIAMDTDLRALQDSISKLEDSLTSLSEVVLQ
NRRGLDLLFLKEGGLCAALKEECCFYVDHSGAVRDSMRRLKEELDKWASELDK
WASWYEGWFNITNWLWYIKLFIMIVGGLVGLRIVFAGLSIVN

Vektorsequenz **HIV-Sequenz** Backbone-Sequenz

A-V. Aminosäuresequenzen der verwendeten Pepsotmembranen

Pepsotmembran von UR004 (15mer/12 Überlappungen)

VVQREKRAAAI GALFLGFLGAAGSTMGAASSMTLTVQARQLLSLTSLQIAMDTDLRALQDSI
SKLEDSLTSLSSEVVLQNRRLDLLFLKEGGLCAALKEECCFYVDHSGAVRDSMRRLKEELDK
WASELDKWASWYEGWFNITNWLWY

Pepsotmembran von HIV-1 Ba-L gp41 ecto (GeneBank: AB221005) (15mer/12 Überlappungen)

VQREKRAVGIGAVFLGFLGAAGSTMGAASMTLTVQARLLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQ
LTVWGIKQLQARVLAVERYLRDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNASWSNKSLNKIWDNMTWM
EWDREINNYTSIIYSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWFDITKWLWYIKIFIMIV

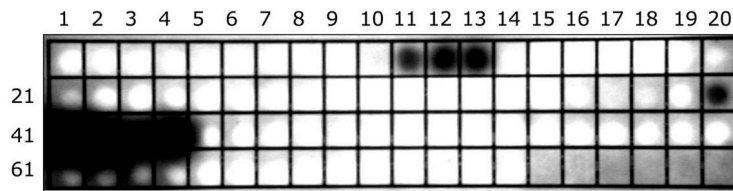
Pepsotmembran HIV-1 IIIB gp41 (GeneBank: X01762) (15mere/5 Überlappungen)

AVGIGALFLGFLGAAGSTMGCTSMTLTVQARQLLSDIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGI
KQLQARILAVERYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNASWSNKSLNKSLEQIWNMTWMEWDREI
NNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWFDITNWLWYIKLIFIMIVGGLVGLRI
VFAVLSIVNRVRQGYSPFSFQTHLPIPRGPDRPEGIEEEGGERDRDRSIRLVNGSLALIWD
LRSCLFSYHRLRDLIIIIVTRIVELLGRRGWEALKYWWNLLQYWSQELKNSAVNLLNATAIA
VAEGTDRVIEVLQAAYRAIRHIPRRIRQGLERILL

Pepsotmembran von HIV-2 7312A gp36 ecto (Gene Bank: L36874) (15mer/12 Überlappungen)

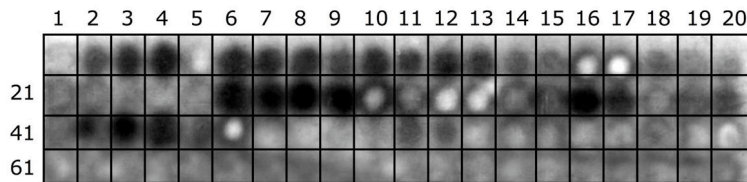
RHKRGV FVLGFLGFLTTAGAAMGAASLTLSAQSR TLLAGIVQQQQQLLDVVKRQQEMLRLTV
WGTKNLQARVTAIEKYLKDQAQLNSWGCAFRQVCHTTVPWVNDSLTPDWDNMTWQQWEKQIR
DLEANI SESLEQAQIQQEK NMYELQKLNSWDVFGNWF DLASWVKYIQYGV

A-VI. Detaillierte Auswertung der Epitope von Abbildung 3.40



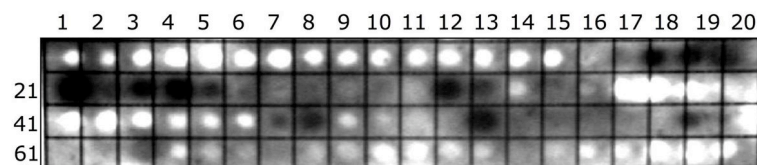
104/2 immunisiert mit UR004, Serum vom 16.02.2006

11. VTLTVQARQLLSLTS	40. KEELDKWASELDKWA
12. TVQARQLLSLTSLQI	41. LDKWASELDKWASWY
13. ARQLLSLTSLQIAMD	42. WASELDKWASWYEGW
	43. ELDKWASWYEGWFNI
	44. KWASWYEGWFNITNW



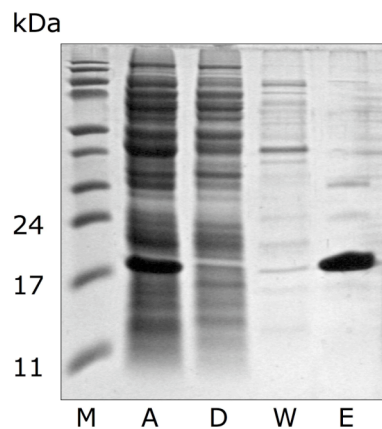
235/1 immunisiert mit UR004, Serum vom 23.08.2007

02. REKRAAAIGALFLGF	06. LGFLGAAGSTMGAAS
03. RAAIGALFLGFLGA	07. LGAAGSTMGAASVTL
04. AIGALFLGFLGAAGS	08. AGSTMGAASVTLTVQ
	09. TMGAASVTLTVQARQ
	10. AASVTLTVQARQLLS
	11. VTLTVQARQLLSLTS
	12. TVQARQLLSLTSLQI
	13. ARQLLSLTSLQIAMD
26. LQNRRLDILFLKEG	42. WASELDKWASWYEGW
27. RRGDILFLKEGGLC	43. ELDKWASWYEGWFNI
28. LDILFLKEGGLCAAL	44. KWASWYEGWFNITNW
29. LFLKEGGLCAALKEE	



231/1 KoRV Infektionsratte, Serum vom 14.03.2007

18. TDLRALQDSISKLED
19. RALQDSISKLEDSLTS
20. QDSISKLEDSLTSLS
21. ISKLEDSLTSLSSEVV
22. LEDSLTSLSSEVVLQN
23. SLTSLSEVVLQNRG
24. SLSEVVLQNRRLDL
25. EVVLQNRRLDLLFL

A-VII. Darstellung des NI-NTA gereinigten rekombinanten gp41

Coomassie Blau gefärbtes PAA-Gel zur Darstellung des Reinheitsgrades von UR040 (=gp41-His) nach Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Das Protein wurde im ELISA und Western Blot zur Charakterisierung der induzierten gp41 spezifischen Immunantwort eingesetzt. M-Marker, A-Ausgangsmaterial, D-Durchlauf, W-Waschfraktion, E-Elutionsfraktion=verwendetes gp41

8. Publikationsliste

1. Poster:

Rayk Behrendt, Martina Lau, Christa-Maria Schmidt, Reinhard Kurth, Joachim Denner
„HIV-1 and porcine endogenous retroviruses (PERV) modulate cytokine production by human immune cells“
GfV Jahrestagung, 16.03.2005 - 19.03.2005, Hannover

Joachim Denner, Rayk Behrendt, Reinhard Kurth
„Modulation of cytokine production by the transmembrane envelope protein gp41 of HIV-1“
2005 International Meeting of The Institute of Human Virology, 29.08.2005 – 02.08.2005, 2005, Baltimore, USA

Rayk Behrendt, Thomas Vahlenkamp, Reinhard Kurth, Joachim Denner
„Induction of CD4+CD25+FoxP3+ T-regulatory celly by transmembrane envelope proteins of HIV and gammaretoviruses“
GfV-Jahrestagung 2006, 15.03.2006 - 18.03.2006, München

Rayk Behrendt, Viet Loan Dao Thi, Thomas Vahlenkamp, Reinhard Kurth, Joachim Denner
„The transmembrane envelope protein of HIV-1 and other retroviruses modulate cytokine production and induce Treg cells“
2006 International Meeting of The Institute of Human Virology, 17.11.2006 – 21.11.2006, Baltimore, USA

Rayk Behrendt, Uwe Fiebig, Stephen Norley, Reinhard Kurth, Joachim Denner
“Assays detecting retrovirus-specific neutralising antibodies based on the comparative measurement of provirus integration by real time PCR“
GfV Jahrestagung 2008, 05.03.2008 – 08.03.2008, Heidelberg

2. Patent

Denner, Joachim; Kurth, Reinhard; Fiebig, Uwe ; Behrendt, Rayk
„Immunogenic Construct And A Method For The Prophylactic Or Therapeutic Treatment Of AIDS“
WO/2007/107597

9. Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Reinhard Kurth ganz herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Robert Koch-Institut sowie für die Begutachtung meiner Dissertation bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Detlev Krüger herzlich für die Betreuung und Begutachtung meiner Dissertation an der Humboldt Universität zu Berlin.

Ich danke Herrn Dr. Joachim Denner für die Betreuung meiner Dissertation am Robert Koch-Institut.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Uwe Fiebig mit dem ich anregende Diskussionen auch immer über fachliche Fragen hinaus führen konnte.

Bei Martina Lau (Tina-Turbo), Christa-Maria Schmidt (Jaschi) und Kerstin Petsch (Schnucki) möchte ich mich für die Unterstützung und Hilfen im Labor und ganz besonders für das sehr schöne Miteinander bedanken.

Dr. Stephen Norley danke ich für die kritische Durchsicht der Manuskripte und für die fachlichen Diskussionen.

Ich danke Dr. Mirco Schmolke für die Bereitstellung der Kontrollkonstrukte der DNA Immunisierungsstudien.

Weiterhin möchte ich Dr. Oliver Hohn und Sandra Kühn für die Einführung in die Geheimnisse der DNA-Vakzinierung danken.

Für die Unterstützung bei den Tierversuchen danke ich Annette Dietrich und Nicole Wagner ganz herzlich.

Ich danke Dr. Magdalena Eschericht und Dr. Jürgen Kreutzberger für das kritische Lesen dieser Dissertation.

Dem (DJ) Sven Stengel möchte ich für den relaxten Groove im Labor danken.

Bei allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppen P12, P13 und ZBS4 möchte ich mich für eine angenehme Arbeitsatmosphäre und der oft gestellten Hilfe bedanken.

Ich danke meinen Eltern und meinen Großeltern, die es mir ermöglicht haben zu tun was ich möchte. Dafür liebe ich euch!

Bei meinen Freunden in Berlin und Ahlbeck möchte ich mich für die Unterstützung und die schönen Stunden außerhalb der Labore bedanken. Diese Balance war mir trotz wenig Zeit stets wichtig.

Mein besonderer persönlicher Dank gilt meiner Freundin Steffi „Stoffi“ Grewe, die mich seit 1999 unterstützt und während der Anfertigung der Diplomarbeit bzw. Dissertation ertragen hat. Ein großer Teil der Energie die hierzu führte kam von Dir! Dafür Danke ich Dir!

10. Eidesstattliche Erklärung

von Rayk Behrendt

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, Januar 2009

Rayk Behrendt

11. Lebenslauf

Rayk Behrendt
Normannenstrasse 7
D-10367 Berlin

eMail: behrendtr@googlemail.com
Telefon: 030 28032076

30.09.2005 - 29.09.2008	Promotion an der Humboldt Universität zu Berlin; Promotionsarbeit am Robert Koch-Institut Berlin; Thema: „Immunogene und Immunsuppressive Eigenschaften des transmembranen Hüllproteins von HIV-1“
30.07.2005 - 29.09.2005	Volontär am Robert Koch-Institut Berlin „Retrovirus-induzierte Immunsuppression“
01.10.2004 - 29.07.2005	Diplomarbeit am Robert Koch-Institut Berlin; Thema: „Immunsuppressive Eigenschaften transmembraner Hüllproteine von Retroviren“ Abschluss: Diplom
01.10.2000 - 30.09.2004	Studium der Biologie an der Ernst Moritz Arndt Universität der Hansestadt Greifswald; Ablegen der Theoretischen Diplomprüfungen in Molekularbiologie, Virologie und Biochemie
01.11.1998 - 30.09.2000	Freiwilliger Grundwehrdienst bei der Bundeswehr
01.09.1992 - 31.08.1998	Besuch des Maxim Gorki Gymnasiums Seebad Heringsdorf Abschluss: Abitur
01.09.1986 - 31.08.1992	Besuch der Grund- und Realschule Seebad Ahlbeck
04.07.1979	geboren in Wolgast

Berlin, 24.01.2009